

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRẦN THỊ HẢI NINH

**NGHIÊN CỨU CĂN NGUYÊN, KẾT QUẢ
ĐIỀU TRỊ VÀ XÁC ĐỊNH ĐƯỜNG LÂY
TRUYỀN CỦA CÁC VI KHUẨN ĐA KHÁNG
THUỐC GÂY VIÊM PHỔI LIÊN QUAN ĐẾN
THỞ MÁY BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH
TỰ GEN THỂ HỆ MỚI**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC HÀ NỘI HỌC Y

TRẦN THỊ HẢI NINH

**NGHIÊN CỨU CĂN NGUYÊN, KẾT QUẢ
ĐIỀU TRỊ VÀ XÁC ĐỊNH ĐƯỜNG LÂY
TRUYỀN CỦA CÁC VI KHUẨN ĐA KHÁNG
THUỐC GÂY VIÊM PHỔI LIÊN QUAN ĐẾN
THỞ MÁY BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH
TỰ GEN THỂ HỆ MỚI**

Chuyên ngành: Truyền nhiễm và các bệnh nhiệt đới

Mã số: 62720153

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. GS.TS NGUYỄN VĂN KÍNH

2. PGS.TS NGUYỄN VŨ TRUNG

HÀ NỘI - 2021

LỜI CAM ĐOAN

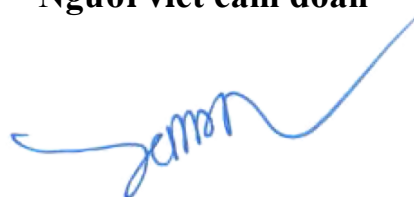
Tôi là Trần Thị Hải Ninh, nghiên cứu sinh khóa 35, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Truyền Nhiễm và các bệnh nhiệt đới, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Nguyễn Văn Kính và PGS.TS. Nguyễn Vũ Trung.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Số liệu trong luận án là một phần số liệu trong Đề tài nghiên cứu mã số HNQT/SPĐP/04.16 thuộc chương trình “Hợp tác nghiên cứu song phương và đa phương về khoa học và công nghệ đến năm 2020” của Bộ Khoa học và Công nghệ, do bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương là cơ quan chủ trì đề tài. Tôi đã được chủ nhiệm đề tài và cơ quan chủ trì đề tài đồng ý cho phép sử dụng một phần số liệu trong đề tài này vào luận án tiến sỹ của mình. 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 04 tháng 01 năm 2022

Người viết cam đoan



Trần Thị Hải Ninh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và làm luận án, tôi đã nhận được sự quan tâm, giúp đỡ rất nhiều của nhà trường, Bệnh viện, gia đình và bạn bè đồng nghiệp.

Tôi xin chân thành cảm ơn:

- Đảng ủy, Ban giám hiệu, Phòng Đào tạo sau đại học - Trường Đại học Y Hà Nội.
- Ban giám đốc, khoa Nội tổng hợp, phòng Kế hoạch tổng hợp, cùng toàn thể cán bộ nhân viên Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương.
- Bộ môn Truyền nhiễm - Trường Đại học Y Hà Nội.
- Khoa Y, trường ĐH Cambridge; Viện nghiên cứu Sanger – Vương quốc Anh; Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Trường Đại học Oxford tại Hà Nội (OUCRU); Hội đồng nghiên cứu y học – Vương quốc Anh; Đại sứ quán Anh tại Việt Nam.
- Văn phòng các chương trình Khoa học và Công nghệ Quốc gia, Bộ Khoa học và công nghệ Việt Nam.

Tôi xin chân thành bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới:

GS.TS. Nguyễn Văn Kính, Chủ tịch Hội Truyền nhiễm Việt Nam, Nguyên Giám đốc Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương, Nguyên Chủ nhiệm Bộ môn Truyền Nhiễm - Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã hết lòng giúp đỡ, luôn tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi học tập và tận tình chỉ bảo, hướng dẫn tôi hoàn thành luận án này.

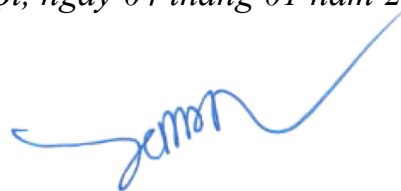
PGS.TS. Nguyễn Vũ Trung, Phó Cục trưởng Cục Khoa học công nghệ và đào tạo – Bộ Y tế, Chủ nhiệm Bộ môn Vi sinh – Kí sinh trùng - Trường Đại học Y Hà Nội, Nguyên Phó Giám đốc Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương, người Thầy đã dìu dắt, dạy dỗ, chỉ bảo tôi trong suốt quá trình học tập và tạo điều kiện, giúp đỡ tôi hoàn thành luận án.

Ban giám đốc Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương cùng toàn thể các bác sĩ, các điều dưỡng, viên chức tại các khoa, phòng đã dành cho tôi nhiều tình cảm và nhiệt tình giúp đỡ, chỉ bảo tôi trong suốt quá trình học tập, làm việc và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy, Cô trong Hội đồng khoa học chấm đề cương đã đóng góp những ý kiến quý báu để hoàn thành luận án.

Và cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn vô hạn tới cha mẹ, chồng con, các anh chị em trong gia đình và bạn bè đã động viên, khích lệ, cổ vũ cho tôi về mặt tinh thần để tôi hoàn tất khóa học này, cũng như tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Hà nội, ngày 04 tháng 01 năm 2022



Trần Thị Hải Ninh

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

| | |
|---------|---|
| AST | : The American Thoracic Society : Hiệp hội Lồng ngực Hoa Kỳ |
| ARDS | : Acute Respiratory Distress Syndrome Hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển |
| BN | : Bệnh nhân |
| BV | : Bệnh viện |
| CDC | : Centers for Disease Control and Prevention Trung tâm kiểm soát dịch bệnh |
| CI | : Confidence Interval Khoảng tin cậy |
| CLSI | : The Clinical and Laboratory Standards Institute Viện Tiêu chuẩn xét nghiệm và lâm sàng |
| COPD | : Chronic obstructive pulmonary disease Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính |
| CRO | : Carbapenem-resistant Organism Vi khuẩn kháng carbapenem |
| ESBL | : Extended-Spectrum Beta-Lactamase Men beta-lactamase phổ rộng |
| ESBL-PE | : Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> sinh men beta-lactamase phổ rộng |
| EUCAST | : The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Ủy ban Châu Âu về thử độ nhạy cảm kháng sinh |
| HIC | : High-income country |

| | |
|------|--|
| | Nước có thu nhập cao |
| HSTC | : Hội sức tích cực |
| ICU | : Intensive Care Unit Đơn vị điều trị tích cực |
| KKS | : Kháng kháng sinh |
| LMIC | : Lower-middle-income country Nước có thu nhập trung bình – thấp |
| MDR | : Multidrug resistance Đa kháng thuốc |
| MLST | : Multi-locus sequence typing Chuỗi đa locus |
| MRSA | : Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Tụ cầu kháng Methicillin |
| NGS | : Next Generation Sequencing Giải trình tự gen thế hệ mới |
| NKBV | : Nhiễm khuẩn bệnh viện |
| NKQ | : Nội khí quản |
| PDR | : Pandrug resistance Toàn kháng thuốc |
| PFGE | : Pulsed field gel electrophoresis Điện di xung điện trường |
| SBS | : Sequencing by Synthesis Sắp xếp theo tổng hợp |
| SMRT | : Single molecule real-time sequencing Giải trình tự gen tức thời đơn phân tử |
| SNVs | : Single nucleotide variants |

| | |
|--------|--|
| | Nucleotide đơn lẻ khác biệt |
| UMIC | : Upper-middle-income country Nước có thu nhập trung bình – cao |
| VAE | : Ventilator-Associated Events Biến cố liên quan đến thở máy |
| VPBV | : Viêm phổi bệnh viện |
| VPLQTM | : Viêm phổi liên quan đến thở máy |
| VRE | : Vancomycin Resistant <i>Enterococci</i> <i>Enterococci</i> kháng Vancomycin |
| WGS | : Whole Genome Sequencing Giải trình tự gen toàn bộ |
| XDR | : Extensive drug resistance Siêu kháng thuốc |

MỤC LỤC

| | |
|---|-----------|
| ĐẶT VẤN ĐỀ | 1 |
| CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN | 3 |
| 1.1. Đại cương về viêm phổi liên quan thở máy | 3 |
| 1.1.1. Khái niệm..... | 3 |
| 1.1.2. Tình hình viêm phổi liên quan thở máy trên thế giới..... | 4 |
| 1.1.3. Tình hình viêm phổi liên quan thở máy tại Việt Nam | 6 |
| 1.2. Căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy | 7 |
| 1.2.1. Phân bố căn nguyên theo khu vực địa lý và mức thu nhập quốc gia.. | 8 |
| 1.2.2. Phân bố căn nguyên theo đặc điểm nhóm bệnh nhân | 10 |
| 1.2.3. Phân bố căn nguyên theo thời điểm mắc viêm phổi liên quan thở máy | 11 |
| 1.2.4. Căn nguyên viêm phổi liên quan thở máy tại Việt Nam | 12 |
| 1.2.5. Đặc điểm kháng kháng sinh của một số vi khuẩn thường gặp gây viêm phổi liên quan thở máy | 13 |
| 1.3. Kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy..... | 18 |
| 1.3.1. Thời gian nằm viện của bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy.... | 18 |
| 1.3.2. Điều trị kháng sinh ở bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy..... | 19 |
| 1.3.3. Tình hình tử vong ở bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy | 21 |
| 1.3.4. Yếu tố tiên lượng tử vong ở bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy | 22 |
| 1.4. Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong nghiên cứu nguồn lây truyền của vi khuẩn trong bệnh viện | 23 |
| 1.4.1. Đại cương về kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới | 23 |
| 1.4.2. Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong xác định đường lây truyền của vi khuẩn trong bệnh viện | 27 |
| 1.5. Giới thiệu khái quát về địa điểm nghiên cứu | 32 |

| | |
|---|-----------|
| CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 34 |
| 2.1. Đối tượng nghiên cứu | 34 |
| 2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn | 34 |
| 2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ..... | 36 |
| 2.2. Phương pháp nghiên cứu | 37 |
| 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu | 37 |
| 2.2.2. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu | 37 |
| 2.2.3. Quy trình nghiên cứu | 38 |
| 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu | 42 |
| 2.3.1. Thời gian nghiên cứu..... | 42 |
| 2.3.2. Địa điểm nghiên cứu..... | 43 |
| 2.4. Nội dung nghiên cứu | 43 |
| 2.4.1. Mục tiêu 1 – Xác định căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới trung ương..... | 43 |
| 2.4.2. Mục tiêu 2 – Đánh giá kết quả điều trị BN viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới trung ương | 44 |
| 2.4.3. Mục tiêu 3 – Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc gây viêm phổi liên quan thở máy bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới | 45 |
| 2.5. Các tiêu chuẩn, kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu..... | 45 |
| 2.5.1. Các khái niệm được sử dụng trong nghiên cứu | 45 |
| 2.5.2. Thang điểm Rankin sửa đổi (Modified Rankin Scale, MRS) | 47 |
| 2.5.3. Bảng điểm APACHE II | 47 |
| 2.5.4. Bảng điểm đánh giá nhanh tình trạng suy đa tạng (qSOFA) | 49 |
| 2.5.5. Các chỉ số đánh giá biến đổi cận lâm sàng ở bệnh nhân | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.6. Kỹ thuật nuôi cấy, định danh và làm kháng sinh đồ với các loại vi khuẩn từ các mẫu bệnh phẩm | 49 |
| 2.5.7. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới | 55 |
| 2.6. Thu thập số liệu | 60 |
| 2.7. Phân tích và xử lí số liệu..... | 60 |
| 2.8. Đạo đức trong nghiên cứu..... | 61 |
| CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ | 63 |
| 3.1. Căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy..... | 64 |
| 3.1.1. Phân bố căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy | 64 |
| 3.1.2. Thực trạng đồng nhiễm căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy | 65 |
| 3.1.3. Đặc điểm kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy | 65 |
| 3.1.4. Yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc trên bệnh nhân...68 | |
| 3.1.5. Thực trạng mang vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường hô hấp của bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy | 69 |
| 3.2. Đánh giá kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy.. | 70 |
| 3.2.1. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu | 70 |
| 3.2.2. Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện..... | 71 |
| 3.2.3. Các thuốc, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân | 72 |
| 3.2.4. Tổn thương trên phim X-quang phổi..... | 74 |
| 3.2.5. Các yếu tố tiên lượng tử vong trên bệnh nhân..... | 75 |
| 3.3. Xác định đường lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới..... | 76 |
| 3.3.1. Phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen..... | 76 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.2. Phân bố các Sequence Types (ST) của vi khuẩn | 78 |
| 3.3.3. Gen kháng thuốc của các loài vi khuẩn | 79 |
| 3.3.4. Cây phát sinh loài của các vi khuẩn | 81 |
| 3.3.5. Sự xuất hiện các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc theo thời gian nghiên cứu..... | 84 |
| 3.3.6. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào Sequence Types..... | 87 |
| 3.3.7. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào phenotypes | 91 |
| CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN..... | 94 |
| 4.1. Căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy..... | 94 |
| 4.1.1. Phân bố căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy | 94 |
| 4.1.2. Thực trạng đồng nhiễm căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy | 95 |
| 4.1.3. Đặc điểm kháng kháng sinh của các loài vi khuẩn | 95 |
| 4.1.4. Yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc trên bệnh nhân.. | 98 |
| 4.1.5. Thực trạng mang vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường hô hấp của bệnh nhân | 99 |
| 4.2. Kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy..... | 100 |
| 4.2.1. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân trong nghiên cứu..... | 100 |
| 4.2.2. Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện..... | 102 |
| 4.2.3. Các thuốc, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân | 103 |
| 4.2.4. Tổn thương trên phim X-quang phổi..... | 106 |
| 4.2.5. Các yếu tố tiên lượng tử vong trên bệnh nhân | 106 |
| 4.3. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới..... | 107 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.1. Phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen..... | 107 |
| 4.3.2. Phân bố các Sequence Types (ST) của vi khuẩn..... | 108 |
| 4.3.3. Gen kháng thuốc của các loài vi khuẩn..... | 110 |
| 4.3.4. Cây phát sinh loài của các vi khuẩn..... | 112 |
| 4.3.5. Sự xuất hiện các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc theo thời gian nghiên cứu..... | 115 |
| 4.3.6. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào Sequences Type..... | 118 |
| 4.3.7. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào phenotypes..... | 122 |
| KẾT LUẬN..... | 124 |
| KHUYẾN NGHỊ..... | 126 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | |
| PHỤ LỤC | |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|--|----|
| Bảng 1. 1. Tần suất mắc và tỷ lệ hiện mắc của VPLQTM từ nghiên cứu phân tích gộp phân tích theo mức thu nhập của các quốc gia | 4 |
| Bảng 1. 2. Phân bố các căn nguyên gây VPLQTM theo vùng lãnh thổ theo kết quả chương trình giám sát kháng sinh SENTRY trong 5 năm | 9 |
| Bảng 2. 1. Bảng điểm đánh giá tình trạng sức khỏe dài hạn và các thông số sinh lý trong giai đoạn cấp, phiên bản II (APACHE II) | 48 |
| Bảng 2. 2. Bảng điểm đánh giá nhanh tình trạng suy đa tạng..... | 49 |
| Bảng 3. 1. Căn nguyên gây viêm phổi liên quan thở máy | 64 |
| Bảng 3. 2. Mô hình hồi quy các yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc | 68 |
| Bảng 3. 3. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu..... | 70 |
| Bảng 3. 4. Điểm MRS của bệnh nhân tại thời điểm xuất viện..... | 71 |
| Bảng 3. 5. Các can thiệp, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân..... | 72 |
| Bảng 3. 6. Thời gian duy trì các can thiệp, thủ thuật..... | 73 |
| Bảng 3. 7. Tình hình sử dụng kháng sinh trên bệnh nhân | 73 |
| Bảng 3. 8. Tổn thương trên phim X-quang phổi | 74 |
| Bảng 3. 9. Mô hình hồi quy các yếu tố tiên lượng tử vong | 75 |
| Bảng 3. 10. Các gen kháng thuốc của các loài vi khuẩn..... | 80 |

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

| | |
|---|----|
| Biểu đồ 1. 1. Phân bố căn nguyên gây viêm phổi liên quan thở máy theo mức thu nhập quốc gia | 8 |
| Biểu đồ 1. 2. Tỷ lệ các chủng <i>S. aureus</i> kháng methicilin (MRSA) tại một số quốc gia trong giai đoạn 1999-2014..... | 17 |
| Biểu đồ 3. 1. Sơ đồ kết quả tuyển chọn bệnh nhân, bệnh phẩm môi trường. 63 | |
| Biểu đồ 3. 2. Thực trạng đồng nhiễm căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy..... | 65 |
| Biểu đồ 3. 3. Đặc điểm kháng kháng sinh của <i>A. baumannii</i> | 65 |
| Biểu đồ 3. 4. Đặc điểm kháng kháng sinh của <i>K. pneumoniae</i> | 66 |
| Biểu đồ 3. 5. Đặc điểm kháng kháng sinh của <i>P. aeruginosa</i> | 67 |
| Biểu đồ 3. 6. Đặc điểm kháng kháng sinh của <i>S. aureus</i> | 67 |
| Biểu đồ 3. 7. Thực trạng mang vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường hô hấp của bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy | 69 |
| Biểu đồ 3. 8. Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện | 71 |
| Biểu đồ 3. 9. Phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen..... | 77 |
| Biểu đồ 3. 10. Phân bố các Sequence Types (ST) của <i>A. baumannii</i> | 78 |
| Biểu đồ 3. 11. Phân bố các Sequence Types (ST) của <i>K. pneumoniae</i> | 78 |
| Biểu đồ 3. 12. Phân bố các Sequence Types (ST) của <i>E. coli</i> | 79 |
| Biểu đồ 3. 13. Cây phát sinh loài của <i>A. baumannii</i> | 81 |
| Biểu đồ 3. 14. Cây phát sinh loài của <i>K. pneumoniae</i> | 82 |
| Biểu đồ 3. 15. Cây phát sinh loài của <i>E.coli</i> | 83 |
| Biểu đồ 3. 16. Sự xuất hiện các chủng <i>A. baumannii</i> theo thời gian | 84 |
| Biểu đồ 3. 17. Sự xuất hiện các chủng <i>K. pneumoniae</i> theo thời gian..... | 85 |
| Biểu đồ 3. 18. Sự xuất hiện các chủng <i>E. coli</i> theo thời gian | 86 |

| | |
|---|----|
| Biểu đồ 3. 19. Sự đa dạng của các chủng vi khuẩn, tình trạng nhiễm các STs khác nhau và nguồn lây giữa các bệnh nhân..... | 87 |
| Biểu đồ 3. 20. Cụm lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc | 88 |
| Biểu đồ 3. 21. Cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc trên một bệnh nhân.. | 89 |
| Biểu đồ 3. 22. Cụm lây truyền của <i>A. baumannii</i> phenotype 2 | 91 |
| Biểu đồ 3. 23. Cụm lây truyền của <i>K. pneumoniae</i> phenotype 1 | 92 |
| Biểu đồ 3. 24. Cụm lây truyền của <i>E. coli</i> phenotype 1 | 93 |

DANH MỤC HÌNH

| | |
|--|----|
| Hình 1. 1. Bản đồ tỷ lệ hiện mắc viêm phổi liên quan thở máy từ 74 nghiên cứu ở Châu Á | 5 |
| Hình 1. 2. Nguyên lý giải trình tự của Illumina | 26 |
| Hình 2. 1. Sơ đồ qui trình nghiên cứu..... | 39 |
| Hình 2. 2. Qui trình hoạt động của PCR gắn Index..... | 56 |

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm phổi liên quan đến thở máy (VPLQTM) là một nhiễm trùng nặng, làm tăng tỷ lệ tử vong, thời gian nằm viện và chi phí điều trị^{1,2}. Một nghiên cứu phân tích tổng hợp cho thấy, ở các nước đang phát triển, VPLQTM là nhiễm trùng liên quan đến chăm sóc y tế thường gặp nhất tại các khoa Hồi sức tích cực (HSTC) với tỷ lệ 22,9 trên 1000 ngày thở máy và cao gấp 8 lần ở Mỹ³. Tại Việt Nam, trong thời gian gần đây, những hướng dẫn mới của Bộ Y tế đã yêu cầu các cơ sở y tế phải báo cáo về tình trạng nhiễm khuẩn bệnh viện (NKBV), trong đó có VPLQTM. Các nghiên cứu về NKBV, chủ yếu được thực hiện tại một số bệnh viện (BV) lớn cho thấy, VPLQTM chiếm tỷ lệ cao nhất trong các NKBV, dao động từ 40-75%^{4,5,6}. Dữ liệu về căn nguyên gây bệnh ghi nhận các vi khuẩn Gram âm gặp phổ biến, nổi bật là *A. baumannii*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*,...^{1,3}. Đặc biệt, trong 10 năm trở lại đây, sự xuất hiện của các vi khuẩn đa kháng hoặc siêu kháng thuốc gây VPLQTM đang là mối đe dọa lớn đối với sức khỏe con người. Tỷ lệ tử vong do VPLQTM được báo cáo khá cao, dao động từ 14-78%⁷. Nhiều yếu tố được coi là nguy cơ dẫn tới tử vong như bệnh lý nền nặng (ung thư, ghép tạng,...), nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc,...⁸. Thực tế này đặt ra nhu cầu cấp thiết tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu về VPLQTM và căn nguyên gây bệnh nhằm hạn chế tối đa sự xuất hiện bệnh, tăng cường hiệu quả điều trị để giảm tỷ lệ tử vong và ngăn chặn sự lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc gây VPLQTM.

Giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) là một công nghệ tiên tiến, cung cấp nhiều thông tin bao gồm định danh chính xác vi khuẩn, xác định chính xác đặc điểm kháng kháng sinh (KKS), kiểu gen, độc lực và nguồn lây truyền của vi khuẩn. Do đó, công nghệ này sẽ giúp tăng cường điều tra dịch tễ học của ổ dịch, từ đó can thiệp kịp thời các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn, nhằm ngăn chặn sự lây lan của các vi khuẩn đa kháng thuốc tại BV và tại cộng đồng. Ngoài ra,

thông tin từ các kết quả nghiên cứu sẽ giúp cho các bác sỹ lâm sàng quản lý, chăm sóc tốt hơn cho bệnh nhân (BN) nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, giúp các nhà hoạch định chính sách xây dựng và phát triển các chiến lược quốc gia về giám sát tình trạng kháng thuốc tại BV và cộng đồng.

BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương là BV chuyên khoa tuyến cuối trong cả nước về các bệnh nhiễm khuẩn. Khoa HSTC của BV tiếp nhận khoảng 400-600 BN mỗi năm trong đó trên 90% BN có đặt nội khí quản (NKQ) và thở máy. Việc tìm hiểu về căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM và sự lây truyền của chúng tại khoa HSTC của BV sẽ cung cấp thông tin về mô hình và cách kiểm soát bệnh tại các BV tuyến cuối trong cả nước, đồng thời phản ánh một phần tình hình VPLQTM tại các nước đang phát triển. Kết quả nghiên cứu sẽ giúp giám sát toàn diện về vi khuẩn đa kháng thuốc gây VPLQTM tại BV, qua đó thiết kế và thực hiện các chiến lược kiểm soát lây nhiễm hiệu quả, mang tới kết quả điều trị tốt nhất cho BN.

Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu căn nguyên, kết quả điều trị và xác định đường lây truyền của các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc gây viêm phổi liên quan đến thở máy bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới” tại khoa HSTC của BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương từ 7/2017 – 1/2018 nhằm 3 mục tiêu:

1. Xác định căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới trung ương (7/2017 – 1/2018).
2. Đánh giá kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới trung ương (7/2017 – 1/2018).
3. Xác định nguồn lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc gây viêm phổi liên quan thở máy bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Đại cương về viêm phổi liên quan thở máy

1.1.1. Khái niệm

Theo định nghĩa của Hiệp hội lồng ngực Hoa Kỳ (The American Thoracic Society, AST), VPLQTM là viêm phổi xuất hiện sau ít nhất 48 giờ kể từ khi BN được đặt ống nội khí quản (NKQ) hoặc mở khí quản và thông khí nhân tạo mà không có bằng chứng viêm phổi trước đó ⁹.

Khái niệm chính xác về VPLQTM vẫn còn nhiều tranh luận do thiếu các tiêu chí đặc thù, giúp phân biệt với các tình trạng bệnh lý khác ở phổi của những BN nặng. Mỗi biểu hiện của VPLQTM là không đặc hiệu và có thể gặp ở nhiều bệnh lý khác. Vì vậy, mỗi tổ chức khác nhau có thể đề xuất định nghĩa khác nhau. Trong Hướng dẫn thực hành quản lý BN VPLQTM của AST, VPLQTM được xác định là tình trạng viêm phổi ở BN thở máy ít nhất 48 giờ và được đặc trưng bởi sự tiến triển hoặc thâm nhiễm mới trên phim X-quang phổi, dấu hiệu nhiễm trùng toàn thân (sốt, biến đổi bạch cầu máu), thay đổi đặc điểm đờm và phát hiện tác nhân gây bệnh ¹⁰. Khung thời gian 48 giờ để phân biệt bất kỳ nhiễm trùng mới nào kể từ thời điểm đặt NKQ, thở máy. Hướng dẫn của Trung tâm kiểm soát dịch bệnh Hoa Kỳ (US CDC) cũng đưa ra các tiêu chí tương tự nhưng không yêu cầu khoảng thời gian cửa sổ sau khi đặt ống NKQ ¹¹. Chính sự khác biệt này dẫn tới việc thống kê tỷ lệ mắc VPLQTM là khác nhau khi sử dụng các định nghĩa khác nhau. Tổng kết từ nhiều nghiên cứu cho thấy, tới thời điểm hiện tại, chưa có định nghĩa nào về VPLQTM, bao gồm cả các định nghĩa được sử dụng rộng rãi nhất, là tin cậy tuyệt đối, có giá trị tốt cả về độ nhạy và độ đặc hiệu ^{12,13}. Trong thời gian gần đây, để nâng cao hiệu quả của việc dự phòng mắc và điều trị VPLQTM, khái niệm biến cố liên quan đến thở máy (VAE) bắt đầu được sử dụng rộng rãi trong giám sát VPLQTM ¹³.

1.1.2. Tình hình viêm phổi liên quan thở máy trên thế giới

Bảng 1. 1. Tần suất mắc và tỷ lệ hiện mắc của VPLQTM từ nghiên cứu phân tích gộp phân tích theo mức thu nhập của các quốc gia³

| | Số nghiên cứu | (95% CI) | I ² | p |
|--|---------------|----------|----------------|---------------|
| Tần suất mắc cộng gộp (trong 1000 ngày thở máy) | | | | |
| LIC/LMIC | 18,5 | 14 | (15,6–21,4) | 99,99 <0,001 |
| UMIC | 15,2 | 9 | (9,3–21,0) | 99,99 <0,001 |
| HIC | 9,0 | 8 | (6,8–11,2) | 99,99 <0,001 |
| Tổng | 15,1 | 31 | (12,1–18,0) | 100,00 <0,001 |
| Tỷ lệ hiện mắc cộng gộp (%) | | | | |
| LIC/LMIC | 13,3 | 35 | (8,6–20,2) | 99,28 <0,001 |
| UMIC | 15,4 | 24 | (9,5–24,1) | 99,67 <0,001 |
| HIC | 8,0 | 15 | (4,6–13,6) | 99,10 <0,001 |
| Tổng | 12,7 | 74 | (10,0–16,1) | 99,48 <0,001 |

Ghi chú: CI (Confidence Interval): khoảng tin cậy, HIC (High-income country): nước có thu nhập cao, LMIC (Lower-middle-income country): nước có thu nhập trung bình – thấp, UMIC (Upper-middle-income country): nước có thu nhập trung bình – cao.

Tỷ lệ VPLQTM được báo cáo dao động từ 5-40% số BN được thở máy xâm nhập từ 2 ngày trở lên^{2,14}, và có sự khác biệt lớn, tùy thuộc vào khu vực địa lý, tính chất khoa HSTC và các tiêu chí sử dụng để chẩn đoán. Tại các BV ở khu vực Bắc Mỹ, tần suất mắc VPLQTM khá thấp, chỉ từ 1-2,5 ca trong 1000 ngày thở máy¹⁵. Trong khi đó, tại Châu Âu, tần suất này cao hơn đáng kể. Trong nghiên cứu EU-VAP/HAP, tần suất mắc VPLQTM là 18,3 ca trong 1000 ngày thở máy¹⁶. Một nghiên cứu tổng quan hệ thống và phân tích cộng gộp dữ liệu về VPLQTM từ 22 quốc gia trên thế giới chỉ ra, ở các nước có thu nhập trung bình và thấp, tần suất này cao hơn so với Mỹ và các quốc gia có thu nhập

cao, với 18,5 so với 9 ca cho 1000 ngày thở máy³.

Tổng hợp các nghiên cứu về VPLQTM tại các quốc gia Châu Á cho thấy, tần suất mới mắc cộng gộp cao nhất ở Mông Cổ (43,7/1000 ngày thở máy) và tỷ lệ hiện mắc cộng gộp cao nhất ở Hồng Kông (48,1%)³.



Hình 1. 1. Bản đồ tỷ lệ hiện mắc viêm phổi liên quan thở máy từ 74 nghiên cứu ở Châu Á³

Phân tích cộng gộp dữ liệu từ các nghiên cứu về 18.400 đợt VPLQTM trên 549.478 BN nhằm đánh giá sự khác biệt về chất lượng nghiên cứu, loại nghiên cứu, năm xuất bản, đặc điểm BV, đặc điểm khoa HSTC có ảnh hưởng tới tỷ lệ hiện mắc và tần suất mắc VPLQTM cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê³. Như vậy, những khác biệt lớn về tỷ lệ VPLQTM giữa các cơ sở y tế, ngoài việc thực sự do tỷ lệ mắc khác nhau, có thể một phần được giải thích bởi sự khác biệt trong định nghĩa, cách áp dụng định nghĩa, hạn chế về chẩn đoán của các định nghĩa và sự khác biệt trong phương pháp chẩn đoán.

1.1.3. Tình hình viêm phổi liên quan thở máy tại Việt Nam

Tại Việt Nam, tính đến thời điểm hiện tại, chưa có đánh giá quốc gia nào về tỷ lệ mắc cũng như gánh nặng của VPLQTM. Tuy nhiên, trong thời gian gần đây, những hướng dẫn mới của Bộ Y tế đã yêu cầu các cơ sở y tế phải báo cáo về tình trạng NKBV trong đó có VPLQTM. Một số nghiên cứu về VPLQTM chủ yếu được thực hiện tại các BV lớn như BV Bạch Mai, BV Chợ Rẫy, BV Nhi Trung ương, BV Thống Nhất và BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương.

Trong giai đoạn từ 2011 – 2015, nhìn chung, tỉ lệ VPLQTM tại khoa HSTC của một số BV lớn như BV Bạch Mai, BV Chợ Rẫy và BV Thống Nhất được báo cáo trong khoảng 25% – 55%. Tác giả Nguyễn Ngọc Quang nghiên cứu từ năm 2010 đến 2011 tại khoa HSTC BV Bạch Mai, nhận thấy tỉ lệ mắc VPLQTM là 55,8% với tần suất 46/1000 ngày thở máy¹⁷. Cũng tại khoa Cấp cứu và HSTC BV Bạch Mai, từ năm 2009 đến 2013, Trần Hữu Thông nghiên cứu 153 BN thấy tỉ lệ VPLQTM là 47,7%⁴. Theo Hà Sơn Bình, từ 1/7/2014 đến 30/6/2015, trong 315 BN được chọn vào nghiên cứu, có 77 BN bị VPLQTM chiếm tỉ lệ 24,4% và tần suất là 24,8/1000 ngày thở máy¹⁸. Tại BV Nhi Trung ương, theo một báo cáo được công bố năm 2011, BV có khoảng 1000 trẻ thở máy/ngày và nghiên cứu tại 3 khoa hồi sức bao gồm khoa hồi sức cấp cứu, hồi sức sơ sinh và hồi sức ngoại cho thấy tỉ lệ mắc VPLQTM là 26,7%, tần suất mắc là 27,5/1000 ngày thở máy¹⁹. Cũng tại BV Nhi Trung ương, nghiên cứu trên nhóm BN sau mổ tim mở tại khoa Hồi sức ngoại chỉ ra tỉ lệ mắc VPLQTM thấp hơn hẳn, chỉ ở mức 12,8%²⁰. Tuy nhiên, đánh giá tỉ lệ mắc tích lũy theo thời gian ở những BN thở máy 20 ngày trở lên, tỉ lệ mắc VPLQTM lên tới 48,5%²⁰. Ở khu vực phía nam, theo báo cáo năm 2013 tại BV Chợ Rẫy, trong 86 BN thở máy đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu, tỉ lệ VPLQTM là 21,2%⁵. Khảo sát về NKBV ở nhóm BN cao tuổi tại BV Thống Nhất trong giai đoạn 2013-2014 cho thấy tỉ lệ mắc VPLQTM là 49,6%²¹.

Các báo cáo trong giai đoạn từ 2016 đến nay, nhìn chung, có ghi nhận tỷ lệ mắc VPLQTM giảm hơn so với giai đoạn trước, tuy mức độ giảm chưa nhiều. Nghiên cứu của Hoàng Khánh Linh về VPLQTM tại khoa HSTC, BV Bạch Mai giai đoạn 2017-2018 cho thấy, tỷ lệ mắc là 23,4% và tần suất là 24,5/1000 ngày thở máy²². Tại BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương, báo cáo năm 2017 của Vũ Đình Phú ghi nhận tỷ lệ mắc VPLQTM tại khoa HSTC là 24,6% và tần suất là 21,7/1000 ngày thở máy²³. Tác giả Lê Kiến Ngãi trong nghiên cứu về VPLQTM ở trẻ sơ sinh tại BV Nhi Trung ương thấy rằng tỷ lệ mắc 25,1% và tần suất mắc là 31,7/1000 ngày thở máy²⁴.

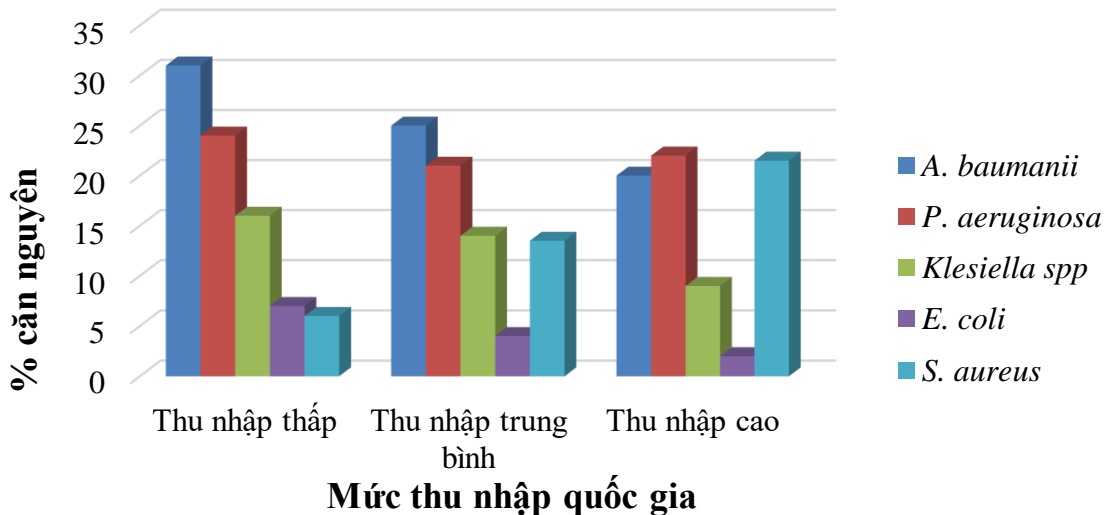
Các số liệu thống kê trên cho thấy, khi so sánh hai giai đoạn 2011-2015 và 2016 đến nay, mặc dù Bộ Y tế, các BV đã có nhiều nỗ lực, đưa ra nhiều hướng dẫn thực hành chuẩn nhằm làm giảm tỷ lệ mắc VPLQTM, nhưng hiệu quả chưa rõ rệt. Vì vậy, bên cạnh các biện pháp phòng ngừa chung (phòng ngừa chuẩn), cần tiếp tục có thêm các phân tích để xác định chính xác vấn đề, các yếu tố nguy cơ mắc VPLQTM, từ đó đề xuất các biện pháp dự phòng phù hợp.

1.2. Căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy

Căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM thay đổi tùy thuộc khu vực địa lý, thời gian, đối tượng nghiên cứu, BV/khoa nơi tiến hành nghiên cứu, cách lấy bệnh phẩm có xâm nhập hay không xâm nhập. Ngoài ra, tình trạng bệnh lý nền, thời gian nằm viện, thời gian đặt ống NKQ, tiền sử sử dụng kháng sinh cũng là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới căn nguyên gây bệnh. Các nghiên cứu cho thấy, nhiều loài vi khuẩn khác nhau có thể là căn nguyên gây VPLQTM ở các BN khác nhau và trên một BN có thể nhiễm nhiều căn nguyên khác nhau. Các căn nguyên thường gặp bao gồm các trực khuẩn Gram âm (ví dụ: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *P. aeruginosa* và *Acinetobacter spp*) và các cầu khuẩn Gram dương (ví dụ: *S. aureus*, bao gồm cả *S. aureus* kháng Methicillin (MRSA), *Streptococcus spp*)^{3, 25}.

1.2.1. Phân bố căn nguyên theo khu vực địa lý và mức thu nhập quốc gia

Hiện tại, nhiều nước có thu nhập trung bình và thấp đang có sự phát triển nhanh chóng về kinh tế, kèm theo đó là nhu cầu chăm sóc y tế ngày càng cao, ngày càng nhiều người đến khám chữa bệnh tại các cơ sở y tế. Cùng với thực tế đó, việc thiếu những quy định về sử dụng kháng sinh, các chương trình quản lý sử dụng kháng sinh, chương trình kiểm soát nhiễm khuẩn,... dẫn đến việc sử dụng kháng sinh rộng rãi, gia tăng vi khuẩn kháng thuốc. Ở các nước phát triển, nhờ sự phối hợp tốt giữa giám sát, đào tạo, các gói dự phòng và can thiệp chuẩn nên tỷ lệ VPLQTM đang có xu hướng giảm xuống.



Biểu đồ 1. 1. Phân bố căn nguyên gây viêm phổi liên quan thở máy theo mức thu nhập quốc gia ³

Một nghiên cứu phân tích tổng hợp về VPLQTM ở các nước Châu Á cho thấy, *A. baumannii* là căn nguyên gặp nhiều nhất (trung bình là 26%), trong đó ở các nước có thu nhập thấp, tỷ lệ này là trên 30% và có xu hướng giảm dần ở các nước có thu nhập trung bình và thu nhập cao ³. Trong khi đó, ở các nước có thu nhập cao, *S. aureus* và *P. aeruginosa* là căn nguyên gặp phổ biến ³. Nghiên cứu tương tự của Ronald Jones phân tích tổng hợp số liệu từ 31.436 ca VPBV và VPLQTM của chương trình giám sát kháng sinh SENTRY tại 3 khu

vực Hoa Kỳ, châu Âu và châu Mỹ Latinh ghi nhận tuy có những dao động về mức độ thường gặp của các vi khuẩn giữa các khu vực địa lý, nhưng 6 tác nhân vi khuẩn gây VPBV và VPLQTM hay gặp nhất (chiếm 75,8% các trường hợp ở Châu Âu và 85,4% các trường hợp ở Mỹ Latinh) là *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *A. baumannii* và *Enterobacter species* ²⁵.

Bảng 1. 2. Phân bố các căn nguyên gây VPLQTM theo vùng lãnh thổ theo kết quả chương trình giám sát kháng sinh SENTRY trong 5 năm ²⁵

| Căn nguyên | Tỷ lệ mắc (%) | | | |
|---------------------------------|--------------------|------|---------|-----------|
| | Tất cả các khu vực | Mỹ | Châu Âu | Mỹ Latinh |
| <i>S. aureus</i> | 28,0 | 36,3 | 23,0 | 20,1 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 21,8 | 19,7 | 20,8 | 28,2 |
| <i>K. pneumonia</i> | 9,8 | 8,5 | 10,1 | 12,1 |
| <i>E. coli</i> | 6,9 | 4,6 | 10,1 | 5,5 |
| <i>Acinetobacter species</i> | 6,8 | 4,8 | 5,6 | 13,3 |
| <i>Enterobacter species</i> | 6,3 | 6,5 | 6,2 | 6,2 |
| <i>Serratia species</i> | 3,5 | 4,1 | 3,2 | 2,4 |
| <i>S. maltophilia</i> | 3,1 | 3,3 | 3,2 | 2,3 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,9 | 2,5 | 3,6 | 2,4 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 2,7 | 2,5 | 3,7 | 1,3 |

Tuy nhiên, mức độ phổ biến của các căn nguyên này khác nhau giữa các khu vực. Cụ thể, 3 căn nguyên thường gặp nhất ở Mỹ và Châu Âu là tương đồng, lần lượt là *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *K. pneumonia*. Trong khi đó, ở Mỹ Latinh, *P. aeruginosa* là căn nguyên thường gặp nhất, tiếp theo là *S. aureus* và *A. baumannii* ²⁵. Như vậy, khác biệt so với khu vực Châu Á, ở nghiên cứu này, *A. baumannii* chỉ đứng hàng thứ 3 trong các căn nguyên thường gặp của VPLQTM ở Mỹ Latinh và không phải là căn nguyên hàng đầu ở Mỹ hoặc Châu Âu.

1.2.2. Phân bố căn nguyên theo đặc điểm nhóm bệnh nhân

Nhóm BN chấn thương/phẫu thuật ngoại khoa: Một nghiên cứu tiên cứu thực hiện tại 27 khoa HSTC của 9 nước Châu Âu (Bỉ, Pháp, Đức, Hy Lạp, Ý, Iceland, Bồ Đào Nha, Tây Ban Nha và Thổ Nhĩ Kỳ) được công bố vào năm 2016 cho thấy nhóm BN chấn thương sọ não có tỷ lệ mắc VPLQTM là 36,5%. Mặc dù nhóm BN này đa số trẻ tuổi, giới nam chiếm ưu thế, ít có bệnh lý nền nhưng vẫn là nhóm BN có nguy cơ cao mắc VPLQTM. *Enterobacteriaceae* là căn nguyên gặp phổ biến nhất ở nhóm này (chiếm 29%), tiếp theo là *A. baumannii* (22,9%), *S. aureus* nhạy cảm với methicillin (16,7%)¹⁶. Một nghiên cứu khác được thực hiện trong 2 năm tại trung tâm chuyên điều trị cho các BN chấn thương cũng ghi nhận *Enterobacteria species* (16,5%) và *H. influenzae* (12,1%) là các căn nguyên gặp phổ biến nhất. Khái quát chung, nhóm vi khuẩn Gram âm chiếm ưu thế (65,9%) so với nhóm vi khuẩn Gram dương (21,4%), trong đó có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) về căn nguyên gây VPLQTM do nhóm vi khuẩn Gram âm giữa nhóm BN bị chấn thương (65,9%) so với nhóm BN không bị chấn thương (30%)²⁶.

Nhóm BN mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD): trong nghiên cứu tại 27 khoa HSTC của 9 nước Châu Âu, *Enterobacteriaceae* là căn nguyên gặp nhiều nhất, tiếp theo là *P. aeruginosa*. So với nhóm BN không mắc COPD thì tỷ lệ nhiễm *P. aeruginosa* ở nhóm mắc COPD cao hơn có ý nghĩa thống kê (15,8% so với 26,4%, $p = 0,0037$). Nhìn chung, nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ mắc các trực khuẩn Gram âm không sinh men ở nhóm BN COPD cao hơn nhóm còn lại¹⁶. Một nghiên cứu phân tích tổng hợp về VPLQTM ở BN COPD được công bố năm 2016 trên tạp chí Dimensions of Critical Care Nursing chỉ ra sự gia tăng các căn nguyên là trực khuẩn Gram âm, đặc biệt là *P. aeruginosa* (31%). Ngoài ra, các căn nguyên gặp phổ biến khác là *A. baumannii* (19%) và *S. aureus* (13%)²⁷.

Nhóm BN cao tuổi: người bệnh cao tuổi thường đi kèm với các bệnh lý nền mạn tính, tình trạng suy giảm chức năng các cơ quan, rối loạn dinh dưỡng. Nghiên cứu cho thấy ở nhóm BN này, *Enterobacteriaceae*, đặc biệt là *E. coli* và *K. pneumoniae*, chiếm ưu thế, tiếp theo đến *P. aeruginosa*, MRSA và *A. baumannii*¹⁶. Một báo cáo phân tích sâu hơn về phân bố căn nguyên gây VPLQTM theo nhóm tuổi của BN thấy rằng *E. coli* là căn nguyên đặc biệt phổ biến ở nhóm BN già và rất già bị viêm phổi và thường xảy ra sau khi mắc viêm phổi do hít phải²⁸. Việc hít phải các chất dịch dạ dày qua đường NKQ hoặc mở khí quản là thường gặp ở những BN cao tuổi có tổn thương thần kinh.

1.2.3. Phân bố căn nguyên theo thời điểm mắc viêm phổi liên quan thở máy

Căn cứ vào thời gian khởi phát, VPLQTM được phân chia thành VPLQTM sớm và muộn. VPLQTM sớm là tình trạng VPLQTM xuất hiện trong vòng 4 ngày kể từ khi thở máy. VPLQTM muộn là tình trạng VPLQTM xuất hiện từ ngày thứ 5 trở đi tính từ khi bắt đầu thở máy. VPLQTM sớm thường được coi là có tiên lượng tốt hơn và căn nguyên thường gặp là các vi khuẩn cộng đồng, còn nhạy cảm với nhiều kháng sinh. Trái lại, VPLQTM muộn có tiên lượng xấu hơn và căn nguyên hay gặp là các vi khuẩn BV, đa KKS. Một số báo cáo cho thấy căn nguyên thường gặp ở nhóm VPLQTM sớm là *S. aureus* nhạy cảm methicilin, *S. pneumoniae* và *H. influenzae*. Trong khi đó, ở nhóm VPLQTM muộn, căn nguyên hay gặp là MRSA, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* và *S. maltophilia*^{9,29}. Restrepo và cộng sự trong nghiên cứu công bố năm 2013, so sánh về căn nguyên gây VPLQTM sớm và muộn cũng chỉ ra kết quả tương tự với căn nguyên thường gặp ở nhóm VPLQTM sớm là *S. aureus* và *S. pneumoniae*, còn ở nhóm VPLQTM muộn là MRSA và các trực khuẩn Gram âm đường ruột. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm³⁰. Một điều đáng lưu ý, hiện nay, việc phân chia BN VPLQTM thành nhóm sớm và muộn đang gặp phải một số ý kiến trái chiều. Thứ nhất, liên quan

đến khái niệm về VPLQTM sớm và muộn. Hiện nay, các tài liệu vẫn chưa chỉ ra được căn cứ chính xác để xác định khái niệm sớm và muộn dựa trên số ngày thở máy. Tương tự như vậy, cột mốc 4 hay 5 ngày thở máy cũng chưa được xác thực mức độ đúng đắn. Do vậy, nhiều tác giả lựa chọn cột mốc 7 ngày thở máy làm căn cứ để phân biệt VPLQTM sớm và muộn. Thứ hai, sự thay đổi về dịch tễ cũng như đặc tính của vi khuẩn làm cho việc phân chia căn nguyên gây VPLQTM theo thời điểm mắc bệnh không còn chính xác. Nhiều BN mắc VPLQTM sớm vẫn nhiễm các căn nguyên vi khuẩn đa kháng thuốc³⁰.

1.2.4. Căn nguyên viêm phổi liên quan thở máy tại Việt Nam

Tại Việt Nam, tính đến thời điểm hiện tại, chưa có nghiên cứu phân tích tổng hợp về căn nguyên gây VPLQTM ở mức độ quốc gia, chỉ chủ yếu là các nghiên cứu đơn lẻ được thực hiện tại các BV lớn. Báo cáo của Trần Hữu Thông năm 2012 tại khoa Cấp cứu và HSTC BV Bạch Mai chỉ ra các căn nguyên gây VPLQTM thường gặp tại đơn vị này là *A. baumannii* (40%), tiếp đến là *P. aeruginosa* (26,7%), các vi khuẩn khác là *K. pneumoniae* và *S. aureus*⁴. Năm 2013, Phạm Thái Dũng cũng báo cáo kết quả tương tự về căn nguyên gây VPLQTM tại khoa HSTC, BV 103 chỉ ra vi khuẩn Gram âm chiếm đa số (79,31%), còn vi khuẩn Gram dương chiếm 20,69%. Tuy nhiên, xét cụ thể về căn nguyên thì gặp nhiều nhất là *P. aeruginosa* (36,21%), đứng thứ 2 là *E. coli* (22,41%)³¹. Các báo cáo tại BV Nhi Trung ương, trên nhóm trẻ em mắc VPLQTM, ghi nhận căn nguyên vi khuẩn Gram âm chiếm trên 80%^{19,20} trong đó nổi lên hàng đầu là *P. aeruginosa* (35%)¹⁹ và *K. pneumoniae* (37,5%)²⁰. Trên nhóm BN đột quỵ não, nghiên cứu của tác giả Vũ Đức Thịnh tại BV Hữu Nghị, trong giai đoạn 2009-2015 thấy rằng, căn nguyên gây VPLQTM là vi khuẩn Gram âm chiếm 90%, trong đó các vi khuẩn gặp phổ biến là *E. coli* (28%), *P. aeruginosa* (16%), *A. baumannii* (10%)³². Báo cáo năm 2017 tại BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương chỉ ra 3 căn nguyên hàng đầu gây VPLQTM tại BV

này là *A. baumannii* (29,7%), *K. pneumoniae* (24,1%), *P. aeruginosa* (22,2%)²³. Tại khu vực phía nam, nghiên cứu về đặc điểm VPLQTM tại khoa Sản sóc đặc biệt của BV Chợ Rẫy chỉ ra các căn nguyên thường gặp là *A. baumannii* (61%), *P. aeruginosa* (11,7%), *S. aureus* (11,7%), *Klebsiella spp* (10,4%) và *E. coli* (5,2%)⁵. Báo cáo năm 2016 tại khoa HSTC, BV Nguyễn Tri Phương ghi nhận, căn nguyên hàng đầu thường gặp là *A. baumannii* (67,8%), tiếp đến là *S. aureus* (8,5%), *P. aeruginosa* (5,1%)³³. Ở nhóm BN cao tuổi mắc VPLQTM tại BV Thống Nhất, báo cáo năm 2018 cho thấy, *A. baumannii* chiếm 67,7% các căn nguyên gây bệnh, trong đó có nhiều trường hợp nhiễm *A. baumannii* phối hợp với các căn nguyên vi sinh vật khác³⁴. Nghiên cứu tại BV Đa khoa thành phố Cần Thơ cũng chỉ ra, căn nguyên gặp hàng đầu là *A. baumannii*, chiếm 25,4%, tiếp đến là *K. pneumoniae* (19,2%) và *S. aureus* (18,1%)⁶. Báo cáo của Phạm Ngọc Trung chỉ ra tại BV An Giang, căn nguyên vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae* chiếm đa số (52%)³⁵.

Tóm lại, qua các báo cáo trên có thể thấy, căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM ở Việt Nam cũng tương tự ở các nước đang phát triển, có mức thu nhập thấp và trung bình, đó là các vi khuẩn Gram âm chiếm ưu thế. Đáng chú ý, trên 50% BN có căn nguyên phân lập được là ít nhất 1 trong 3 vi khuẩn được WHO coi là “3 căn nguyên hàng đầu quan trọng”: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, trong đó xác định xu hướng nổi trội lên của *A. baumannii* như là căn nguyên hàng đầu gây VPLQTM tại các cơ sở y tế. Tuy nhiên, từng cơ sở y tế vẫn phải định kỳ xác định căn nguyên vi khuẩn thường gặp ở đơn vị mình để có thể cá thể hóa chiến lược điều trị và dự phòng phù hợp.

1.2.5. Đặc điểm kháng kháng sinh của một số vi khuẩn thường gặp gây viêm phổi liên quan thở máy

Đề kháng kháng sinh được định nghĩa là hiện tượng vi khuẩn vẫn phát triển được trong môi trường kháng sinh ở một nồng độ đã từng nhạy cảm. Các

mức độ KKS được biểu thị bằng các khái niệm: đa kháng thuốc (MDR – Multidrug resistance) là những chủng vi khuẩn kháng với đại diện 3 hoặc nhiều nhóm kháng sinh được thử; siêu kháng thuốc (XDR – Extensive drug resistance) là những chủng vi khuẩn đã kháng với tất cả, trừ 1 hoặc 2 nhóm kháng sinh còn tác dụng; toàn kháng thuốc (PDR – Pandrug resistance) là những chủng vi khuẩn kháng với tất cả các nhóm kháng sinh hiện có³⁶. Phân loại trên tùy thuộc vào độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh được thử nên sẽ thay đổi tùy theo ngưỡng nhạy cảm được áp dụng tại từng cơ sở y tế. Hiện nay, có hai bộ tiêu chuẩn về ngưỡng KKS được sử dụng phổ biến là CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) của Hoa Kỳ và EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) của Châu Âu.

Báo cáo từ các nghiên cứu trên khắp thế giới đang chỉ ra xu hướng ngày càng giảm tác động hiệu quả của kháng sinh trên các chủng vi khuẩn. Các kháng sinh “thế hệ một” gần như không được lựa chọn trong điều trị nhiễm trùng. Các kháng sinh thế hệ mới, đắt tiền, thậm chí một số kháng sinh thuộc nhóm “lựa chọn cuối cùng” cũng đang dần mất hiệu lực. Tình hình KKS của các vi khuẩn có thể khác biệt tại các quốc gia, vùng lãnh thổ khác nhau và phản ánh khách quan về mô hình các bệnh truyền nhiễm cũng như thực trạng sử dụng kháng sinh tại các nơi này. Tỷ lệ KKS gia tăng như hiện nay thực sự là hiểm họa đối với hiệu quả của các liệu pháp điều trị.

Đặc điểm kháng kháng sinh của A. baumannii

A. baumannii là vi khuẩn Gram âm, đa hình (hình cầu khuẩn hoặc cầu trực khuẩn), rất dễ nhầm lẫn với các vi khuẩn thuộc chi *Neisseria*, có đặc tính sinh học đặc biệt, có thể sống được ở cả môi trường khô ráo lẫn ẩm ướt. Các cơ chế đề kháng phổ biến của *A. baumannii* được nhắc đến là: (1) thay đổi vị trí đích tác động, (2) đột biến mất kênh porin không cho kháng sinh qua màng vào bên trong vi khuẩn, hoặc bất hoạt kháng sinh qua các bơm đẩy kháng sinh ra ngoài,

(3) sản sinh ra các enzyme phá huỷ kháng sinh, (4) hình thành biofilm. Báo cáo mới đây năm 2018 đánh giá tình hình đề kháng kháng sinh của *A. baumannii* trên qui mô toàn cầu đã chỉ ra những thực trạng hết sức đáng lo ngại. Tại hầu hết các quốc gia trên thế giới, trên 50% các chủng vi khuẩn này đã kháng với hầu hết các kháng sinh thế hệ mới như ceftazidime (75,2%-91,5%), cefepime (65,4%-88,2%), imipenem (53,8%-76,8%), meropenem (55,7%-82,7%). Tigecycline, kháng sinh được coi như một trong những phương sách cuối cùng để đối phó với các chủng *A. baumannii* đa kháng, mới được đưa vào sử dụng trong khoảng 10 năm trở lại đây, nhưng cũng đã ghi nhận tỷ lệ đề kháng ngày càng gia tăng (14,4%-15%). Colistin, vũ khí cuối cùng để điều trị *A. baumannii* đa kháng, còn tương đối nhạy cảm, nhưng cũng đã ghi nhận một tỷ lệ đề kháng nhỏ (1,3%-1,4%). 56,9% - 80,4% các chủng *A. baumannii* phân lập được là vi khuẩn đa kháng thuốc³⁷. Bên cạnh việc kháng với nhiều kháng sinh, tỷ lệ đề kháng của vi khuẩn này với mỗi kháng sinh cũng gia tăng nhanh theo thời gian. Phân tích tổng hợp dữ liệu về kháng imipenem của *A. baumannii* qua 2 giai đoạn 2006-2016 và 2011-2016 cho thấy ở giai đoạn 2011-2016, tỷ lệ đề kháng tăng cao rõ rệt so với giai đoạn trước³⁷. Điều này đặt ra nhu cầu cấp thiết phải có các biện pháp hữu hiệu để ngăn chặn tình trạng KKS ngày càng nghiêm trọng của vi khuẩn này.

Đặc điểm kháng kháng sinh của P. aeruginosa

P. aeruginosa là căn nguyên nổi tiếng khó kiểm soát bằng kháng sinh và các chất sát khuẩn. Vấn đề kháng thuốc của vi khuẩn này được giải thích là do sự phối hợp của các cơ chế sau: (1) đề kháng nội tại của vi khuẩn do khả năng thẩm thấu kém của màng tế bào vi khuẩn, (2) đặc tính về mặt di truyền giúp bộc lộ đồng thời hàng loạt gen kháng thuốc, (3) đột biến các gen chromosomal dẫn đến sự thay đổi các gen kháng thuốc, (4) vi khuẩn thu nhận gen kháng thuốc từ các chủng vi khuẩn khác thông qua plasmid, transposons và bacteriophages.

Theo báo cáo năm 2012 của Trung tâm kiểm soát dịch bệnh Hoa Kỳ (US CDC), ước tính tại Mỹ có khoảng 51.000 trường hợp NKBV do *P. aeruginosa* mỗi năm, trong đó 6.000 trường hợp là nhiễm *P. aeruginosa* đa kháng³⁸. Tại các quốc gia Châu Âu, tỷ lệ vi khuẩn kháng aminoglycosides, ceftazidime, fluoroquinolones, piperacillin/tazobactam và carbapenems được báo cáo ở mức cao, trong đó kháng carbapenems trên 10% và có 14% có đề kháng với ít nhất 3 nhóm kháng sinh²⁶. Các chủng *P. aeruginosa* đa kháng thuốc chiếm tỷ lệ cao nhất là ở các chủng phân lập được từ đường hô hấp dưới và thấp nhất ở các chủng từ đường hô hấp trên.

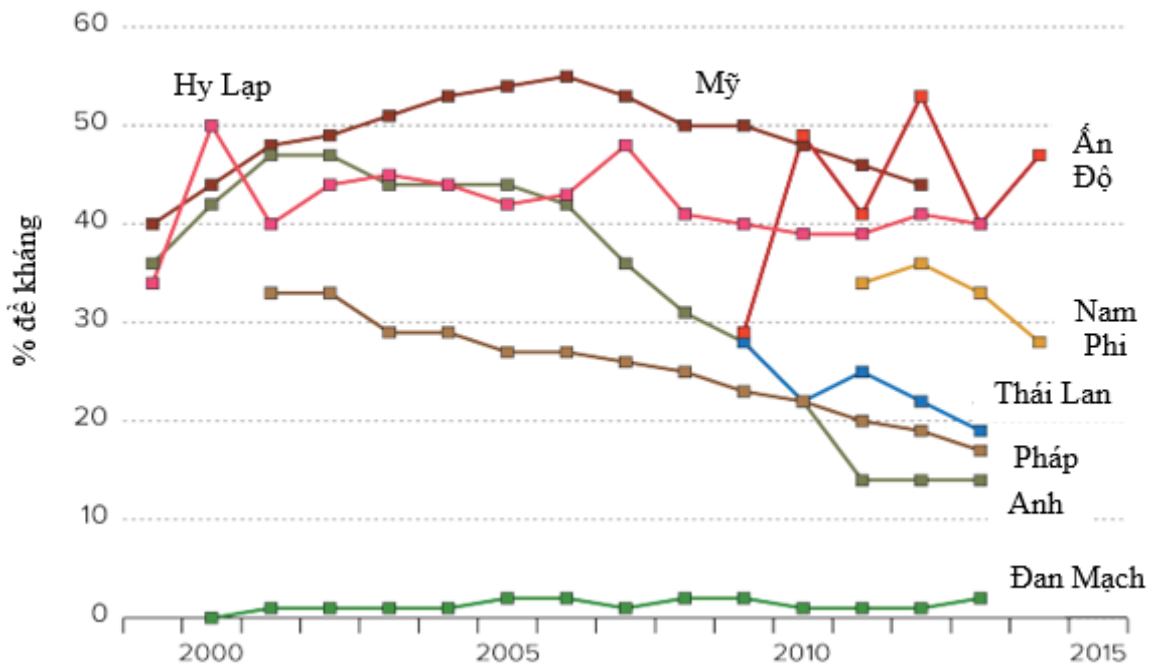
Đặc điểm kháng kháng sinh của E. coli và K. pneumonia

Báo cáo gần đây của WHO về tình hình đề kháng kháng sinh của các vi khuẩn trên phạm vi toàn cầu đã liệt kê *E. coli*, *K. pneumonia* và *S. aureus* là ba căn nguyên đáng quan ngại nhất, vừa có khả năng gây nhiễm khuẩn tại BV, vừa có khả năng gây bệnh tại cộng đồng³⁹. Trên 50% các chủng *E. coli* phân lập được tại 5 trong tổng số 6 khu vực lãnh thổ theo phân chia của WHO đã đề kháng với fluoroquinolones và cephalosporins thế hệ 3. Khoảng 30% các chủng *K. pneumonia* phân lập được tại hầu hết các quốc gia thành viên của WHO đã đề kháng với cephalosporins thế hệ 3. Tỷ lệ này thậm chí còn lên tới 60% tại một số khu vực nhất định³⁹. Tại Châu Âu, báo cáo năm 2014 cho thấy, 17 trong tổng số 22 quốc gia có tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs là 85-100% và 13 trong tổng số 21 quốc gia có tỷ lệ *K. pneumonia* sinh ESBLs cũng tương tự⁴⁰. Tại Châu Á, các chủng *Enterobacteriaceae* sinh ESBLs cũng là vấn đề đáng lo ngại và ngày càng gia tăng. Báo cáo tại 11 quốc gia Châu Á trong thời gian 2009-2010 ghi nhận 28% (từ 26%-50%) các chủng *Enterobacteriaceae* phân lập được ở đường tiết niệu có sinh ESBLs và đề kháng với các kháng sinh cephalosporins thế hệ 3 và 4⁴⁰. Bên cạnh việc sinh ESBLs, các chủng *Enterobacteriaceae* còn mang các gen mã hoá các enzyme carbapenemase như: KPC, NDM, VIM, IMP, OXA v.v., nằm trên

plasmid hoặc các transposon của vi khuẩn nên rất dễ lan truyền theo cả phương thức lây truyền ngang (từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác) và phương thức lây truyền dọc (từ thế hệ này sang thế hệ khác).

Đặc điểm kháng kháng sinh của S. aureus

S. aureus là một tác nhân gây ra bệnh cảnh lâm sàng đa dạng, từ nhiễm trùng da tương đối nhẹ cho đến các nhiễm trùng nặng, đe dọa tính mạng như viêm nội tâm mạc, viêm phổi, nhiễm trùng huyết và là một trong những căn nguyên quan trọng gây VPBV và VPLQTM. *S. aureus* kháng methicilin (MRSA) là một vấn đề y tế toàn cầu và là một thách thức trong điều trị.



Biểu đồ 1. 2. Tỷ lệ các chủng *S. aureus* kháng methicilin (MRSA) tại một số quốc gia trong giai đoạn 1999-2014⁴⁰

Tại Châu Âu và Mỹ, giám sát trong 8 năm (2007-2015) chỉ ra tỷ lệ nhiễm MRSA giảm xuống, từ 22-18% (ở Châu Âu) và 53-44% (ở Mỹ) mặc dù mức độ giảm còn chậm⁴⁰. Tỷ lệ MRSA tại Canada cũng giảm xuống, từ 21-16% kể từ năm 2009, đặc biệt giảm nhiều trong BV nhưng vẫn còn cao tại cộng đồng. Tại Thái Lan, báo cáo cho thấy tỷ lệ mắc MRSA cũng giảm từ 28% năm 2009

xuống 19% năm 2013. Tuy nhiên, bên cạnh xu hướng giảm tại một số quốc gia thì ở những nơi khác lại ghi nhận sự gia tăng của các chủng MRSA. Cụ thể, tại Úc, tỷ lệ nhiễm MRSA tăng từ 12% năm 2000 lên 19% năm 2013. Tại Ấn Độ, MRSA tăng từ 29% năm 2009 lên tới 47% chỉ sau 5 năm (năm 2014) ⁴⁰.

1.3. Kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

1.3.1. Thời gian nằm viện của bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

Nhìn chung, các nghiên cứu đều cho thấy BN mắc VPLQTM có thời gian thở máy, thời gian nằm tại khoa HSTC và thời gian nằm viện dài hơn so với những BN không mắc VPLQTM. Một nghiên cứu tổng hợp 9080 BN thở máy trên 24h tại các khoa HSTC ở Mỹ cho thấy BN VPLQTM có thời gian thở máy dài hơn ($14,3 \pm 15,5$ ngày so với $4,7 \pm 7,0$ ngày, $p < 0,001$), thời gian nằm tại khoa HSTC dài hơn ($11,7 \pm 11,0$ ngày so với $5,6 \pm 6,1$ ngày, $p < 0,001$) và thời gian nằm viện dài hơn ($25,5 \pm 22,8$ ngày so với $14,0 \pm 14,6$ ngày, $p < 0,001$) so với nhóm chứng ⁴¹. Một báo cáo về VPLQTM tại khoa HSTC ở Hy Lạp cũng ghi nhận thời gian thở máy của các BN VPLQTM là $17,4 \pm 10$ ngày, dài hơn có ý nghĩa so với nhóm không mắc VPLQTM là $5,7 \pm 2,4$ ngày (95% CI: 4,8–22,9; $p < 0,001$) và thời gian nằm tại khoa HSTC là $20,1 \pm 10$ ngày, dài hơn có ý nghĩa so với nhóm không mắc VPLQTM là $7,9 \pm 2,7$ ngày (95% CI: 6,8–24,9; $p < 0,0001$) ⁴². Nghiên cứu cũng chỉ ra, tỷ lệ mắc VPLQTM sẽ tăng từ 5% ở những BN thở máy 1 ngày lên 65% ở những BN thở máy 30 ngày ⁴². Về mặt cơ chế bệnh sinh, đường thở nhân tạo được thiết lập bằng thở máy làm thay đổi chức năng bảo vệ niêm mạc của đường thở bình thường, làm suy yếu khả năng nuốt và khả năng loại bỏ chất nhầy của lông mao. Vi khuẩn dễ dàng xâm nhập trực tiếp vào đường hô hấp dưới hoặc đi qua khe giữa thành ống NKQ và đường thở dẫn đến nhiễm trùng đường hô hấp dưới. Ngoài ra, thở máy kéo dài cũng làm tăng nguy cơ nhiễm trùng từ các thiết bị hỗ trợ như máy tạo ẩm, sonde hút đờm hỏ,... những nơi có thể là ổ chứa các vi khuẩn gây bệnh.

Việc nhiễm trùng ở những BN thở máy chính là một trong các nguyên nhân làm kéo dài thời gian BN cần thở máy, cần nằm tại khoa HSTC và cần nằm viện lâu hơn.

1.3.2. Điều trị kháng sinh ở bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

Việc điều trị kháng sinh ban đầu cho BN VPLQTM đều dựa trên lựa chọn kháng sinh theo kinh nghiệm, cần căn cứ vào nhiều yếu tố như căn nguyên vi sinh vật gây VPLQTM thường gặp tại cơ sở điều trị, tình trạng bệnh lý nền, tiền sử sử dụng kháng sinh, nguy cơ mang vi khuẩn đa kháng thuốc từ trước của BN,...Việc lựa chọn kháng sinh ban đầu không phù hợp sẽ làm gia tăng nguy cơ tử vong ở những BN này. Thách thức lớn đối với các bác sỹ điều trị là lựa chọn được kháng sinh có hiệu lực tiêu diệt vi khuẩn ngay nhưng lại không làm gia tăng tình trạng lạm dụng các kháng sinh phổ rộng. Để giải quyết được thách thức này thì cần có sự hỗ trợ của các kỹ thuật xét nghiệm, giúp nhanh chóng xác định được căn nguyên gây bệnh, đặc tính KKS của những căn nguyên này cũng như sinh khả dụng của các thuốc được sử dụng.

Kháng sinh nhóm β -lactam được coi là nhóm thuốc cơ bản được sử dụng trong điều trị VPLQTM¹. Khi sử dụng nhóm kháng sinh này, hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn sẽ được tối ưu khi nồng độ thuốc trong máu được duy trì cao gấp từ 4 lần trở lên nồng độ ức chế tối thiểu của vi khuẩn do đó cần truyền duy trì kéo dài các thuốc này để duy trì được nồng độ thuốc. Các kháng sinh thường được phối hợp sử dụng cùng nhóm β -lactam trong điều trị BN VPLQTM là nhóm aminoglycosides hoặc fluoroquinolones. Bên cạnh đó, trước thực trạng xuất hiện ngày càng nhiều vi khuẩn sinh ESBL thì nhóm carbapenem đang trở thành lựa chọn đầu tay trong điều trị VPLQTM ở những BN có nguy cơ nhiễm vi khuẩn sinh ESBL. Ngoài ra, các thuốc kháng sinh mới có sự kết hợp các hoạt chất kháng β -lactamase như ceftolozane/tazobactam, ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam cũng bắt đầu được sử dụng khá phổ biến¹. Đối với

các vi khuẩn Gram âm kháng carbapenem, colistin được ưu tiên lựa chọn nhưng thường không phải là kháng sinh được chỉ định ban đầu nếu không có các bằng chứng rõ ràng. Hiện nay, tình trạng vi khuẩn kháng colistin đã bắt đầu ghi nhận, dù với tỷ lệ thấp dưới 10% nhưng có xu hướng ngày càng gia tăng⁴³. Ở những cơ sở y tế ghi nhận tỷ lệ MRSA từ 10-20% thì kháng sinh được lựa chọn ban đầu nên bao gồm vancomycin hoặc linezolid. Các báo cáo cho biết khi nồng độ ức chế tối thiểu với vancomycin cao hơn 1,5 mg/L thì nguy cơ tử vong của viêm phổi do MRSA sẽ tăng lên⁴⁴. Hơn nữa, ở những BN nặng, rất khó để đạt được nồng độ thuốc vancomycin theo mục tiêu mà không làm gia tăng nguy cơ độc với thận. Do đó, linezolid là kháng sinh được ưu tiên lựa chọn ở những BN có tổn thương thận hoặc tại những cơ sở mà nồng độ ức chế tối thiểu của vi khuẩn với vancomycin trên 1,5 mg/L⁴⁴. Bên cạnh việc sử dụng kháng sinh điều trị VPLQTM theo cách truyền thống bằng đường tiêm truyền, liệu pháp kháng sinh dạng khí dung cũng đang được áp dụng do đường dùng này cho phép đạt được nồng độ kháng sinh rất cao tại chỗ¹. Một khó khăn nữa khi điều trị BN nặng tại các khoa HSTC là BN thường có độ thanh thải và thể tích phân phối cao dẫn đến nguy cơ giảm nồng độ kháng sinh trong máu. Do đó, liều lượng được sử dụng để điều trị những BN nặng thường cao hơn liều lượng thường dùng được khuyến cáo và sẽ dễ dẫn đến nguy cơ gây độc với gan, thận, hệ thần kinh trung ương,...

Hầu hết các hướng dẫn về điều trị VPLQTM trên thế giới hiện nay đều khuyến cáo thời gian sử dụng kháng sinh cho BN là 7 ngày và thời gian này có thể giảm xuống khi kết hợp với việc theo dõi đánh giá procalcitonin hoặc đánh giá sự ổn định của các thông số máy thở ($PEEP \leq 5$ cm H₂O và $FiO_2 \leq 40\%$) trong vòng 48 giờ kể từ khi bắt đầu sử dụng kháng sinh¹. Trong trường hợp BN đáp ứng kém, cần xem lại chẩn đoán bệnh đã chính xác chưa, tìm kiếm các ổ mủ có thể dẫn lưu ra ngoài, tìm căn nguyên gây bệnh phù hợp.

1.3.3. Tình hình tử vong ở bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

Mặc dù tử vong do mọi nguyên nhân liên quan đến VPLQTM đã được báo cáo là cao tới 50%, vẫn còn nhiều tranh cãi về mức độ mà VPLQTM góp phần gây tử vong ở BN nằm HSTC². Nhiều phương pháp trong nhiều nghiên cứu khác nhau đã được sử dụng để tính toán tỷ lệ tử vong do VPLQTM. Các nghiên cứu quan sát thuần tập đưa ra những kết quả rất khác biệt nhau, dao động từ 14-78%, thường được lý giải do quần thể nghiên cứu không đồng nhất và hạn chế của nghiên cứu là hồi cứu chứ không phải tiền cứu⁷. Ngoài ra, do nguy cơ mắc VPLQTM là không giống nhau trong toàn bộ quá trình thở máy (thường cao nhất trong vòng 10 ngày đầu tiên thở máy) nên dễ dẫn đến sai số khi đánh giá tỷ lệ tử vong vì những BN nặng nhất sẽ có thời gian nằm viện ngắn do họ đã sớm tử vong². Chính vì vậy, các phương pháp thống kê phức tạp hơn đã được sử dụng, chẳng hạn như các mô hình đánh giá nguy cơ đa dạng và cạnh tranh, để ước tính tỷ lệ tử vong do VPLQTM. Một phân tích nguy cơ sống còn cạnh tranh, coi việc xuất viện khỏi khoa HSTC là nguy cơ cạnh tranh với tử vong tại khoa HSTC đánh giá 4479 BN được điều trị tại khoa HSTC của các BV ở Pháp cho thấy tỷ lệ tử vong tại khoa HSTC do VPLQTM gây ra là rất thấp, khoảng 1% vào ngày 30 và 1,5% vào ngày 60⁴⁵. Theo báo cáo của tác giả Forel JM, ở nhóm BN ARDS, tỷ lệ tử vong thô ở những người mắc VPLQTM lên tới 41,8%, cao hơn hẳn so với 30,8% ở nhóm không mắc VPLQTM. Tuy nhiên, sau khi hiệu chỉnh các yếu tố gây nhiễu thì VPLQTM không còn làm tăng nguy cơ tử vong ở BN⁴⁶. Một cách tiếp cận khác để hạn chế nguy cơ sai lệch liên quan đến sự có mặt của các yếu tố gây nhiễu là sử dụng các thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng để đánh giá tác động của VPLQTM đến tỷ lệ tử vong. Dựa trên dữ liệu tổng hợp từ 58 nghiên cứu ngẫu nhiên về phòng ngừa VPLQTM, tỷ lệ tử vong do VPLQTM ước tính là 9%². Một nghiên cứu phân tích tổng hợp thu thập dữ liệu từ 6284 BN trong 24 thử nghiệm lâm sàng

về VPLQTM cho thấy tỷ lệ tử vong ước tính do nguyên nhân VPLQTM là 13%, với tỷ lệ tử vong cao hơn ở BN tại các khu HSTC phẫu thuật ngoại khoa và ở BN có điểm APACHE II mức độ trung bình đến nghiêm trọng khi nhập viện và gần như bằng 0 ở nhóm BN bị chấn thương hoặc BN có điểm APACHE II mức độ nhẹ khi nhập viện⁴⁷. Căn nguyên vi khuẩn đa kháng thuốc có thể làm gia tăng tỷ lệ tử vong do VPLQTM nhưng đây vẫn còn là vấn đề đang tranh luận². Tóm lại, hầu hết các nghiên cứu đều đưa ra kết luận VPLQTM làm kéo dài thời gian thở máy, thời gian nằm tại khoa HSTC và thời gian nằm viện nhưng tử vong chủ yếu do các bệnh lý nền và tình trạng nặng của BN ngay tại thời điểm nhập viện. Các nghiên cứu trong tương lai nên tập trung vào các nhóm BN thuần nhất hơn để làm sáng tỏ hơn vai trò cụ thể của các bệnh lý nền, loại và số lượng cơ quan bị suy cũng như những vi sinh vật gây bệnh và tính chất kháng thuốc của chúng sẽ tác động như thế nào đối với nguy cơ tử vong của VPLQTM.

1.3.4. Yếu tố tiên lượng tử vong ở bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

Việc xây dựng được các mô hình tiên lượng tử vong chính xác ở BN VPLQTM sẽ hỗ trợ các bác sỹ lâm sàng rất nhiều trong việc đưa ra các quyết định điều trị cho BN và dự đoán được kết cục điều trị. Các mô hình được kỳ vọng sẽ xây dựng dựa trên các biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm cận lâm sàng có thể dễ dàng đánh giá và tiếp cận được để hỗ trợ cho việc tiên lượng BN thuận tiện chứ không mất quá nhiều thời gian, công sức để đánh giá khi mô hình quá phức tạp. Một nghiên cứu phân tích tổng hợp về các mô hình tiên lượng tử vong ở BN VPLQTM chỉ ra 7 mô hình thường được sử dụng, bao gồm APACHE II, SAPS II, SOFA, IMBP-10, VAP PIRO, CPIS, APACHE III⁴⁸. Đây đều là các thang điểm thường được sử dụng tại các khoa HSTC để đánh giá tình trạng nặng của BN chứ không chỉ dành riêng cho BN VPLQTM và đương nhiên điểm số càng cao thì nguy cơ tử vong của BN càng cao. Một nghiên cứu cho thấy

điểm APACHE II > 21 ($p=0.016$), điểm SOFA > 6 ($p<0.001$) tại thời điểm nhập viện là yếu tố tiên lượng tử vong và SOFA > 6 ($p<0.001$; OR (95%CI): 1,4 (1,2–1,6) tại thời điểm chẩn đoán VPLQTM là yếu tố độc lập tiên lượng tử vong ở BN VPLQTM⁴⁹. Bên cạnh các thang điểm thường được dùng để đánh giá BN nặng tại khoa HSTC, một số chỉ số xét nghiệm cũng được coi là yếu tố có giá trị tiên lượng tử vong ở BN VPLQTM. Theo báo cáo của tác giả Tanrıverdi Hakan, nồng độ procalcitonin không khác biệt ở nhóm sống và nhóm tử vong tại ngày được chẩn đoán VPLQTM. Tuy nhiên, nồng độ procalcitonin cao hơn có ý nghĩa ở ngày 3 và ngày 7 ở nhóm tử vong so với nhóm sống và procalcitonin > 1 ng/mL ở ngày 3 là yếu tố độc lập có giá trị tiên lượng tử vong (odds ratio = 22.6)⁵⁰. Ngoài ra, nhiều chỉ số khác cũng được các nhà nghiên cứu đánh giá về khả năng tiên lượng tử vong ở VPLQTM nhưng các kết quả chưa thống nhất. Đánh giá 120 ca bệnh VPLQTM tại một BV tuyến cuối ở Brazil, tác giả Souza-Oliveira nhận định, việc nhiễm các vi khuẩn đa kháng thuốc và liệu pháp xuống thang khi điều trị kháng sinh không ảnh hưởng đến tỷ lệ tử vong nhưng dùng liều tải kháng sinh không đúng và không điều chỉnh liều kháng sinh theo chức năng thận lại là những yếu tố nguy cơ gây tử vong⁵¹. Nghiên cứu trên 337 BN VPLQTM tại Thái Lan chỉ ra, việc nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, SOFA > 5, SAPS II >45, có sốc nhiễm khuẩn và sử dụng kháng sinh ban đầu không đúng là những yếu tố tiên lượng tử vong⁴⁹.

1.4. Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong nghiên cứu nguồn lây truyền của vi khuẩn trong bệnh viện

1.4.1. Đại cương về kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

a) Khái niệm

Giải trình tự gen (giải trình tự DNA) là quá trình xác định trình tự các bazơ nucleotide (As, Ts, Cs và Gs) trong một đoạn phân tử DNA. Việc giải trình tự toàn bộ hệ gen nhất là của các sinh vật có số lượng DNA lớn là cực kỳ

phức tạp. Việc này đòi hỏi cắt phân tử DNA hệ gen thành nhiều mảnh nhỏ hơn, sau đó giải trình tự và sắp xếp các mảnh nhỏ này thành một chuỗi dài hơn hoặc toàn bộ một nhiễm sắc thể. Vì vậy, trước đây việc giải trình tự toàn bộ hệ gen mất rất nhiều thời gian và công sức. Tuy nhiên, hiện nay, nhờ có các phương pháp mới đã được phát triển trong hai thập kỷ qua, việc giải trình tự toàn bộ hệ gen diễn ra nhanh chóng và rất chính xác, chi phí cho giải trình tự toàn bộ hệ gen cũng rẻ hơn.

Dự án Giải trình tự hệ gen người được hoàn thiện vào năm 2003, sau 13 năm thực hiện, với sự phối hợp của 15 quốc gia và tiêu tốn 3 tỷ USD. Hệ gen người gồm 13 tập, mỗi tập dày tương đương 1000 trang sách. Sự ra mắt của nền tảng giải trình tự hiệu năng cao đầu tiên vào giữa những năm 2000 đã làm giảm 50.000 lần giá thành của giải trình tự gen so với chi phí trước đó của dự án Giải trình tự hệ gen người và được đặt tên là Giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing – NGS).

Trong suốt hơn một thập kỷ qua, các kỹ thuật NGS vẫn tiếp tục phát triển, tăng lưu lượng xử lý lên 100 đến 1000 lần, đóng góp vào những đổi mới mang tính cách mạng để đẩy lùi tính phức tạp của hệ gen. Những tiến bộ này mang lại phép đọc trình tự với độ dài có thể bằng cả hệ gen (hàng tỷ cặp base), đồng thời giá thành cho một lần giải trình tự hệ gen người giảm chỉ còn dưới 1000 USD. Vì thế, giải trình tự không chỉ bị bó hẹp trong các nghiên cứu cơ bản mà còn được ứng dụng trong thực hành lâm sàng thường ngày.

Kỹ thuật NGS giúp xác định sơ bộ trình tự bộ gen của vi khuẩn trong vòng 1 đến 2 ngày kể từ khi vi khuẩn được phân lập với giá thành hợp lý, phù hợp với thực hành lâm sàng. Những ưu điểm vượt trội của NGS so với kỹ thuật giải trình tự trước đây làm cho nó trở thành phương pháp có tiềm năng mạnh mẽ trong nghiên cứu dịch tễ học các bệnh truyền nhiễm. Một ưu thế quan trọng trong ứng dụng lâm sàng của NGS so với các phương pháp cũ là có thể được

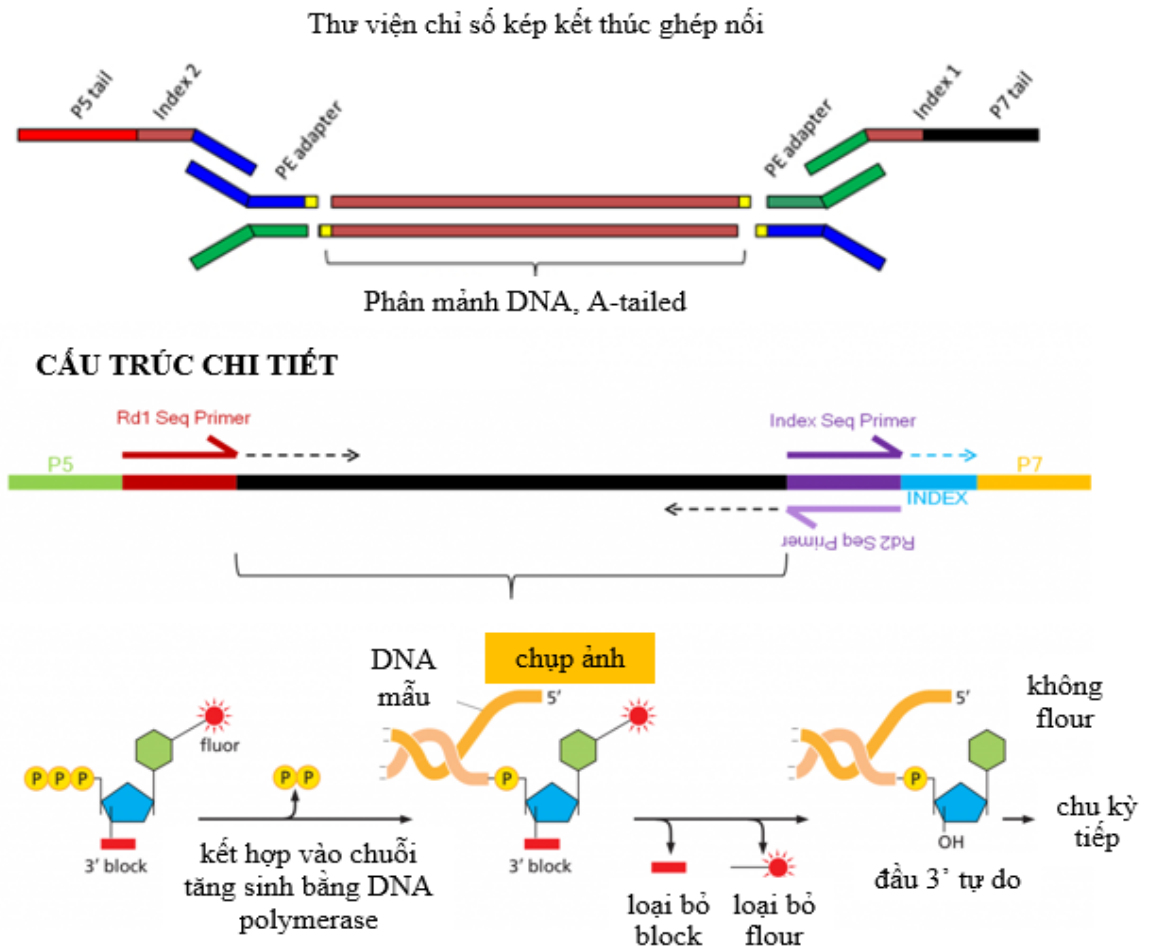
áp dụng rộng rãi cho rất nhiều tác nhân vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Điều này được chứng minh ở nhiều nghiên cứu trong những năm gần đây.

Các kỹ thuật giải trình tự gen hiện nay bao gồm 4 thế hệ, từ phương pháp giải trình tự Sanger của thế hệ 1 cổ điển đến phương pháp giải trình tự tức thời dựa trên tín hiệu điện phân tử (Oxford Nanopore DNA Sequencing Technology) của thế hệ 4 đang được phát triển để hoàn thiện. Các phương pháp giải trình tự gen từ thế hệ thứ hai trở đi được gọi chung là kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới. Phương pháp giải trình tự của Illumina được sử dụng trong nghiên cứu này thuộc phương pháp giải trình tự gen thế hệ thứ 2.

b) Phương pháp giải trình tự của Illumina

Công nghệ sắp xếp Illumina, sắp xếp theo tổng hợp (Sequencing by Synthesis, SBS), là công nghệ sắp xếp theo trình tự thế hệ mới được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới, tạo ra hơn 90% dữ liệu trình tự của thế giới. Giải trình tự bằng tổng hợp SBS sử dụng 4 nucleotide đánh dấu huỳnh quang để giải trình tự hàng chục triệu cluster đồng thời trên bề mặt flow-cell. Trong mỗi chu trình giải trình tự, một deoxynucleoside triphosphate đánh dấu (dNTP) được thêm vào chuỗi acid nucleic. Nhãn huỳnh quang của nucleotide đóng vai trò như một khóa dừng phản ứng polymer hóa, do đó sau khi mỗi dNTP được tích hợp, chất màu huỳnh quang được ghi lại để xác định nucleotide và sau đó bị cắt bỏ để tổng hợp nucleotide tiếp theo. Vì cả 4 loại dNTP gắn khóa dừng tổng hợp thuận nghịch có mặt đồng thời dưới dạng đơn phân tử, sự cạnh tranh ngẫu nhiên giúp giảm thiểu việc tổng hợp mất cân đối. Việc xác định các base dựa vào cường độ tín hiệu đo được trong mỗi chu trình, giúp giảm thiểu các sai số thô so với công nghệ khác. Kết quả cuối cùng là trình tự được đọc từng base với độ chính xác cao, loại bỏ được các lỗi do đặc thù trình tự, cho phép quá trình giải trình tự mạnh mẽ trên toàn bộ genome, bao gồm các trình tự lặp lại. Quy trình thực hiện như sau:

- Bước 1. Tạo thư viện
- Bước 2. Polony-PCR tạo các cluster DNA
- Bước 3. Giải trình tự DNA trong từng cluster
- Bước 4: Ráp nối các đoạn trình tự ghi nhận được và xử lý kết quả



Hình 1. 2. Nguyên lý giải trình tự của Illumina

Các ưu điểm chính của phương pháp Illumina là:

- + 4 loại nucleotide được gắn huỳnh quang khác nhau nên có thể phân tích được các trình tự của 1 loại nucleotide lặp lại liên tục.
- + Thư viện DNA có thể được mã hóa và tách riêng trong suốt quá trình phân tích kết quả.

- + Cộng đồng các nhà khoa học sử dụng hệ thống này phổ biến hơn Torrent (Ion semiconductor) sequencing.

Tuy nhiên, phương pháp cũng có các nhược điểm sau:

- + Giá thành hóa chất vẫn cao so với Sanger và Ion semiconductor.
- + Chiều dài đọc chỉ khoảng 200-250 (độ chính xác 99% tại base thứ 250 và cao hơn ở các base phía trước).
- + Thời gian lâu: 23 giờ để phân tích hệ gen người.

1.4.2. Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong xác định sự lây truyền của vi khuẩn trong bệnh viện

NKBV là nguyên nhân quan trọng tạo ra gánh nặng bệnh tật và tử vong cho các BN điều trị nội trú trong BV, là gánh nặng kinh tế lớn cho hệ thống chăm sóc sức khỏe. Các nghiên cứu cho thấy khoảng 20% các trường hợp nhiễm khuẩn BV có thể phòng ngừa được và thực tế tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn BV ở Anh đã giảm xuống 6,4% vào năm 2011 sau khi thực hiện các biện pháp can thiệp so với tỷ lệ trước đó là 9,2% vào những năm 1990⁵². Các BV thường xuyên đối mặt với sự du nhập và lây truyền của các căn nguyên gây NKBV do việc khó khăn trong triển khai các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn trong thực hành lâm sàng, không xác định được đường lây truyền của dịch bệnh trong cộng đồng, du nhập của các căn nguyên gây bệnh đề kháng với nhiều kháng sinh từ các vùng dịch tễ có lưu hành các mầm bệnh này vào BV. Việc sàng lọc, giám sát kết hợp với xác định kiểu gen ở mức độ phân tử của các vi sinh vật gây bệnh có thể giúp phát hiện một đợt bùng phát dịch bệnh trong BV. Tuy nhiên, các phương pháp điều tra dịch tễ học thông thường không đủ khả năng để chỉ ra được căn nguyên cũng như những biến động về đường lây truyền, không cung cấp kịp thời các thông tin giúp triển khai các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn hiệu quả.

Mô hình phát hiện và điều tra các vụ dịch BV hiện nay đều dựa trên sự kết hợp giữa điều tra giám sát và điều tra dịch tễ học. Khởi nguồn của việc làm này bắt đầu từ hơn 150 năm trước bởi John Snow, một bác sỹ y tế công cộng và là một trong những người sáng lập ra dịch tễ học hiện đại. John Snow được biết đến nhiều nhất với những công trình liên quan đến bệnh dịch tả, đặc biệt là cuộc điều tra về dịch tả tại Soho năm 1854. Lập bản đồ những trường hợp tử vong do bệnh tả, kết hợp với điều tra chi tiết về việc tiêu thụ nước từ một máy bơm ở Broad Street, John Snow cho rằng có liên hệ trực tiếp giữa hai yếu tố này. Điều này đặc biệt ấn tượng vì lý thuyết phổ biến về nguyên nhân gây bệnh truyền nhiễm vào thời điểm đó là do khí độc chứ không phải do vi khuẩn⁵³. Trong những thập kỷ gần đây, một loạt các phương pháp điều tra dịch tễ học phân tử như điện di xung điện trường (pulsed field gel electrophoresis), chuỗi đa locus (multi-locus sequence typing) đã được phát triển để xác định mối quan hệ phát sinh loài giữa các chủng vi khuẩn được phân lập. Mỗi kỹ thuật đều cố gắng cải tiến để tăng tốc độ, độ chính xác, khả năng tái sử dụng, sự dễ dàng trong thao tác và ưu việt hơn các phương pháp trước đó. Tuy nhiên, điểm hạn chế của những kỹ thuật này là qui trình phức tạp, thời gian thực hiện kéo dài và chưa cung cấp được những thông tin chính xác về mối liên hệ di truyền của các vi khuẩn.

Sự ra đời của kỹ thuật NGS đã thể hiện sự vượt trội hơn hầu hết các những kỹ thuật trước đó nhờ khả năng xử lý dung lượng lớn với chi phí hợp lý. Thêm vào đó, phương pháp này còn giúp dự đoán các kiểu hình đề KKS và xác định yếu tố độc lực của vi khuẩn. Dịch tễ học di truyền là công cụ hữu hiệu giúp giải quyết các vụ dịch trong BV, đôi khi giúp bác bỏ các giả thuyết trước đó về đường lây truyền của các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn BV. Cho tới nay, hầu hết các nghiên cứu dịch tễ học di truyền đều là nghiên cứu hồi cứu về các vụ dịch. Mặc dù điều này đã cung cấp những hiểu biết quan trọng về động học

đường lây truyền của các tác nhân gây bệnh nhưng thách thức đặt ra là cần phải ứng dụng trực tiếp dịch tễ học di truyền để can thiệp vào các vụ dịch đang bùng phát nhằm làm giảm thời gian và hậu quả của việc lây truyền.

Năm 2010, Pallen và cộng sự là những người đầu tiên sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để xác định đường lây truyền từ người sang người trong một vụ dịch bệnh truyền nhiễm tại BV. Nhóm nghiên cứu tiến hành giải trình tự gen của 6 chủng *A. baumannii* đa kháng từ các cụm vi khuẩn của BV năm 2008 nhằm tìm hiểu đường lây truyền giữa các BN là binh lính và BN là dân thường. Kết quả cho thấy căn nguyên của vụ dịch do *A. baumannii* kéo dài tại BV là một chủng vi khuẩn hoàn toàn mới, chưa từng gặp trong các BV ở nước Anh và cũng chưa từng được thu thập trước đây⁵⁴. Vụ dịch bắt đầu với một chủng *A. baumannii* đa kháng mới thâm nhập vào từ một BN là binh lính. Tiếp theo là các trường hợp nhiễm khuẩn thứ phát nhanh chóng xảy ra tại cùng một khoa, được phát hiện thông qua các kỹ thuật điều tra dịch tễ học phân tử thông thường. Ở tuần thứ 40 của nghiên cứu, tức là tuần thứ 80 của vụ dịch, các tác giả đã thay thế phương pháp điều tra dịch tễ học phân tử thông thường bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen. Điểm đáng chú ý là trong vòng chưa tới 1 tuần họ đã có kết quả giải trình tự gen, giúp các nhà nghiên cứu nhanh chóng kết luận là chủng vi khuẩn được phân lập có nằm trong vụ dịch hay không. Trong 102 chủng phân lập được trên lâm sàng và được giải trình tự gen, ngưỡng được đề xuất là nhỏ hơn hoặc bằng 8 nucleotide đơn lẻ khác biệt (single nucleotide variants – SNVs) trên 74 bộ gen được coi là cùng thuộc về một vụ dịch lớn đơn lẻ, bao gồm 52 chủng thu thập được BN và 10 chủng thu thập được từ mẫu môi trường. Phân tích phát sinh loài của 74 bộ gen đã xác định được 32 kiểu gen khác nhau thuộc về 7 nhóm chính. Sử dụng lập trình Python để phân tích các yếu tố bao gồm kiểu gen của vi khuẩn, khoa BN nằm điều trị, ngày kết quả xét nghiệm dương tính, nhóm tác giả đã xác định được 273 biến cố có thể lây truyền

vi khuẩn nếu chỉ sử dụng thông tin dịch tễ học đơn lẻ và 57 biến cố có thể lây truyền vi khuẩn nếu kết hợp thêm với thông tin về gen. Theo cách phân tích này, nhóm nghiên cứu đã xác định được nguồn lây nhiễm cho tất cả là xuất phát từ 10 BN. Điều tra dịch tễ học di truyền cho thấy sự lây nhiễm sớm xảy ra do tiếp xúc trong cùng khoa phòng, buồng bệnh. Đồng thời, lây nhiễm cũng xảy ra do ô nhiễm môi trường kéo dài ở một số khoa phòng cụ thể. Điều này cho thấy, cần tăng cường hoạt động khử khuẩn các khoa phòng. Kết quả phân tích cũng chỉ ra có sự lây nhiễm nghiêm trọng tại các phòng chăm sóc đặc biệt dành cho những BN bỏng. Vì vậy, nhóm kiểm soát nhiễm khuẩn cần thực hiện các biện pháp chuyên biệt nhằm vệ sinh buồng bệnh tại khu vực này. Mặc dù đã có các biện pháp tích cực nhằm vệ sinh buồng bệnh, tương chừng như đã ngăn chặn dịch bệnh hiệu quả, nhưng một chùm ca bệnh lại xuất hiện từ tuần thứ 70 trở đi. Điều tra dịch tễ học di truyền cho thấy có sự liên quan giữa ca bệnh đầu tiên của chùm ca bệnh này với một chiếc giường bị nhiễm bẩn. Điều này đặt ra yêu cầu cấp thiết phải có qui trình khử khuẩn đặc biệt cho những loại giường này. Sau khi tiến hành khử khuẩn cẩn trọng lần 2, không còn trường hợp lây truyền bệnh nào được phát hiện và vụ dịch đã kết thúc ở tuần 80⁵⁴.

Việc phân tích dịch tễ học di truyền trong thời gian thực giúp phát hiện con đường lây truyền của các vi sinh vật gây bệnh và xác định chính xác mục tiêu cần tiến hành can thiệp về kiểm soát nhiễm khuẩn. Đó có thể là giường bệnh, buồng bệnh, khu phòng mổ,... Việc xác định được đường lây truyền này là yếu tố quan trọng nhất, từ đó giúp xác định chính xác các hành động cần tiến hành nhằm ngăn chặn dịch bệnh lây lan. Điều này cho thấy tác động tức thời quan trọng của các thông tin về di truyền đối với việc dập tắt ổ dịch.

Với công trình nghiên cứu này, Pallen và cộng sự đã đưa ra một ví dụ thuyết phục cho thấy lợi ích của kỹ thuật giải trình tự gen như là một phần không thể thiếu được trong thực hành kiểm soát nhiễm khuẩn, chứng minh rằng

kỹ thuật này có thể thực hiện trong thực hành lâm sàng trong thời gian thực, giúp đề xuất các giải pháp can thiệp hiệu quả dựa trên bằng chứng nhằm ngăn chặn sự bùng phát của các dịch bệnh lớn và kéo dài trong BV. Với những tiến bộ mới và nhanh chóng trong công nghệ, nhiều kỹ thuật giải trình tự gen mới cùng với các phần mềm tin sinh học sẽ giúp giải quyết nhanh chóng các vụ dịch bệnh phức tạp với mức độ chính xác cao. NGS sẽ là công nghệ nền tảng cho hoạt động kiểm soát nhiễm khuẩn. Trong một tương lai gần, các phòng xét nghiệm của các BV sẽ được trang bị những máy giải trình tự gen cho phép xác định trình tự bộ gen của vi sinh vật gây bệnh trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng, với phương pháp phân tích tự động giúp xác định sự đề KKS hoặc xác định các bộ gen có cùng nguồn gốc di truyền, gợi ý rằng có sự lây truyền của một vụ dịch trong BV. Những dữ liệu này sẽ được cung cấp cho nhóm kiểm soát nhiễm khuẩn của BV, cho phép xử trí dịch bệnh dựa trên bằng chứng trong thời gian thực, qua đó làm giảm tình trạng NKBV.

Các thiết bị giải trình tự gen ngày càng thuận tiện và dễ sử dụng cho người dùng, các yêu cầu về kỹ thuật thực hiện cũng sẽ chỉ tương đương với những yêu cầu của kỹ thuật PCR. Điều đó có nghĩa là một số lượng lớn các phòng thí nghiệm có thể sử dụng kỹ thuật này. Thách thức đặt ra là phải xác định được khi nào và ở đâu chúng ta sẽ thực hiện kỹ thuật này. Mặc dù hiện tại, giải trình tự gen chưa được áp dụng phổ biến cho các xét nghiệm về vi sinh học nhưng rõ ràng trong nhiều trường hợp, kỹ thuật này đã chứng minh được lợi ích vượt trội của nó. Một ví dụ điển hình là việc xác định căn nguyên vi khuẩn gây bệnh trong vụ dịch *E. coli* 0104:H4 tại Đức năm 2011. Sử dụng hệ thống giải trình tự Ion Torrent PGM™, các nhà nghiên cứu đã giải được trình tự và vẽ được bản đồ quang học của 4 chủng gây dịch và 2 chủng đối chứng trong vòng 62h⁵⁵, chứng tỏ khả năng áp dụng kỹ thuật này trong thời gian thực để xử lý các ổ dịch NKBV. Một trường hợp khác khi điều tra về MRSA, kỹ thuật

giải trình tự gen đã giúp xác định nhanh chóng và chính xác căn nguyên gây dịch, đồng thời còn cung cấp thông tin về sự đề KKS của các chủng vi khuẩn này giúp bác sỹ đưa ra quyết định điều trị phù hợp cho BN⁵⁵. Mặc dù còn nhiều khó khăn, thách thức nhưng các nhà khoa học đều tin rằng việc nhanh chóng giải trình tự được toàn bộ bộ gen của vi sinh vật sẽ làm biến đổi ngành vi sinh lâm sàng và điều tra dịch tễ trong một tương lai không xa.

Tại Việt Nam, theo tìm hiểu của chúng tôi, trong lĩnh vực y học, NGS bắt đầu được sử dụng nhiều trong khoảng 5 năm trở lại đây, trong đó chủ yếu được dùng để xác định các đặc điểm sinh học phân tử và xây dựng cây phát sinh loài của các chủng vi khuẩn^{56,57}. Tuy nhiên, tính đến thời điểm hiện tại, chúng tôi chưa tìm được nghiên cứu nào sử dụng NGS để xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn trong bệnh viện. Nghiên cứu chúng tôi tiến hành với những ưu điểm của công nghệ NGS hy vọng sẽ là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam giúp đề xuất các giải pháp tăng cường điều tra dịch tễ học của vụ dịch trong bệnh viện với độ chính xác cao, trong thời gian thực, từ đó áp dụng các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn, can thiệp kịp thời, ngay lập tức và tại chỗ nhằm ngăn chặn sự bùng phát của các ổ dịch NKBV. Ngoài ra, thông tin từ các kết quả nghiên cứu sẽ giúp cho các bác sỹ lâm sàng quản lý, chăm sóc tốt hơn cho BN nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, giúp các nhà hoạch định chính sách xây dựng và phát triển các chiến lược quốc gia về giám sát tình trạng kháng thuốc trong BV và cộng đồng, giảm tối đa tác hại của vi khuẩn đa kháng thuốc lên sức khỏe và tài chính của BN và của hệ thống y tế.

1.5. Giới thiệu khái quát về địa điểm nghiên cứu

Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới trung ương được thành lập theo quyết định số 487/QĐ- TTg ngày 30/6/2006 của Thủ tướng Chính phủ về việc thành lập Viện Các bệnh Truyền nhiễm và Nhiệt đới Quốc gia nay là Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương. Căn cứ Quyết định số 5512/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của

Bộ trưởng Bộ Y tế về việc Ban hành Quy chế Tổ chức và Hoạt động của Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương, BV được xác định là BV hạng I, chuyên khoa đầu ngành về các bệnh truyền nhiễm và nhiệt đới trực thuộc Bộ Y tế. BV là tuyến cao nhất khám, chữa bệnh, phục hồi chức năng, đào tạo nhân lực y tế, triển khai ứng dụng khoa học, công nghệ, kỹ thuật hiện đại phục vụ người bệnh mắc các bệnh về truyền nhiễm và nhiệt đới trên phạm vi cả nước. Từ năm 2014, BV tổ chức hoạt động tại 2 cơ sở: Kim Chung và Giải Phóng.

Theo báo cáo kết quả hoạt động năm 2017 của BV, khoa HSTC của BV tại cơ sở Giải Phóng có 16 giường hồi sức, tiếp đón và điều trị cho 440 lượt BN với số ngày điều trị trung bình là 20 ngày, tỷ lệ BN tử vong tại khoa là 3%⁵⁸. Khoa HSTC được cấu trúc gồm 4 buồng hồi sức với 16 giường: buồng hồi sức 1 (giường 1 đến 5), buồng hồi sức 2 (giường 6 đến 8), buồng hồi sức 3 (giường 9 đến 11), buồng hồi sức 4 (giường 12 đến 16). Trong đó, buồng hồi sức 1 gồm 3 cửa ra vào và mỗi buồng hồi sức 2,3,4 có 2 cửa ra vào. Các giường hồi sức tại khoa được kê cách xa nhau tối thiểu 1,5m. Hệ thống máy thở, máy theo dõi, máy hút đờm, tủ đầu giường được bố trí cố định và riêng biệt cho mỗi giường bệnh. Khi kết thúc quá trình điều trị cho 1 BN, các máy móc, thiết bị tại khu vực xung quanh giường bệnh, phục vụ cho quá trình điều trị BN được thu gom về phòng máy, xử lý theo qui trình kiểm soát nhiễm khuẩn thường qui của BV. Sau khi hoàn thiện qui trình khử khuẩn và kiểm tra đảm bảo đủ tiêu chuẩn vận hành, các máy móc, thiết bị này sẽ được đưa tới những khu vực giường bệnh có nhu cầu để tiếp tục sử dụng.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mục tiêu 1 và 2: đối tượng nghiên cứu bao gồm những BN được chẩn đoán xác định mắc VPLQTM tại khoa HSTC, BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương, trong thời gian từ 7/2017 đến 1/2018.
- Mục tiêu 3: đối tượng nghiên cứu bao gồm bệnh phẩm (đờm, phân, nước tiểu, mủ vết thương) của các BN điều trị tại khoa HSTC (bao gồm BN VPLQTM của mục tiêu 1,2 và những BN còn lại của khoa) và bệnh phẩm môi trường khu vực quanh tất cả các giường bệnh tại khoa HSTC, BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương, trong thời gian từ 7/2017 đến 1/2018.

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn

a) Mục tiêu 1 và 2:

- ≥ 18 tuổi, không phân biệt giới tính.
- BN hoặc người đại diện hợp pháp của BN (nếu BN không có khả năng đưa ra quyết định) đồng ý và ký bản thoả thuận tham gia nghiên cứu.
- Được chẩn đoán xác định mắc VPLQTM theo tiêu chuẩn chẩn đoán VPLQTM được nêu tại "Viêm phổi liên quan thở máy - Hướng dẫn chẩn đoán và xử trí Hội sức tích cực" (Ban hành theo Quyết định số 1493/QĐ-BYT ngày 22/4/2015 của Bộ trưởng Bộ Y tế)⁵⁹. Cụ thể như sau:
 - + Các triệu chứng xuất hiện sau 48 giờ kể từ khi được thở máy (qua ống nội khí quản hoặc qua canuyn mở khí quản).
 - + X-quang phổi: tổn thương mới hoặc tiến triển kéo dài trên 48 giờ.
 - + Kèm theo ít nhất 2 trong 3 dấu hiệu sau:
 - Nhiệt độ $> 38,3^{\circ}\text{C}$ hoặc $< 35^{\circ}\text{C}$.
 - Bạch cầu $> 10000/\text{mm}^3$ hoặc $< 4000/\text{mm}^3$.
 - Đờm đục hoặc thay đổi tính chất đờm.

- + Nuôi cấy dịch phế quản dương tính.
- Dịch phế quản được hút bằng sonde hút đờm kín có nối với bộ cấy đờm vô trùng, nuôi cấy phân lập và định danh được vi khuẩn được coi là gây bệnh bằng “Kỹ thuật cấy đờm bán định lượng” theo tiêu chuẩn của “Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng” (Ban hành kèm Quyết định số 1539/QĐ-BYT ngày 20/4/2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế) ⁶⁰. Vi sinh vật mọc với số lượng được coi là gây bệnh khi:
 - Khuẩn lạc (khóm) của vi khuẩn gây bệnh mọc tương đối nhiều và rất nhiều ở vùng thứ 2, và/ hoặc vùng thứ 3, và/ hoặc vùng thứ 4.
 - Khuẩn lạc (khóm) của vi khuẩn gây bệnh mọc ở vùng 1 nhưng phù hợp với hình ảnh trên tiêu bản nhuộm Gram và có bạch cầu đa nhân trung tính. Hoặc trên tiêu bản nhuộm Gram có rất ít hoặc không có các vi thể của đường hô hấp nhưng có rất nhiều tế bào mũ.
- Vi khuẩn gây bệnh phân lập được là vi khuẩn đa kháng thuốc: là những chủng vi khuẩn kháng với đại diện 3 hoặc nhiều hơn các nhóm kháng sinh được thử kháng sinh đồ ³⁶.

b) Mục tiêu 3:

Để xác định được các cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc tại khoa HSTC trong 1 khoảng thời gian cụ thể, qua đó xác định được nguồn lây truyền của những vi khuẩn này, thì cần thu tuyển được toàn bộ BN (bao gồm BN VPLQTM và những BN còn lại của khoa) và các mẫu môi trường xung quanh tất cả các giường bệnh tại khoa trong khoảng thời gian đó để đảm bảo đủ thông tin xây dựng được các cụm lây truyền hoàn chỉnh. Nếu chỉ thu tuyển nhóm BN VPLQTM sẽ có thể bỏ sót các cụm lây truyền do những BN không VPLQTM vẫn có thể là một mắt xích trong chuỗi lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc.

- Bệnh nhân:

+ ≥ 18 tuổi, không phân biệt giới tính

- + BN hoặc người đại diện hợp pháp của BN (nếu BN không có khả năng đưa ra quyết định) đồng ý và ký bản thoả thuận tham gia nghiên cứu.
- Mẫu bệnh phẩm thu thập trên tất cả BN: đờm, phân, nước tiểu, mủ vết thương (nếu có). Các bệnh phẩm cần đạt tiêu chuẩn theo qui định tại "Sổ tay lấy bệnh phẩm" ban hành kèm theo Quy trình ISO 15189 ngày 15/7/2016 của Giám đốc Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương⁶¹. Cụ thể như sau:
 - + Đờm: được hút bằng sonde hút đờm kín có nối với bộ cây đờm vô trùng, số lượng 10ml.
 - + Phân: được lấy từ trực tràng bằng tăm bông vô trùng đã tẩm ẩm bằng nước muối sinh lý hoặc lấy trực tiếp từ xô sạch sau khi BN đã đi ngoài ra. Chọn chỗ phân có biểu hiện bệnh lý như nhầy, mủ, máu. Số lượng phân cần lấy bằng đầu ngón tay.
 - + Nước tiểu: nước tiểu giữa dòng, số lượng 10ml.
 - + Mủ vết thương: lấy mủ trên vết thương bằng gạc vô trùng thấm nước muối sinh lý vô trùng. Nếu xác định được ranh giới giữa vùng tổn thương và vùng lành thì nên lấy ở vùng ranh giới này là tốt nhất.
- Mẫu môi trường: bề mặt các vật dụng xung quanh giường bệnh của BN, bao gồm: tay nắm cửa phòng bệnh và các thiết bị chăm sóc BN (giường bệnh, máy thở, máy theo dõi, máy hút đờm, tủ đầu giường).

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

a) Mục tiêu 1 và 2:

- BN có bằng chứng viêm phổi từ trước: sốt, tăng bạch cầu, thâm nhiễm phổi.

b) Mục tiêu 3:

- BN có thời gian điều trị tại khoa HSTC dưới 24 giờ (do không đủ thời gian để thực hiện các qui trình sàng lọc, thu tuyển BN, thu thập mẫu bệnh phẩm).
- Bệnh phẩm thu thập từ BN và bệnh phẩm mẫu môi trường:
 - + Không được đặt trong lọ vô trùng có nắp đậy kín.

- + Tăm bông lấy mẫu (bệnh phẩm phân, mủ, môi trường) bị khô.
- + Thời gian vận chuyển mẫu đến phòng xét nghiệm quá 4 giờ nhưng bệnh phẩm không được đặt trong môi trường bảo quản phù hợp.
- + Thời gian vận chuyển mẫu đến phòng xét nghiệm quá 12 giờ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả, tiền cứu.

2.2.2. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu

a) Mục tiêu 1 và 2:

- Bệnh nhân: chọn mẫu toàn bộ, lấy tất cả BN đáp ứng được tiêu chuẩn lựa chọn của mục tiêu 1 và 2, điều trị tại khoa HSTC, BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương từ tháng 7/2017 đến 1/2018. Do chọn mẫu toàn bộ nên nghiên cứu không đặt ra yêu cầu cần tính cỡ mẫu vì chúng tôi đã thu tuyển toàn bộ BN đủ tiêu chuẩn chọn vào.
- Thực tế, nghiên cứu thu tuyển được 47 BN cho mục tiêu 1 và 2.

b) Mục tiêu 3:

- Bệnh nhân: chọn mẫu toàn bộ, lấy tất cả BN đáp ứng được tiêu chuẩn lựa chọn của mục tiêu 3, điều trị tại khoa HSTC, BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương từ tháng 7/2017 đến 1/2018. Do chọn mẫu toàn bộ nên nghiên cứu không đặt ra yêu cầu cần tính cỡ mẫu vì chúng tôi đã thu tuyển toàn bộ BN đủ tiêu chuẩn chọn vào.

Thực tế, nghiên cứu thu tuyển được 196 BN cho mục tiêu 3.

- Bệnh phẩm của BN: mỗi BN tại khoa HSTC được thu thập 4 loại bệnh phẩm, bao gồm: đờm, phân, nước tiểu và mủ vết thương (nếu có) tại các thời điểm: vào khoa, ra khoa và 1 lần/tuần (qui định vào sáng thứ 3 hàng tuần) trong quá trình điều trị tại khoa. Đây là 4 loại bệnh phẩm được US-CDC khuyến cáo sàng lọc để phát hiện các vi khuẩn đa kháng thuốc trên BN⁶². Ngoài ra,

BN vẫn được thu thập các bệnh phẩm khác để làm xét nghiệm theo chỉ định thường qui của bác sỹ điều trị khi thăm khám BN hàng ngày, tuân thủ theo các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị của Bộ Y tế và của bệnh viện, bao gồm cả những xét nghiệm giúp chẩn đoán VPLQTM (công thức máu, cấy đờm, ...) ngay khi BN có triệu chứng lâm sàng gợi ý mắc VPLQTM.

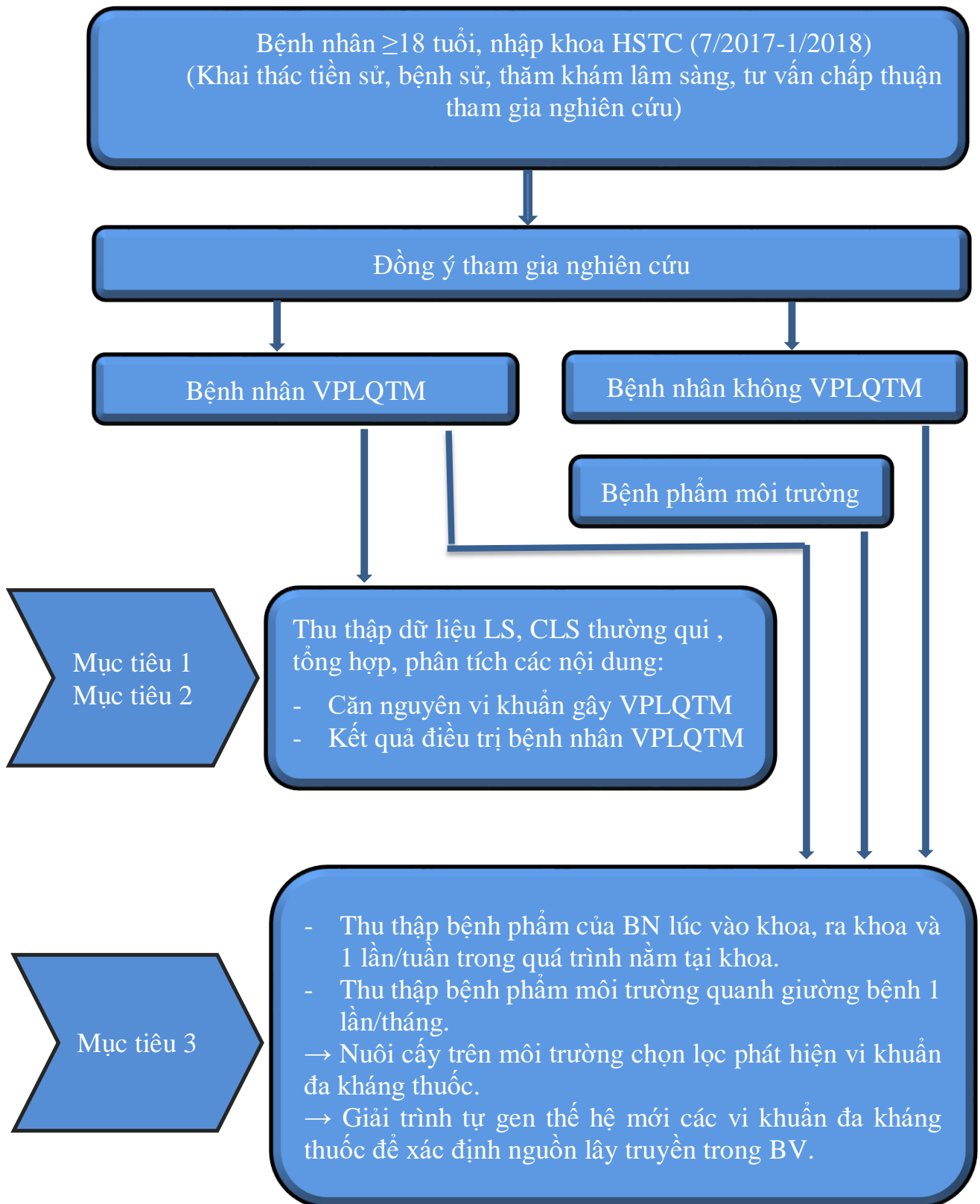
Theo báo cáo kết quả hoạt động của BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương, thời gian nằm viện trung bình của BN tại khoa HSTC là 20 ngày⁵⁸, như vậy, trung bình 1 BN sẽ được thu thập mẫu 4 lần trong quá trình nằm viện, bao gồm 4 mẫu đờm, 4 mẫu nước tiểu, 4 mẫu phân và 4 mẫu mủ vết thương (nếu có). Tổng số mẫu trung bình thu thập được từ một bệnh nhân là 12-16 mẫu.

- Mẫu môi trường: mẫu môi trường được thu thập 1 tháng/lần tại các vị trí: (1) tay nắm cửa phòng bệnh; (2) các thiết bị chăm sóc BN (giường bệnh, máy thở, máy theo dõi, máy hút đờm, tủ đầu giường). Khoa HSTC, BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương có 4 buồng hồi sức (3 buồng có 2 cửa và 1 buồng có 3 cửa) với 16 giường. Vì vậy, mỗi tháng, 25 mẫu môi trường được thu thập, gồm 16 mẫu xung quanh 16 giường bệnh, 9 mẫu tay nắm cửa của 4 buồng bệnh. Trong thời gian 6 tháng (7/2017-1/2018), tổng số mẫu môi trường ước đạt 150 mẫu. Thực tế, nghiên cứu thu thập được 150 mẫu môi trường cho mục tiêu 3.

2.2.3. Quy trình nghiên cứu

a) Sơ đồ quy trình nghiên cứu:

Nghiên cứu được thực hiện theo sơ đồ sau:



Hình 2. 1. Sơ đồ qui trình nghiên cứu

b) Các bước tiến hành

Những BN đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu sẽ được giải thích kỹ về tình trạng bệnh và các bước tiến hành nghiên cứu, cụ thể như sau:

- **Thu tuyển BN:**

- + Lấy phiếu chấp thuận tham gia vào nghiên cứu (mẫu phiếu ở phụ lục 1).
- + Hỏi BN và/hoặc người nhà BN về tiền sử dịch tễ, các bệnh mạn tính, khởi phát, diễn biến của bệnh, điều trị trước khi đến BV.
- + Thăm khám lâm sàng, đánh giá ý thức, tình trạng thông khí, các triệu chứng ở các hệ cơ quan của BN hàng ngày; ghi nhận thông tin về can thiệp, thủ thuật được thực hiện và các thuốc được sử dụng cho BN tại thời điểm vào khoa, xuất khoa và 1 lần/tuần (thứ 3 hàng tuần) trong quá trình nằm tại khoa.
- + Ghi nhận các kết quả xét nghiệm và thăm dò chức năng được thực hiện trên BN theo thường quy của BV tại thời điểm vào khoa, xuất khoa và 1 lần/tuần (qui định vào thứ 3 hàng tuần) trong quá trình BN nằm tại khoa. Các kết quả ghi nhận bao gồm: công thức máu; đông máu; sinh hóa máu đánh giá chức năng gan, thận, yếu tố viêm, điện giải đồ; khí máu động mạch; tổng phân tích nước tiểu; siêu âm ổ bụng; chụp X-quang phổi; kết quả phân lập vi sinh vật và kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn phân lập được.

- **Thu thập bệnh phẩm của BN và bệnh phẩm môi trường:**

+ **Đối với BN:**

- Thu thập 4 loại bệnh phẩm, bao gồm:
 - ✓ Đờm/dịch phế quản
 - ✓ Phân/bệnh phẩm ngoáy trực tràng
 - ✓ Nước tiểu
 - ✓ Mủ vết thương (nếu có)

Đây là 4 loại bệnh phẩm được CDC Mỹ khuyến cáo thu thập để sàng lọc sự xuất hiện của các vi khuẩn đa kháng thuốc ⁶².

- **Đối tượng áp dụng:**
 - ✓ BN đặt NKQ/MKQ thở máy: tại thời điểm BN có các triệu chứng định hướng tới VPLQTM (cụ thể: X-quang phổi có hình ảnh tổn thương mới hoặc tiến triển kéo dài trên 48 giờ; Nhiệt độ > 38°C hoặc < 35,5°C; Bạch cầu máu ngoại vi > 10 G/L hoặc < 4 G/L; Đờm đục hoặc thay đổi tính chất đờm), BN sẽ được thu thập dịch hút phế quản để nuôi cấy bán định lượng nhằm xác định chẩn đoán VPLQTM cũng như căn nguyên gây VPLQTM (phục vụ mục tiêu 1 và 2 của nghiên cứu). Ngoài ra, các BN này sẽ được thu thập 4 loại bệnh phẩm gồm dịch phế quản, phân, nước tiểu, mủ vết thương (nếu có) để nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc nhằm sàng lọc tình trạng nhiễm các vi khuẩn đa kháng thuốc ở BN, qua đó xác định nguồn lây truyền của chúng (phục vụ mục tiêu 3 của nghiên cứu).
 - ✓ Các BN còn lại của khoa HSTC (BN không đặt NKQ/MKQ thở máy): được thu thập 4 loại bệnh phẩm gồm đờm, phân, nước tiểu, mủ vết thương để nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc nhằm sàng lọc tình trạng nhiễm các vi khuẩn đa kháng thuốc ở BN, qua đó xác định nguồn lây truyền của chúng (phục vụ mục tiêu 3 của nghiên cứu).
- **Thời điểm thu thập bệnh phẩm nghiên cứu:**
 - ✓ Vào khoa
 - ✓ Ra khỏi khoa
 - ✓ Trong quá trình nằm tại khoa: 1 lần/tuần (qui định vào thứ 3 hàng tuần)
 - ✓ Riêng với bệnh phẩm dịch phế quản sẽ được thu thập thêm vào thời điểm BN thở máy có các triệu chứng định hướng tới VPLQTM.
- + **Đối với môi trường:**
 - Thu thập bệnh phẩm khu vực xung quanh giường bệnh (thành giường, máy thở, máy theo dõi, máy hút đờm, ống dẫn lưu, tay nắm cửa...)
 - Thời điểm thu thập: 1 tháng/lần, vào ngày thứ 3 của tuần giữa tháng.

- ***Nuôi cấy bệnh phẩm trên môi trường chọn lọc để phát hiện các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc:***
 - + Các loại mẫu bệnh phẩm sau khi thu thập sẽ được nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc (CHROMagar™ ESB, CHROMagar™ mSuperCARBA™, CHROMagar™ VRECHROMID ESB, CHROMID CRO và CHROMID CRO, BioMérieux, Marcy L'Étoile CHROMagar, France) để phân lập vi khuẩn đa kháng thuốc (CRO, VRE, ESB-PE).
 - + Nếu có khuẩn lạc mọc trên môi trường thích hợp thì sẽ được tiến hành nhuộm Gram và định danh tự động trên hệ thống MALDI-TOF MS (Bruker Diagnostics, Bremen, Germany), làm kháng sinh đồ tự động trên hệ thống Vitek 2 COMPACT (Vitek 2, BioMérieux, Marcy L'Etoile, France).
- ***Giải trình tự gen thế hệ mới các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc để xác định các cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc trong BV:***
 - + Sau khi được nuôi cấy, phân lập, định danh và làm kháng sinh đồ, DNA tổng số từ các chủng đã được phân lập sẽ được tách chiết. DNA tổng số sau đó sẽ được đo và chuẩn hoá nồng độ để tiến hành giải trình tự gen trên hệ thống máy Illumina HiSeq X10 (Illumina Inc., San Diego (CA), USA) tại Viện Wellcome Sanger, Vương quốc Anh.
 - + Kết quả giải trình tự gen được sử dụng để xác định các cụm lây truyền vi khuẩn bằng công cụ phân tích Transcluster (sử dụng phương pháp makeSNPClusters dựa trên các đa hình nucleotide (SNP) được xác định sau khi lọc tái tổ hợp). Ngưỡng lây truyền được đánh giá dựa trên sự đa dạng SNP trong từng BN và giữa các BN đối với mỗi loài vi khuẩn.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.3.1. Thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ 7/2017 đến 12/2018, bao gồm 6 tháng thu tuyển BN và mẫu bệnh phẩm (7/2017 - 1/2018) và 12 tháng thực hiện giải trình

tự gen các chủng vi khuẩn phân lập được (1/2018 - 12/2018).

2.3.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại khoa Hồi sức tích cực, BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương, cơ sở Giải Phóng.

2.4. Nội dung nghiên cứu

2.4.1. Mục tiêu 1 – Xác định căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới trung ương

- Căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM:
 - + Kết quả nuôi cấy bán định lượng bệnh phẩm dịch phế quản trên BN thở máy đủ tiêu chuẩn xác định là căn nguyên gây bệnh.
 - + Tình hình đồng nhiễm nhiều căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM trên 1 BN.
- Đặc tính kháng kháng sinh của các các vi khuẩn gây VPLQTM: đặc điểm KKS của các chủng vi khuẩn gây VPLQTM thường gặp như: *A.baumannii*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus*,...
- Yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc: tìm hiểu một số yếu tố trên BN có thể giúp tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc như tiền sử nằm viện, tiền sử sử dụng kháng sinh, các can thiệp thủ thuật đã thực hiện, thời gian nằm viện, các bệnh lý nền,...
- Thực trạng mang vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường hô hấp của BN VPLQTM: mô tả tình trạng xuất hiện vi khuẩn đa kháng thuốc tại đường hô hấp của các BN VPLQTM trong quá trình nằm viện. Mang vi khuẩn đa kháng thuốc là tình trạng phát hiện được các vi khuẩn này trong mẫu bệnh phẩm dịch phế quản được nuôi cấy nhưng không có bằng chứng về sự xâm nhập vi khuẩn vào mô và viêm mô bào tại vị trí lấy bệnh phẩm. Tức là ghi nhận sự có mặt của các vi khuẩn đa kháng thuốc tại phế quản phổi của BN nhưng không có bằng chứng về tổn thương viêm phế quản phổi.

2.4.2. Mục tiêu 2 – Đánh giá kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới trung ương

- Tình trạng BN lúc xuất viện: ổn định, về nhà; chuyển viện do bệnh đỡ; chuyển viện do bệnh nặng hơn; về nhà để tử vong; tử vong tại BV.
- Điểm MRS (thang điểm Rankin sửa đổi, Modified Rankin Scale) của BN tại thời điểm xuất viện: đánh giá theo thang điểm từ 0 đến 6.
- Thời gian nằm điều trị tại khoa HSTC.
- Các can thiệp, thủ thuật đã thực hiện trên BN: thở máy xâm nhập, đặt NKQ, mở khí quản, đặt catheter tĩnh mạch trung tâm, đặt catheter động mạch, lọc máu, lọc huyết tương,...
- Các kháng sinh đã được sử dụng để điều trị cho BN, thời gian điều trị kháng sinh, sự phù hợp kháng sinh trong quá trình điều trị.
- Tình trạng chuyển tuyến khi nhập viện: BN đến thẳng BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương, hoặc được chuyển đến từ các BV khác (BV tuyến trung ương, tuyến tỉnh, tuyến huyện).
- Tiền sử bệnh của BN:
 - + Tiền sử lý mạn tính: bệnh lý tim mạch, bệnh lý hô hấp, bệnh lý mạch máu não, suy thận mạn có lọc máu chu kỳ, xơ gan, ung thư, đái tháo đường,...
 - Bệnh lý mạn tính được định nghĩa là một căn bệnh tồn tại trong thời gian dài, từ tối thiểu 3 tháng đến nhiều hơn 1 năm, cần được chăm sóc y tế nội trú hoặc ngoại trú. Các bệnh lý mạn tính không thể điều trị khỏi, người bệnh cần được kiểm soát các triệu chứng hàng ngày theo hướng dẫn của bác sỹ.
 - + Tiền sử sử dụng kháng sinh trong vòng 90 ngày trước đợt bệnh này, sử dụng kháng sinh trong đợt bệnh này trước khi nhập khoa HSTC.
 - + Tiền sử nằm viện, nằm khoa HSTC trong vòng 1 năm qua.
- Mức độ nặng của bệnh: đánh giá mức độ nặng của bệnh theo thang điểm Quick SOFA (qSOFA) và thang điểm APACHE II.

- Các yếu tố tiên lượng tử vong trên BN: tuổi, giới, tiền sử bệnh lý nền, tiền sử nằm viện, tiền sử sử dụng kháng sinh, các can thiệp, thủ thuật thực hiện trên BN, thời gian nằm tại khoa HSTC, ...
- Hình ảnh tổn thương trên phim X-quang phổi: đánh giá tại thời điểm BN được chẩn đoán mắc VPLQTM.

2.4.3. Mục tiêu 3 – Xác định nguồn lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc gây viêm phổi liên quan thở máy bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

- Phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen: mô tả phân bố các vi khuẩn được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen.
- Sự phân bố các Sequence Types (STs) của các vi khuẩn được giải trình tự gen: đánh giá sự đa dạng các STs của vi khuẩn.
- Các gen kháng thuốc của các loài vi khuẩn được giải trình tự gen: xác định các gen kháng thuốc mà vi khuẩn mang.
- Cây phát sinh loài của các loài vi khuẩn: xây dựng cây phát sinh loài dựa trên kết quả giải trình tự gen.
- Sự xuất hiện của các vi khuẩn đa kháng thuốc tại khoa HSTC theo thời gian nghiên cứu: mô tả sự có mặt của các vi khuẩn theo không gian và thời gian nhằm xác định khả năng lây truyền của chúng.
- Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào STs: xác định các cụm lây truyền giữa các BN của mỗi loài vi khuẩn và xác định số cụm lây truyền mà một BN có thể liên quan.
- Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào phenotypes.

2.5. Các tiêu chuẩn, kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.5.1. Các khái niệm được sử dụng trong nghiên cứu

- Vi khuẩn đa kháng thuốc: là những chủng vi khuẩn kháng với đại diện 3 hoặc nhiều hơn các nhóm kháng sinh được thử kháng sinh đồ³⁶.

- Mang vi khuẩn đa kháng thuốc (MDROs colonization): là tình trạng phát hiện được các vi khuẩn đa kháng thuốc trong các mẫu bệnh phẩm được nuôi cấy nhưng không có bằng chứng về sự xâm nhập vào các mô và viêm mô bào tại các vị trí lấy bệnh phẩm đó ⁶³.
- Nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc (MDROs infection): là tình trạng vi khuẩn đa kháng thuốc xâm nhập vào các mô của cơ thể (được phát hiện qua nuôi cấy các mẫu bệnh phẩm) và gây nên bệnh, có bằng chứng về sự xâm nhập vào các mô và viêm mô bào tại các vị trí lấy bệnh phẩm đó ⁶³.
- Điều trị kháng sinh ban đầu phù hợp theo căn nguyên được đánh giá căn cứ vào chỉ định kháng sinh của bác sỹ dành cho BN có tuân thủ đúng các hướng dẫn cập nhật của Bộ Y tế Việt Nam ⁵⁹.
- Xác định cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc bằng Sequence types: để xác định các chủng vi khuẩn có liên quan chặt chẽ về mặt di truyền nhằm chỉ ra có sự lây truyền gần đây, các cụm lây truyền được đánh giá dựa trên khoảng cách SNP trên bộ gen lõi của mỗi loài. Với thời gian lấy mẫu ngắn, không có loài vi khuẩn nào có khả năng thu được nhiều hơn 1 SNP khác biệt khi ở trong bệnh viện. Do đó, chúng tôi đã xem xét các mẫu có bằng chứng di truyền về sự lây truyền gần đây với 0 SNP khác biệt.
- Các cụm lây truyền được xác định khi phát hiện được các chủng của cùng 1 loài vi khuẩn, khác biệt 0 SNP trên bộ gen lõi, có liên quan tới 2 bệnh nhân và/hoặc mẫu môi trường trở lên và có thời gian thu thập mẫu bệnh phẩm đồng thời với nhau.
- Xác định cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc bằng Phenotypes: các cụm lây truyền được xác định khi phát hiện được các chủng của cùng 1 loài vi khuẩn, có cùng kiểu hình đề kháng kháng sinh, có liên quan tới 2 bệnh nhân trở lên và có thời gian thu thập mẫu bệnh phẩm đồng thời với nhau.

2.5.2. Thang điểm Rankin sửa đổi (Modified Rankin Scale, MRS)

Thang điểm Rankin sửa đổi (Modified Rankin Scale, MRS) đánh giá tình trạng hồi phục của BN tại thời điểm xuất viện ⁶⁴.

| Điểm | Biểu hiện |
|-------------|---|
| 0 | Không còn bất kỳ triệu chứng gì |
| 1 | Không còn triệu chứng nặng, vẫn có thể thực hiện được các công việc và hoạt động bình thường |
| 2 | Giảm khả năng lao động nhẹ, không thể thực hiện các hoạt động như trước đây nhưng có thể tự chăm sóc bản thân mà không cần trợ giúp |
| 3 | Giảm khả năng lao động vừa, cần có sự giúp đỡ nhưng có thể tự đi lại được mà không cần giúp đỡ |
| 4 | Giảm khả năng lao động vừa và nặng, không thể đi lại mà không có sự hỗ trợ của người khác và không thể thực hiện được các nhu cầu của bản thân mà không có sự giúp đỡ |
| 5 | BN nặng, nằm liệt giường, không tự phục vụ được và cần phải có chăm sóc và theo dõi của nhân viên y tế |
| 6 | BN tử vong |

2.5.3. Bảng điểm APACHE II

Bảng 2. 1. Bảng điểm đánh giá tình trạng sức khỏe dài hạn và các thông số sinh lý trong giai đoạn cấp, phiên bản II (APACHE II) ⁶⁵

| Đặc điểm | +4 | +3 | +2 | +1 | 0 | +1 | +2 | +3 | +4 |
|-----------------------|---|--------------|-------------|---------------|----------------|--------------|---------------|---------------|-----------|
| Nhiệt độ (°C) | ≥ 41 | 39- 40,9 | | 38,5- 38,9 | 36 - 38,4 | 34 - 35,9 | 32 - 33,9 | 30 - 31,9 | ≤ 29,9 |
| HATB (mmHg) | ≥ 160 | 130- 159 | 110- 129 | | 70- 109 | | 50 - 69 | | ≤ 49 |
| Tần số tim (ck/p) | ≥ 180 | 140- 179 | 110- 139 | | 70- 109 | | 55 - 69 | 40 - 54 | ≤ 39 |
| Nhịp thở (ck/p) | ≥ 50 | 35 - 49 | - | 25 - 34 | 12 - 24 | 10 - 11 | 6 - 9 | - | ≤ 5 |
| PaO2 (FiO2 < 0,5) | - | - | - | - | > 70 | 61 - 70 | - | 55 - 60 | ≤ 55 |
| pH máu động mạch | ≥ 7,7 | 7,6- 7,69 | - | 7,5 - 7,59 | 7,33 - 7,49 | - | 7,25- 7,32 | 7,15- 7,24 | < 7,15 |
| Na+ máu (mmol/l) | ≥ 180 | 160- 179 | 155- 159 | 150- 154 | 130 - 149 | - | 120-129 | 111- 119 | < 110 |
| K+ máu (mmol/l) | ≥ 7 | 6,0 - 6,9 | - | 5,5 - 5,9 | 3,5 - 5,4 | 3,0- 3,4 | 2,5 - 2,9 | - | < 2,5 |
| CROatinin (μmol/l) | ≥ 309 | 177- 300 | 132- 168 | - | 53 - 124 | - | < 53 | - | |
| Hematocrit (%) | > 60 | - | 50- 59,9 | 46 - 49,9 | 30 - 45,9 | - | 20-29,9 | - | < 20 |
| Bạch cầu (G/L) | ≥ 40 | - | 20- 39,9 | 15 - 19,9 | 3 - 14,9 | - | 1-2,9 | - | < 1 |
| Glasgow | - | - | - | - | 13 - 15 | 10 - 12 | 7 - 9 | 4 - 6 | 3 |
| Tuổi | Tuổi < 44 (0), 45 – 54 (+ 2), 55 – 64 (+ 3), 65 – 74 (+5), ≥ 75 (+6) | | | | | | | | |
| Bệnh cấp, mạn | Bệnh mạn tính nặng (+2), mô cấp cứu (+5), mô phiên (+2) | | | | | | | | |
| Tổng điểm | Là tổng cộng điểm của các chỉ số bên trên (từ 0 đến 30 điểm) Điểm APACHE II càng cao thì tỷ lệ tử vong càng cao APACHE II ≥ 10 điểm được xem là nặng, nguy cơ tử vong cao. | | | | | | | | |

2.5.4. Bảng điểm đánh giá nhanh tình trạng suy đa tạng (qSOFA)

Bảng 2. 2. Bảng điểm đánh giá nhanh tình trạng suy đa tạng⁶⁶

| Tiêu chuẩn đánh giá | Có | Không |
|-----------------------------------|--|-------|
| Tình trạng ý thức (GCS < 15 điểm) | 1 | 0 |
| Tần số thở ≥ 22 chu kỳ/ phút | 1 | 0 |
| Huyết áp tâm thu ≤ 100 mmHg | 1 | 0 |
| Tổng điểm qSOFA | Nguy cơ tử vong trong BV | |
| 0 – 1 | Không có nguy cơ tử vong trong BV | |
| 2 - 3 | Nguy cơ tử vong tăng lên từ 3 đến 16 lần | |

2.5.5. Các chỉ số đánh giá biến đổi cận lâm sàng ở bệnh nhân

Các xét nghiệm trong nghiên cứu được thực hiện tại BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương, với tiêu chuẩn ISO 15189. Các chỉ số xét nghiệm được đánh giá và so sánh với chỉ số sinh học bình thường của người Việt Nam⁶⁷.

- Công thức máu: hồng cầu (4,0 – 5,8 T/l), Hemoglobin (120-175 g/l), bạch cầu (4,0 – 10 G/l), tiểu cầu (150-450G/l)).
- Sinh hoá máu: enzyme gan (AST < 40 UI/l, ALT < 37 UI/l); chức năng thận (ure: 2,5-7.5 mmol/l, Creatinin: 62-120 μ mol/l), Glucose (3,9-6,4 mmol/l), LDH (230 – 460 U/l).
- Chỉ số viêm: CRP (< 5 mg/dL), Procalcitonon (< 0,05 ng/ml).
- Khí máu động mạch: pH (7,35 – 7,45), PaO₂ (> 80 mmHg), PaCO₂ (35 – 45 mmHg), HCO₃⁻ (22 – 26 mEq/L), Lactat (0,5 – 1,6 mmol/L).

2.5.6. Kỹ thuật nuôi cấy, định danh và làm kháng sinh đồ với các loại vi khuẩn từ các mẫu bệnh phẩm

Các bệnh phẩm sau khi thu thập sẽ được nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc

(CHROMagar™ ESB, CHROMagar™ mSuperCARBA™, CHROMagar™ VRECHROMID ESB, CHROMID CRO và CHROMID CRO, BioMérieux, Marcy L'Étoile CHROMagar, France) để phân lập vi khuẩn đa kháng thuốc. Nếu có khuẩn lạc mọc trên môi trường thích hợp sẽ được nhuộm Gram và định danh tự động trên hệ thống MALDI-TOF MS (Bruker Diagnostics, Bremen, Germany), làm kháng sinh đồ tự động trên hệ thống Vitek 2 COMPACT (Vitek 2, BioMérieux, Marcy L'Etoile, France) theo hướng dẫn của CLSI.

a) Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn

Đối với bệnh phẩm đờm/dịch phế quản

➤ Bệnh phẩm đờm (dành cho những BN không đặt NKQ)

- Nhuộm gram
- + Tất cả các mẫu đờm phải được sàng lọc bằng nhuộm Gram để chắc chắn mẫu đạt tiêu chuẩn và nhận định sơ bộ hình thể của vi khuẩn trong đó.
- + Soi ở vật kính 10x để đếm số lượng tế bào bạch cầu, tế bào biểu mô, lặp lại ít nhất 10 vi trường.
- + Nếu < 25 bạch cầu hoặc > 1 tế bào biểu mô/ 1 vi trường: bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn, loại bỏ bệnh phẩm đó, báo lâm sàng lấy lại.
- + Nếu ≥ 25 bạch cầu và ≤ 10 tế bào biểu mô/ 1 vi trường, bệnh phẩm đạt tiêu chuẩn, soi bệnh phẩm ở vật kính dầu x100.
- Ria cấy đờm trên các môi trường thạch máu (BA), thạch Socôla (CA), thạch MacConkey (MC). Đối với đĩa nuôi cấy trên môi trường BA và CA để ở tủ ấm 37°C có CO₂, MC để ở tủ ấm 30°C trong thời gian khoảng 18 – 24h.

➤ Bệnh phẩm dịch phế quản (dành cho những BN có đặt NKQ)

- Ly tâm tốc độ 1200 vòng/10 phút, bỏ nước nổi
- Lấy cặn nhuộm gram và nuôi cấy trên các môi trường MA, MC, BA. Đối với đĩa nuôi cấy trên môi trường BA và CA để ở tủ ấm 37°C có CO₂, MC để ở tủ ấm 30°C trong thời gian 18 – 24h.

- Trên môi trường đĩa thạch:
- + Nếu có khuẩn lạc mọc thì nhuộm Gram và định danh theo thường quy, làm kháng sinh đồ với vi khuẩn phân lập được theo hướng dẫn của CLSI.
- + Báo cáo kết quả theo số lượng vi khuẩn trong bệnh phẩm đờm.
 - Mọc tốt ở vùng 1 và < 5 khuẩn lạc ở vùng 1: +
 - Mọc tốt ở vùng 2 và < 5 khuẩn lạc ở vùng 3: ++
 - Mọc tốt ở vùng 3 và < 5 khuẩn lạc ở vùng 4: +++
 - Mọc tốt ở vùng 4: ++++

Số lượng khuẩn lạc tính riêng cho mỗi loại, không bao gồm những vi khuẩn khác trên đĩa thạch.

Đối với bệnh phân/ngoáy trực tràng

- Bệnh phẩm phân/ngoáy trực tràng được cấy trên môi trường trên đĩa thạch máu (BA) và thạch Socola. Đọc lam nhuộm Gram để nhận định sơ bộ hình thể, kích thước, tính chất bắt màu của vi khuẩn.
- Các đĩa nuôi cấy được để ủ ấm 37°C, 5% CO₂. Sau 6-24h, quan sát tính chất của khuẩn lạc mọc và nhuộm Gram từ khuẩn lạc xác định hình thể, tính chất bắt màu Gram, kích thước và cách sắp xếp của vi khuẩn để định hướng cho bước định danh tiếp theo.
 - + Nếu là trực khuẩn hoặc trực khuẩn Gram (-): cấy ra thạch URI, BA
 - + Nếu là cầu khuẩn Gram (+) xếp chuỗi: làm test Optochin
 - + Nếu là cầu khuẩn Gram (+) xếp thành đám: làm đông huyết tương
- Định danh vi khuẩn tự động bằng hệ thống MALDITOF.
- Tiến hành làm kháng sinh đồ theo hướng dẫn của CLSI.

Đối với bệnh phẩm nước tiểu

- Sử dụng mẫu bệnh phẩm nước tiểu giữa dòng (kỹ thuật lấy nước tiểu giữa dòng được thực hiện theo “Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng” của Bộ Y tế ⁶⁰).

- Trộn đều bệnh phẩm
- Lấy que cấy định lượng 1 μ l lấy nước tiểu ria cấy khắp trên môi trường UTI, để đĩa nuôi cấy ở tủ ấm 37⁰C có CO₂ trong 24h.
- Ly tâm nước tiểu với tốc độ 3000 vòng/ 10 phút, chắt bỏ nước nổi.
- Lấy cặn nhuộm gram và soi dưới vật kính dầu 100.

Nhận định kết quả:

- Tiêu bản kính hiển vi: Nhận định hình dáng tính chất bắt màu vi khuẩn, kết hợp xem tế bào nấm.
- Sau 24h kiểm tra nếu có khuẩn lạc trên đĩa thạch UTI:
 - + Đếm số khuẩn lạc trên đĩa thạch UTI và nhân 1000 tính ra được số vi khuẩn trên 1ml nước tiểu.
 - Nếu số lượng vi khuẩn $\geq 10^5$ /ml và đối với trẻ em là 10^4 /ml thì trả kết quả dương tính.
 - Nếu số lượng vi khuẩn $10^4 - 10^5$ /ml thì trả kết quả theo số lượng khuẩn lạc trên đĩa UTI.
 - + Chỉ trả kết quả trong trường hợp số khuẩn lạc trên đĩa UTI ≥ 10 tính riêng cho từng loại khuẩn lạc.
 - + Nếu có khuẩn lạc mọc thì nhuộm Gram và định danh theo thường quy, làm kháng sinh đồ với vi khuẩn phân lập được theo hướng dẫn của CLSI.
 - + Nếu trên 2 loại khuẩn lạc thì phải lấy lại nước tiểu.

Đối với bệnh phẩm môi trường

Mẫu môi trường được thu thập 1 tháng/lần tại các vị trí: (1) tay nắm cửa phòng bệnh; khu vực xung quanh giường bệnh: (2) thành giường bệnh, (3) ống NKQ, ống dẫn lưu trên BN, (4) máy thở, máy theo dõi, máy hút đờm, tủ đầu giường. Mẫu môi trường được nuôi cấy theo qui trình kỹ thuật “Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt” tại “Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng” (Ban hành kèm Quyết định số 1539/QĐ-BYT ngày 20/4/2017 của Bộ Y tế) ⁶⁰

- Lấy bệnh phẩm:
 - + Dùng 2 que tăm bông vô khuẩn được làm ướt bằng nước muối sinh lý 0,9% quệt mạnh như nhau vào mỗi bề mặt cần kiểm tra trong thời gian 10 giây.
 - + Cho 1 tăm bông vào ống canh thang thường và 1 tăm bông vào ống canh thang yếm khí, hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Đậy nút ống.
- Tiến hành kỹ thuật:
 - + Nuôi cấy và ủ ấm ống canh thang ở 35-37⁰C, 16-18 giờ, khí trường thường.
 - + Đánh giá độ đục của canh thang.
 - + Nếu canh thang đục: nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
 - + Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh vật hóa học.
- Nhận định kết quả:
 - + Dương tính: Có vi sinh vật trên bề mặt. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
 - + Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.
- Lưu ý: lấy mẫu cần tiến hành càng nhanh càng tốt để hạn chế tối đa sự ô nhiễm từ môi trường không khí. Mẫu bề mặt lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

b) Phương pháp định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật MALDI-TOF

Chuẩn bị hoá chất:

1. Lấy 1 tube Eppendorf và cho vào đó 475 μ L nước siêu tinh khiết, 500 μ L Acetonitrile (ACN) 100% và 25 μ L Trifluoroacetic acid 100% (TFA).
2. Trộn đều bằng vortex. Như vậy ta có được 1 mL hỗn hợp, gọi là “stock solution”. Stock solution có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng.

HCCA Matrix

1. Lấy 1 tube HCCA Matrix, cho vào đó 250 μ L stock solution.
2. Vortex ở nhiệt độ phòng cho đến khi thu được dung dịch trong suốt (tất cả tinh thể HCCA đều được hòa tan, nồng độ cuối là 10 mg HCCA/mL).

3. Dung dịch HCCA Matrix đã sẵn sàng để sử dụng: dung dịch HCCA Matrix đã chuẩn bị được bảo quản ở nhiệt độ phòng và tránh ánh sáng trực tiếp. Sử dụng trong vòng 2 tuần kể từ ngày chuẩn bị.

Bruker Test Standard (BTS)

1. Lấy 1 tube BTS, cho vào đó 50 μ L stock solution. Thực hiện pipetting ít nhất 20 lần ở nhiệt độ phòng, tránh tạo bọt.
2. Để ở nhiệt độ phòng 5 phút, sau đó lại pipetting ít nhất 20 lần, tránh tạo bọt.
3. Nếu dung dịch vẫn còn đục, thực hiện quay ly tâm 2 phút với tốc độ 13000 rpm ở nhiệt độ phòng.
4. Dung dịch BTS sẵn sàng để sử dụng. Nên chia nhỏ ra làm nhiều tube (chẳng hạn chia làm 10 tube, mỗi tube 5 μ L) và bảo quản ở nhiệt độ dưới -18°C .

Quy trình thực hiện:

Quy trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

Nhận định kết quả:

- Kết quả mức xanh lục ứng với $\text{Score} \geq 2$: Độ tin cậy cao, có thể chính xác đến cấp độ loài (species)
- Kết quả mức vàng ứng với $1.7 \leq \text{Score} < 2$: Độ tin cậy trung bình, có kết quả chính xác cấp độ chi (genus).
- Kết quả mức đỏ ứng với $\text{Score} < 1.7$: Không có kết quả định danh hoặc kết quả không tin cậy.

c) Phương pháp định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ tự động bằng máy VITEK 2 COMPACT

Nguyên lý định danh: dùng phương pháp đo màu để nhận biết các tính chất sinh vật hoá học của vi sinh vật thông qua sự thay đổi màu của các giếng môi trường có sẵn trong card.

Nguyên lý kháng sinh đồ: sử dụng phương pháp xác định MIC- nồng độ ức chế tối thiểu.

Phương pháp tiến hành: tiến hành đối với các chủng vi khuẩn mọc riêng rẽ (chủng thuần) trên đĩa thạch

Qui trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

Phiên giải kết quả:

- Nếu chỉ làm kháng sinh đồ, hoặc kết quả định danh là một loài vi khuẩn thì máy sẽ in kết quả MIC và mức độ nhạy cảm kháng sinh với vi khuẩn đó
- Nếu định danh và kháng sinh đồ cùng lúc mà kết quả định danh cho nhiều loại vi khuẩn thì sẽ không có kết quả kháng sinh đồ, khi đó phải chọn phương pháp định danh vi khuẩn nào thì sẽ cho kết quả kháng sinh đồ của vi khuẩn đó.

2.5.7. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

Sau khi đã được nuôi cấy, phân lập, định danh và làm kháng sinh đồ, nhóm nghiên cứu sẽ tiến hành tách chiết DNA tổng số từ các chủng đã được phân lập. DNA tổng số sau đó sẽ được đo nồng độ và chuẩn hoá nồng độ để chuẩn bị tiến hành giải trình tự gen. Chuẩn bị thư viện sẽ được thực hiện bằng cách cắt DNA thành những đoạn nhỏ có kích thước khoảng 300-500 nucleotid. Các đoạn này sẽ được gắn index để phân biệt các mẫu khác nhau trong cùng một lần chạy. Sản phẩm này sau đó sẽ được chuẩn hoá và định lượng trước khi đưa vào máy giải trình tự gen.

Phương pháp tiến hành được mô tả như sau:

a) Kỹ thuật tách chiết DNA

DNA được tách chiết theo Quy trình tách chiết DNA từ vi khuẩn bằng bộ kit Qiagen.

Qui trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

b) Kỹ thuật giải trình tự bộ gen của vi khuẩn

DNA thu được sẽ được tiến hành theo các bước như sau:

Bước 1: Đo và chuẩn hóa nồng độ DNA

Mục đích: đo nồng độ DNA thu được và pha loãng về nồng độ yêu cầu cho bước chuẩn bị mẫu cho quá trình giải trình tự.

Quy trình: Quy trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

Bước 2: Chuẩn bị thư viện giải trình tự

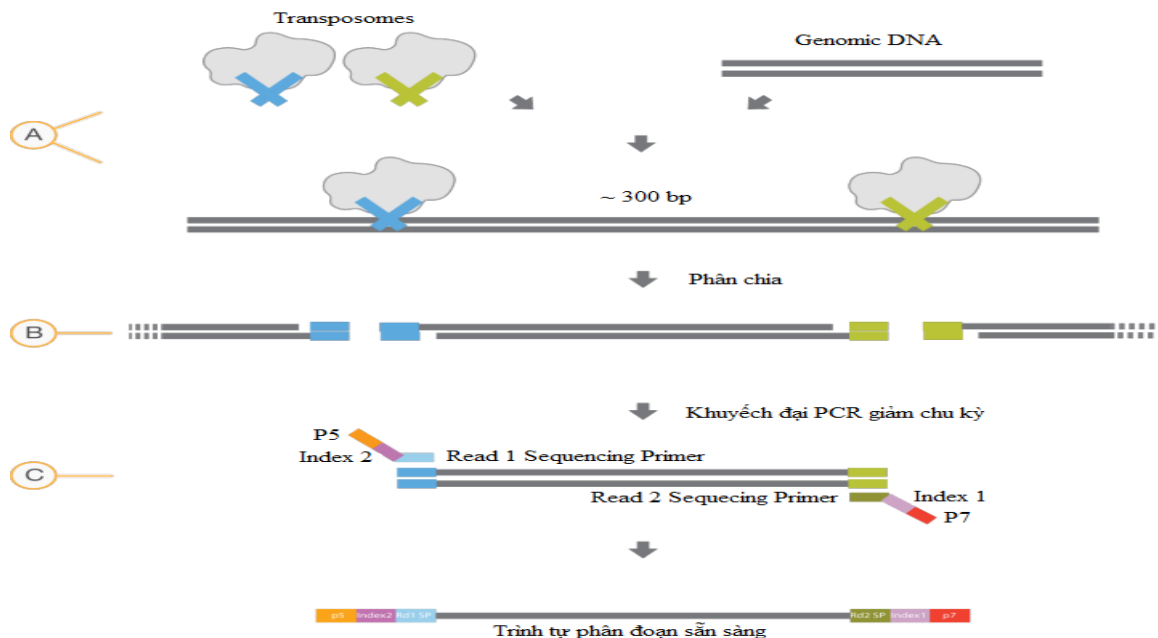
Bước 2.1. Cắt DNA thành những đoạn ngắn

Mục đích: Cắt DNA thành những đoạn có kích thước 300-500bp.

Quy trình: Quy trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

Bước 2.2. PCR gắn Index

Quy trình: Quy trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.



Hình 2. 2. Quy trình hoạt động của PCR gắn Index⁶⁸

A: Nextera XT transposome với adapter kết hợp với DNA mẫu

B: Phân chia để cắt mảnh và gắn adapter

C: PCR chu kỳ giới hạn để gắn trình tự adapter dấu ấn

Bước 2.3. Tinh sạch sản phẩm PCR

Chuẩn bị:

- AMPure XP beads 90 μ l/ mẫu (đối với các mẫu có kích thước 300-500bp).

- Pha 80% Ethanol (EtOH) (400 µl mỗi mẫu) từ EtOH tuyệt đối.
- 0,2 ml PCR tube

Quy trình: Qui trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

Bước 2.4. Chuẩn hóa mẫu, định lượng thư viện

Chuẩn bị hóa chất: LNA1 (Library Normalization Additives 1), LNB1 (Library Normalization Beads 1), LNW1 (Library Normalization Wash 1), LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1), 0,1 N NaOH, nghiêng 96 lỗ: 2 nghiêng, Ống tube 15 ml: 1 ống

Đo nồng độ DNA bằng Qubit (hoặc hóa chất tương đương)

Sử dụng máy Qubit, các ống đo chuyên dụng và bộ kit: dsDNA HS Assay

Quy trình: Qui trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

Bước 2.5. Đưa mẫu vào máy Miseq

Chuẩn bị:

- Điều chỉnh Block nhiệt cho ống 1.5ml ở 96 °C
- Rã đông hóa chất Miseq Reagent để ở nhiệt độ phòng
- Water ice
- HT1
- Resuspension Buffer

Quy trình thực hiện: Qui trình cụ thể được nêu trong phụ lục 3.

Dữ liệu trình tự bộ gen của các vi khuẩn đa kháng thuốc sẽ được phân tích bằng phần mềm CLC workbench của QIAGEN kết hợp với phần mềm được cung cấp, cài đặt và tích hợp bởi Viện Nghiên cứu Sanger.

Bước 2.6. Các bước cơ bản để xác định trình tự bộ gen của vi khuẩn:

- Sau khi hệ thống Miseq hoàn thành chương trình chạy giải trình tự, các chỉ số của lần chạy cần được lưu ý để có thể đánh giá sự thành công của lần chạy đó. Với bộ hóa chất giải trình tự Miseq reagent kit V3 600cycles, dữ liệu giải trình tự tối đa có thể nhận được vào khoảng 14.5 đến 15 Gb. Mật độ cluster

hình thành trên flowcell được khuyến cáo nên nằm trong khoảng từ 800 đến 1200K/mm². Trên 90% phần trăm các đoạn đọc có chất lượng giải trình tự lớn hơn Q30 (Phred quality scores of ≥ 30), nghĩa là 99.9% trình tự của từng nucleotide được đọc một cách chính xác nhất.

- Coverage ≥ 100 lần sẽ được sử dụng để phân tích.
- Quá trình phân tích dữ liệu được thực hiện sử dụng phần mềm Miseq reporter cắt đặt sẵn trong hệ thống Miseq và phần mềm CLC genomics Workbench (Qiagen). Đối với chế độ “Resequencing”- giải trình tự lại, các đoạn đọc (sequencing reads) sẽ được phần mềm Miseq reporter tự động căn trình tự so sánh với trình tự tham khảo (reference sequence) đã được nhập trước đó. Các đoạn được căn trình tự của mỗi một mẫu sẽ được chứa trong mỗi file đuôi bam (.bam file). Các file đuôi bam này sẽ được tải vào phần mềm CLC Genomics Workbench để phân tích và tạo ra trình tự hoàn chỉnh (consensus sequence). Bên cạnh đó thông tin về các điểm sai khác (variants) được ghi nhận trong quá trình căn trình tự các đoạn đọc với trình tự tham khảo sẽ được chứa trong các file định dạng vcf. Các bước phân tích số liệu sử dụng CLC Genomics Workbench (QIAGEN) như sau:

Bước 1: Làm sạch dữ liệu: loại bỏ phần dữ liệu bị nhiễu, tín hiệu xấu; loại các đoạn gap (đoạn trống)

Bước 2: Xuất ra 2 files (dạng Mers và Not Mers)

Bước 3: Lắp ráp trình tự gen sử dụng phần mềm denovo assembly sequencing hoặc remapping hoặc reference- based mapping tool để lắp ráp trình tự gen.

Denovo sequencing: xác định biến dị (variant calling) để tạo thành file VCF sử dụng GATK hoặc Samtools.

Reference- based mapping tool:

- Ghép các đoạn short read thành contig và so sánh với các reference genome đã được công bố

- Ngưỡng lựa chọn (cut off value) là đoạn đọc phải lặp lại ít nhất hoặc bằng 100 lần hay còn gọi là coverage ≥ 100 lần
- Xuất ra các consensus là trình tự bộ gen hoàn chỉnh của các chủng vi khuẩn đã giải trình tự

Bước 4: Lập file BAM, xây dựng contig, scaffold sử dụng các công cụ như bwa, trinity, bcftools.

Bước 5: Thống kê và đánh giá chất lượng lắp ráp: số lượng và độ dài contig, tổng độ dài contig, độ dài contig lớn nhất, tỉ lệ GC, N50.... bằng phần mềm Quast hoặc phần mềm khác.

Bước 6: Xây dựng trình tự bộ gen hoàn chỉnh của các chủng vi khuẩn đã được giải trình tự.

c) Các tiêu chuẩn kỹ thuật được áp dụng trong giải trình tự gen

- Kiểm soát chất lượng đọc: các lần đọc Illumina thô được kiểm tra chất lượng bằng fastQC (v0.11.8) và MultiQC (v 1.0.dev0) ⁶⁹, kiểm tra độ nhiễu bản bằng Kraken2 (v2.0.7-beta) ⁷⁰ và Bracken (v2.5) ⁷¹.
- Lắp ráp, tổ hợp: các lần đọc Illumina được lắp ráp de novo bằng SPAdes (v3.13.1) ⁷² và được kiểm tra chất lượng bằng Quast (v5.0.2) ⁷³ và CheckM (v1.0.18) ⁷⁴.
- Xây dựng cây phát sinh loài: các lần đọc được lập bản đồ để loại bỏ các tổ hợp hoặc các vị trí có dưới 90% đồng nhất với alen tham chiếu. Sau đó, các tổ hợp được căn chỉnh bằng PARSnp (v1.2) theo cài đặt mặc định ⁷⁵. Các liên kết đa lỗi được tạo ra bằng cách sử dụng PARSnp đã được lọc để tái tổ hợp, sử dụng Gubbins (v.2.3.5) ⁷⁶. Tiếp đó, cây phát sinh loài được xây dựng bằng RAxML (mô hình GTR-GAMMA) (v8.2.12) ⁷⁷ thông qua Gubbins. Mô hình hóa cây được xây dựng bằng iTol v5.6.2 ⁷⁸.
- Phát hiện gen kháng thuốc: gen kháng thuốc và các bản sao plasmid được phát hiện từ các tổ hợp bằng cách sử dụng Abricate (v1.0.1) và cơ sở dữ liệu

NCBI (đối với các gen kháng thuốc) ⁷⁹. Các gen được coi là có mặt nếu có 90% độ bao phủ ở 90% nucleotide tham chiếu.

- Trình tự đa điểm (MLST): Sequence types được xác định bằng MLST (v2.19.0) (<https://github.com/tseemann/mlst>) và sơ đồ loài liên quan ⁸⁰.
- Phân tích cụm lây truyền: cụm truyền được xây dựng bằng cách Transcluster (sử dụng phương pháp makeSNPClusters và sử dụng điểm cắt khoảng cách SNP thuần túy) ⁸¹ bằng cách sử dụng các SNP được xác định sau khi lọc tái tổ hợp bằng Gubbins. Ngưỡng lây truyền được đánh giá dựa trên sự đa dạng SNP trong BN và giữa các BN trong từng cây phát sinh loài.
- Cụm lây truyền dựa trên phenotypes được vẽ bằng phần mềm Gephi 0.9.2.

2.6. Thu thập số liệu: Số liệu được thu thập thông qua bệnh án nghiên cứu mẫu được thiết kế sẵn (*phụ lục 02*).

2.7. Phân tích và xử lý số liệu:

- Các số liệu nghiên cứu được ghi lại vào mẫu bệnh án nghiên cứu và được kiểm tra tính chính xác trước khi được nhập vào cơ sở dữ liệu điện tử. Các số liệu được kiểm tra nội bộ để tìm ra các số liệu không đồng nhất hoặc là bị lỗi.
- Số liệu nghiên cứu được phân tích và xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 và STATA 13.1 với các thuật toán ứng dụng.
- Nghiên cứu sử dụng các thống kê mô tả (tần suất, tỷ lệ phần trăm, giá trị trung bình, giá trị khoảng) để mô tả đặc điểm của quần thể nghiên cứu. Kiểm định Khi-bình phương (X^2 test) được sử dụng để so sánh sự khác biệt của hai hay nhiều tỷ lệ giữa các nhóm bệnh nhân của cùng một đặc tính nghiên cứu. Kiểm định T-test được dùng để so sánh giá trị trung bình giữa các nhóm khác nhau, với mức thống kê $p < 0,05$ và khoảng tin cậy 95%.
- So sánh giá trị trung bình của hai hoặc nhiều nhóm với phân bố không chuẩn bằng cách sử dụng phép thống kê Kruskal Wallis. So sánh có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

- Đánh giá các yếu tố nguy cơ liên quan đến nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc hoặc tử vong bằng cách sử dụng thuật toán phân tích đơn biến và hồi quy logistic so sánh giữa nhóm có nhiễm với nhóm không nhiễm hoặc nhóm tử vong với nhóm còn sống.
- Thời gian điều trị tại BV và tỷ lệ sống của BN VPLQTM được tính theo phương pháp thiết lập đường cong Kaplan Meier (Kaplan Meier survival curve).
- Sai số và cách hạn chế sai số:
 - + Sai số chọn: để hạn chế sai số chọn mẫu không đảm bảo tính đại diện, nghiên cứu chọn mẫu toàn bộ cho cả 3 mục nghiên cứu tức là tất cả BN đáp ứng được tiêu chuẩn chọn vào đều được thu tuyển vào nghiên cứu. Ngoài ra, nghiên cứu cũng tính cỡ mẫu tối thiểu cho mỗi mục tiêu và thực tế, lượng BN thu tuyển được đều cao hơn gấp trên 2 lần yêu cầu số lượng mẫu tối thiểu.
 - + Sai số thông tin: để hạn chế các sai số trong thu thập thông tin, nghiên cứu thiết kế công cụ thu thập thông tin phù hợp theo các mục tiêu nghiên cứu. Nghiên cứu sinh trực tiếp điền thông tin vào bệnh án mẫu. Các bệnh án nghiên cứu được kiểm tra 1 lần/tuần về độ hoàn thiện của thông tin. Những thông tin còn thiếu sẽ được bổ sung từ bệnh án của bệnh viện hoặc đánh giá trực tiếp trên BN nếu BN còn ở khoa. Sau khi nhập liệu trên phần mềm STATA 13.1, các số liệu sẽ được kiểm tra để phát hiện những giá trị thiếu, giá trị bất thường và điều chỉnh phù hợp.

2.8. Đạo đức trong nghiên cứu

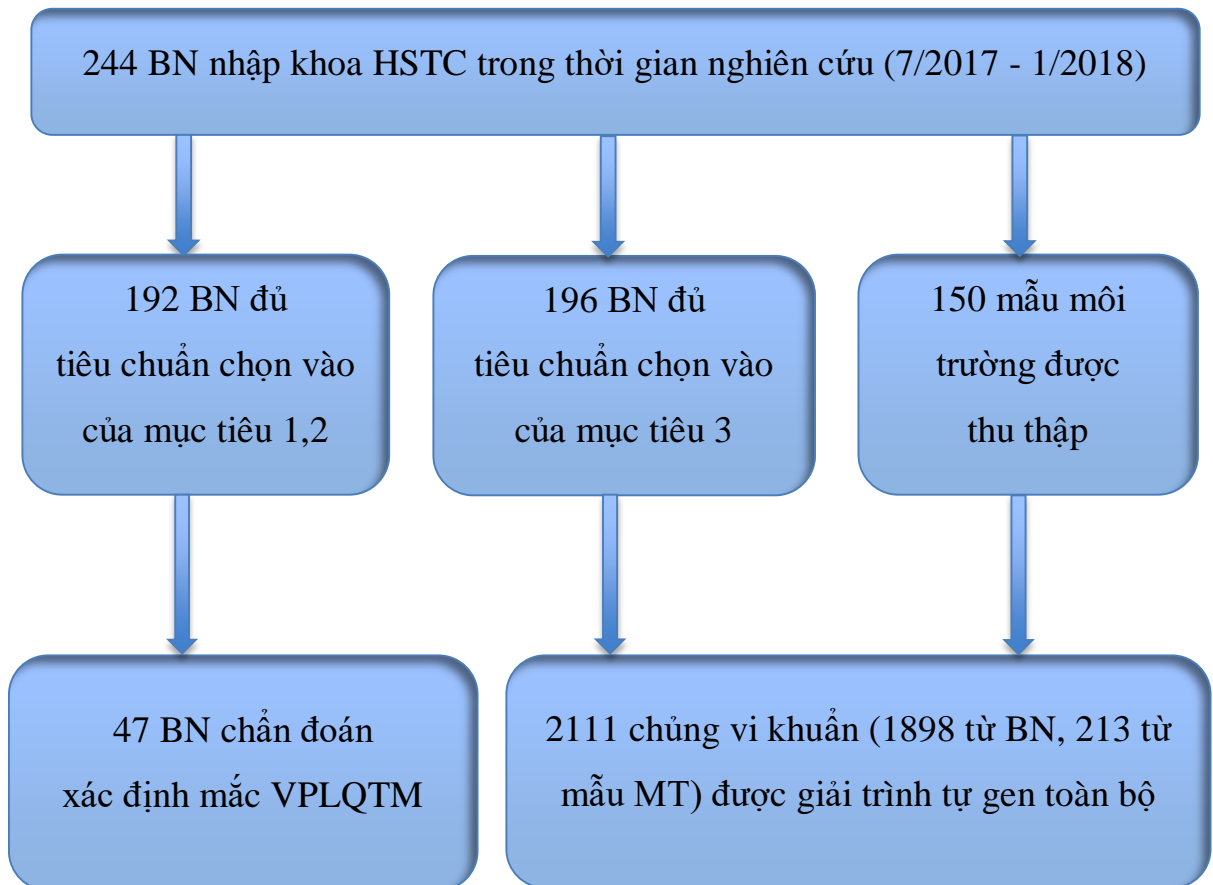
- Nghiên cứu đã được thông qua hội đồng y đức của BV Bệnh Nhiệt đới TW.
- Nghiên cứu có sự đồng ý của BN hoặc người đại diện hợp pháp của BN. Họ được nghe giải thích về nghiên cứu. Nếu đồng ý tham gia, BN hoặc người đại diện hợp pháp của BN ký vào bản thoả thuận tham gia nghiên cứu.

- BN hoặc người nhà đại diện hợp pháp của BN có quyền ngừng tham gia nghiên cứu tại bất kì thời điểm nào trong quá trình nghiên cứu mà không phải bồi thường hay chịu bất kì ràng buộc pháp lí và kinh tế nào và vẫn được điều trị theo qui trình thường qui tại bệnh viện.
- Nghiên cứu sử dụng thông tin về nhân trắc học của BN, thông tin về bệnh tật, các kết quả xét nghiệm cũng như các chủng vi khuẩn phân lập được từ bệnh phẩm của BN để làm giải trình tự gen. Nghiên cứu không thực hiện bất kỳ can thiệp gì trên BN.
- Các kết quả nghiên cứu là cơ sở để đề xuất các giải pháp kiểm soát nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, mang lại hiệu quả điều trị và chăm sóc tốt hơn cho những BN VPLQTM nói riêng và các BN nặng nói chung tại khoa HSTC.
- Tất cả thông tin của BN trong nghiên cứu này sẽ được giữ bí mật.

Chương 3

KẾT QUẢ

Từ 7/2017 đến 01/2018, tại khoa HSTC, 192 BN đủ tiêu chuẩn chọn vào của mục tiêu 1, 2; 196 BN và 150 mẫu môi trường đủ tiêu chuẩn chọn vào của mục tiêu 3. 47 BN (24,48%) trong 192 BN của mục tiêu 1, 2 được chẩn đoán xác định mắc VPLQTM. Trong nhóm VPLQTM, tuổi trung bình là $56,6 \pm 16,4$ (cao nhất là 86 tuổi, thấp nhất là 21 tuổi), nhóm 60 – 80 tuổi có tỷ lệ cao nhất (39,13%). Nam giới chiếm 78,72%. 2111 chủng vi khuẩn (1898 chủng thu được từ BN, 213 chủng thu được từ môi trường) của 3 loài *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *E. coli* được giải trình tự gen toàn bộ.



Biểu đồ 3. 1. Sơ đồ kết quả tuyển chọn bệnh nhân, bệnh phẩm môi trường

3.1. Căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy

Căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây VPLQTM được đánh giá trên 47 BN được chẩn đoán xác định mắc VPLQTM.

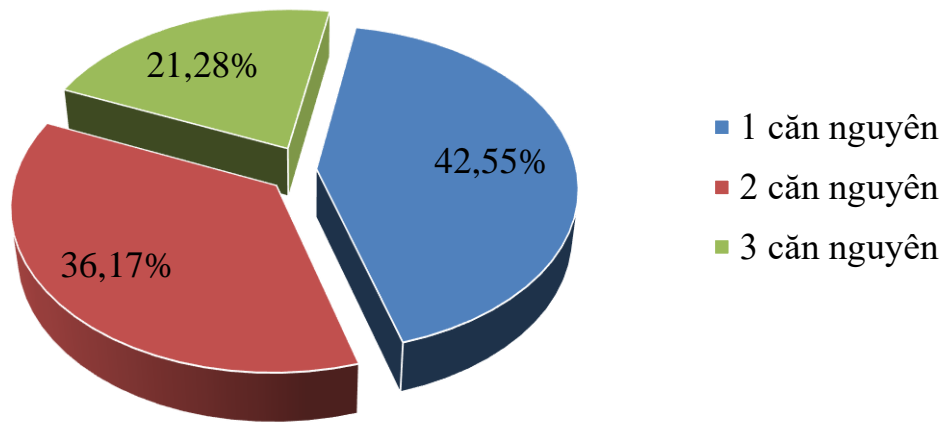
3.1.1. Phân bố căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy

Bảng 3. 1. Căn nguyên gây viêm phổi liên quan thở máy

| Vi khuẩn | Số BN (n = 47) | Tỷ lệ (%) |
|--------------------------|----------------|-----------|
| <i>A. baumannii</i> | 38 | 80,85 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 23 | 48,94 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 14 | 29,79 |
| <i>S. aureus</i> | 10 | 21,28 |
| <i>E. coli</i> | 3 | 6,38 |
| <i>S. maltophilia</i> | 2 | 4,26 |
| <i>A. nosocomiales</i> | 2 | 4,26 |
| <i>H. influenza</i> | 2 | 4,26 |
| <i>P. mirabilis</i> | 1 | 2,13 |
| <i>E. meningoseptica</i> | 1 | 2,13 |
| <i>S. marcescens</i> | 1 | 2,13 |
| <i>B. cepacia</i> | 1 | 2,13 |
| <i>S. pneumoniae</i> | 1 | 2,13 |

Nhận xét: Các căn nguyên gây VPLQTM gặp phổ biến là các vi khuẩn Gram âm, trong đó hàng đầu là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*. Trong các vi khuẩn Gram dương, căn nguyên gặp nhiều nhất là *S. aureus* và cũng là căn nguyên thường gặp thứ 4.

3.1.2. Thực trạng đồng nhiễm căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM

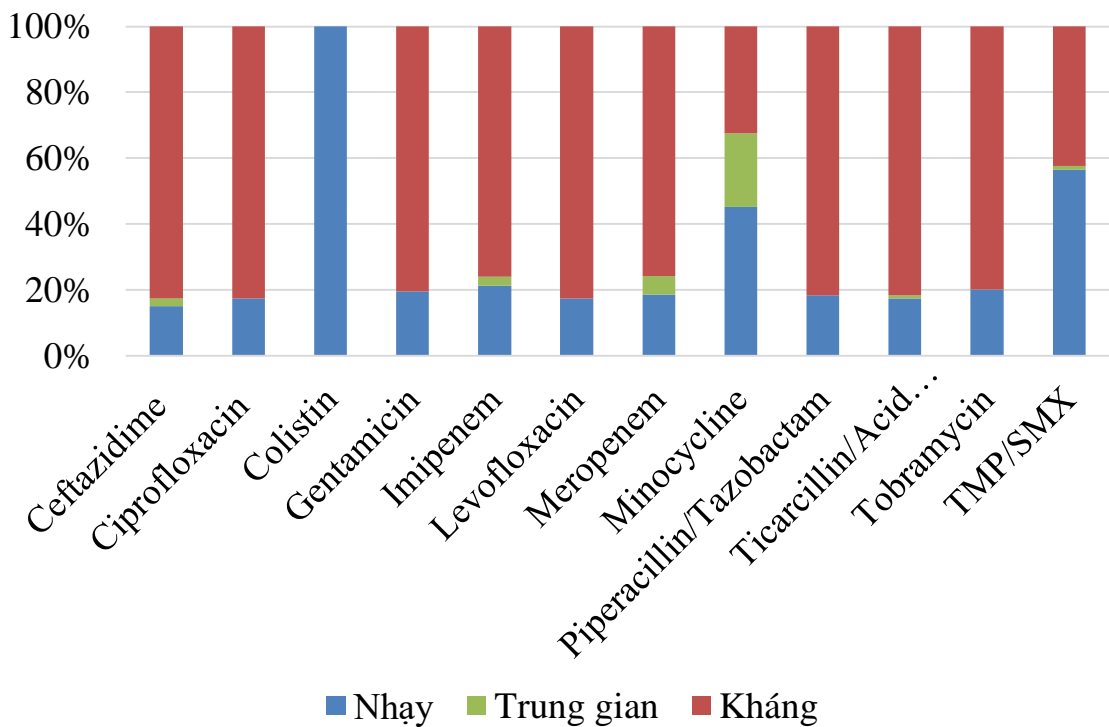


Biểu đồ 3. 2. Thực trạng đồng nhiễm căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy (n=47)

Nhận xét: 27/47 BN (57,45%) đồng nhiễm từ 2 căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM trở lên.

3.1.3. Đặc điểm kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây VPLQTM

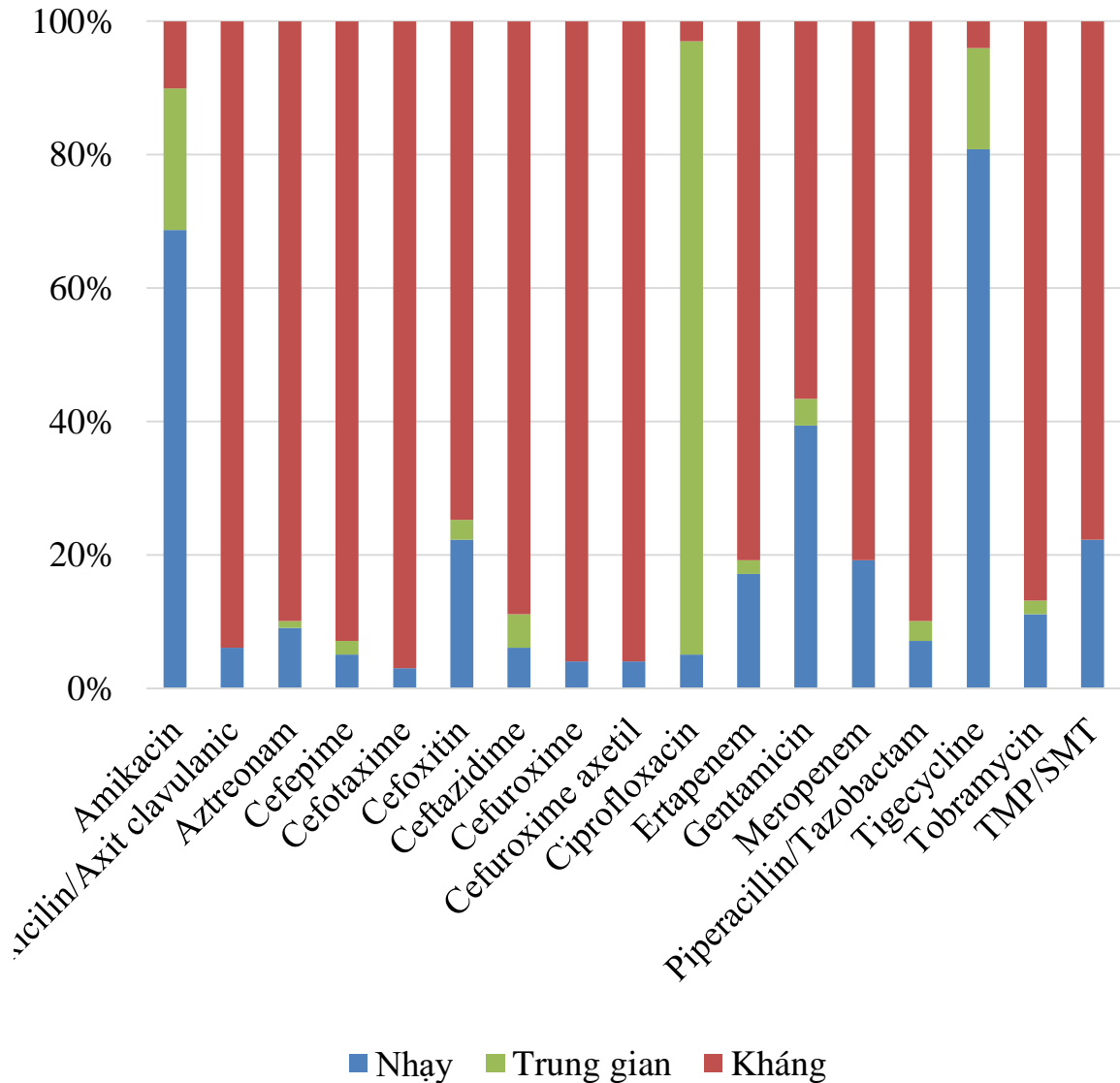
a) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. baumannii*



Biểu đồ 3. 3. Đặc điểm kháng kháng sinh của *A. baumannii* (n=38)

Nhận xét: các chủng *A. baumannii* trong nghiên cứu đã kháng với hầu hết các kháng sinh với tỷ lệ cao nhưng còn ghi nhận nhạy cảm với một số kháng sinh như minocycline, trimethoprim/sulfamethoxazol và 100% các chủng còn nhạy cảm với colistin.

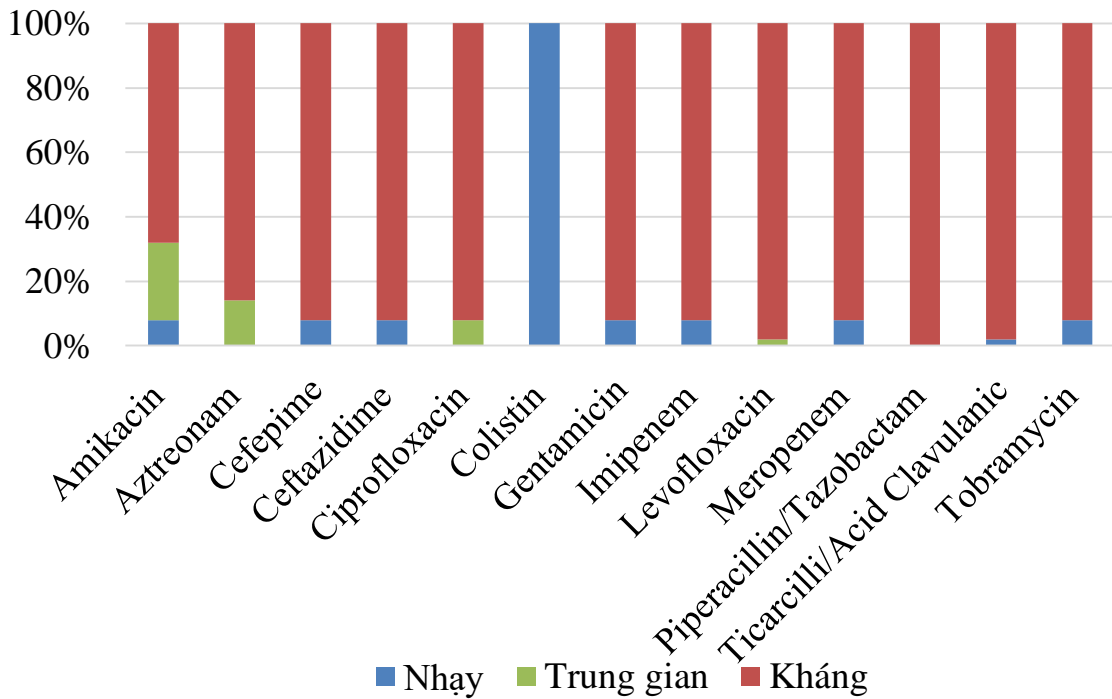
b) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *K.pneumoniae*



Biểu đồ 3. 4. Đặc điểm kháng kháng sinh của *K. pneumoniae* (n=23)

Nhận xét: trên 90% các chủng *K.pneumoniae* trong nghiên cứu đã kháng cephalosporin, trên 80% đã kháng carbapenem. Một số kháng sinh còn ghi nhận nhạy cảm ở mức trung bình (amikacin, tigecycline, gentamicin).

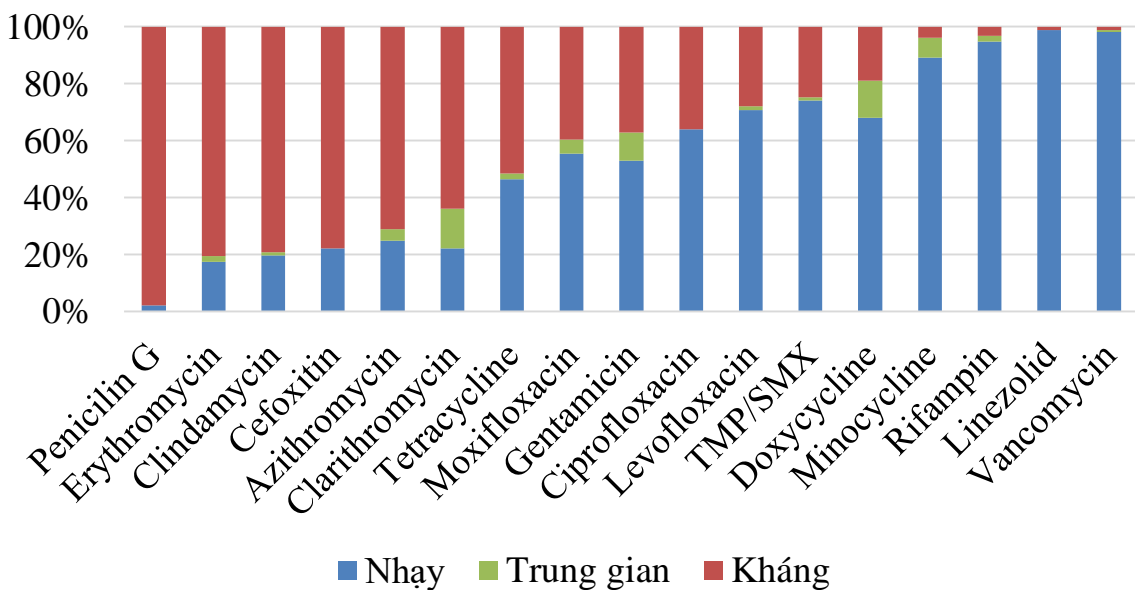
c) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *P. aeruginosa*



Biểu đồ 3. 5. Đặc điểm kháng kháng sinh của *P. aeruginosa* (n=14)

Nhận xét: các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu đã kháng tới trên 90% với hầu hết các kháng sinh. Duy nhất colistin còn nhạy cảm 100%.

d) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *S. aureus*



Biểu đồ 3. 6. Đặc điểm kháng kháng sinh của *S. aureus* (n=10)

Nhận xét: các chủng *S. aureus* còn nhạy trên 90% với nhiều kháng sinh (rifampin, vancomycin, linezolid). Nghiên cứu không ghi nhận sự khác biệt lớn về đề kháng của *S. aureus* với vancomycin và linezolid. MRSA chiếm 77,80%.

3.1.4. Yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc trên bệnh nhân

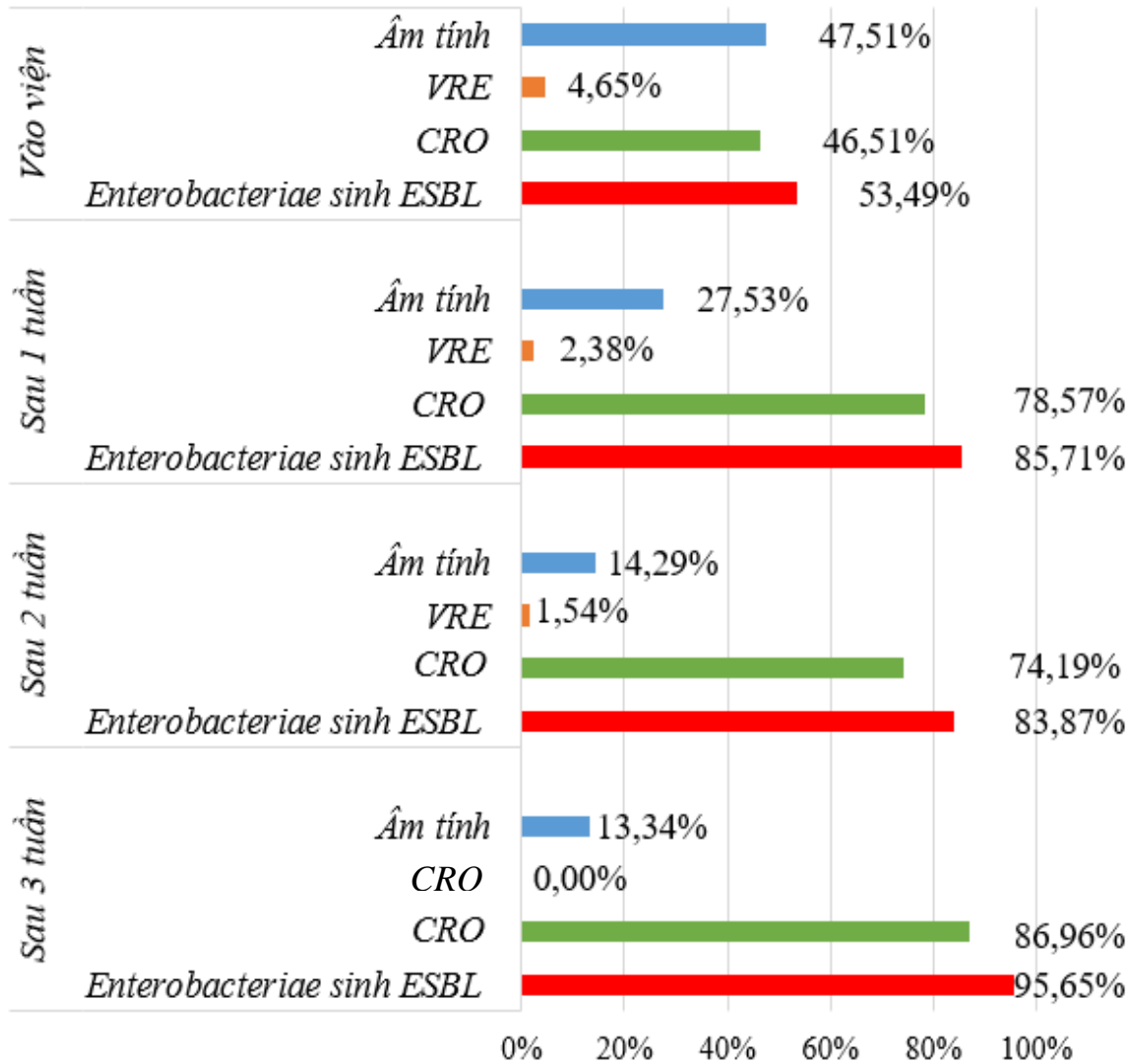
Bảng 3. 2. Mô hình hồi quy các yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc (n=47)

| Yếu tố tiên lượng | Odds ratio | P value | 95% CI |
|---|------------|---------|-------------|
| Tuổi > 65 | 0,997 | 0,545 | 0,99 - 1,01 |
| Giới nam | 0,813 | 0,534 | 0,42 - 1,56 |
| Chuyển từ các BV khác đến | 0,634 | 0,519 | 0,16 - 2,53 |
| Có sử dụng kháng sinh trong vòng 90 ngày trước vào viện | 1 | - | - |
| Có sử dụng kháng sinh trong đợt bệnh này trước vào viện | 1,306 | 0,373 | 0,72 - 2,35 |
| Có tiền sử nhập viện khác trong 1 năm qua | 0,85 | 0,591 | 0,47 - 1,53 |
| Đã được can thiệp các thủ thuật trước khi vào khoa HSTC | 0,98 | 0,964 | 0,15 - 2,31 |
| Có các bệnh lý mạn tính | 1,64 | 0,132 | 0,86 - 3,12 |
| Thời gian nằm viện \geq 14 ngày | 0,92 | 0,001 | 0,89 - 0,95 |

Nhận xét: Kết quả phân tích hồi quy đơn biến các yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc cho thấy hầu hết các biến số được đưa vào phân tích đều có $p > 0,1$ tức là không thấy sự khác biệt về nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc khi BN có hay không có các yếu tố này. Duy nhất biến thời gian nằm viện \geq 14 ngày có $p = 0,001$ tức là nhóm BN nằm viện \geq 14 ngày có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc cao hơn nhóm nằm viện dưới 14 ngày. Do

chỉ có 1 yếu tố nguy cơ có $p < 0,1$ nhóm nghiên cứu không tiến hành phân tích mô hình hồi quy đa biến các yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc.

3.1.5. Thực trạng mang vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường hô hấp của bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy



Biểu đồ 3. 7. Thực trạng mang vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường hô hấp của bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy (n=47)

Nhận xét: Bệnh phẩm đường hô hấp có sự ưu thế của các vi khuẩn ESBL-PE và CRO, trong khi VRE lại có tỷ lệ rất thấp. Ngay tại thời điểm nhập khoa, 52,49% BN đã mang ít nhất 1 vi khuẩn đa kháng thuốc trong bệnh phẩm đường hô hấp. Trong thời gian nằm viện, tỷ lệ này gia tăng dần với các chủng ESBL-

PE và CRO nhưng giảm dần với các chủng VRE.

3.2. Đánh giá kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

3.2.1. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

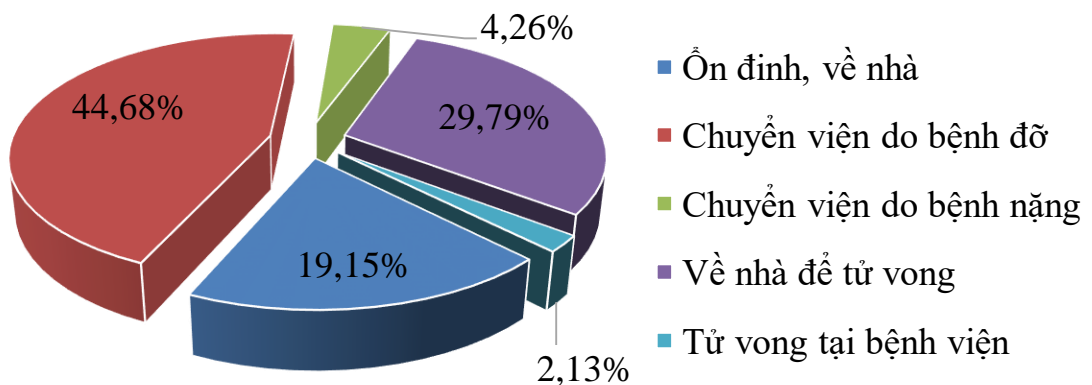
Bảng 3. 3. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

| Thông số | | Giá trị (n=47) | |
|--|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| Thời gian nằm viện trung bình (ngày) | | 28,0 ± 18,0 | |
| Điểm APACHE II trung bình tại thời điểm nhập viện | | 10,6 ± 5,5 | |
| Điểm qSOFA | 1 | 27 (57,45%) | |
| | 2 | 16 (34,04%) | |
| | 3 | 4 (8,51%) | |
| Có sử dụng kháng sinh trong vòng 90 ngày trước nhập viện | | 28 (59,56%) | |
| Có nằm viện trong vòng 1 năm trước lần nhập viện này | | 26 (55,32%) | |
| Bệnh lý nền | Bệnh lý tim mạch | 13 (27,66%) | |
| | Đái tháo đường | 8 (17,02%) | |
| | Nghiện rượu | 8 (17,02%) | |
| | Bệnh lý hô hấp | 4 (8,51%) | |
| | Sử dụng thuốc ức chế miễn dịch | 3 (6,38%) | |
| | Nghiện thuốc lá | 3 (6,38%) | |
| | Phẫu thuật trong vòng 3 tháng qua | 3 (6,38%) | |
| | Xơ gan | 2 (4,26%) | |
| | Ung thư | 2 (4,26%) | |
| | Suy thận mạn có lọc máu chu kỳ | 1 (2,13%) | |
| | Vào thẳng | 3 (6,38%) | |
| | Tình trạng chuyển tuyến | Từ tuyến trung ương | 16 (34,04%) |
| | | Từ tuyến tỉnh | 25 (53,19%) |
| | Từ tuyến huyện | 3 (6,38%) | |

Nhận xét: trên 50% BN đã từng sử dụng kháng sinh trong vòng 90 ngày trước nhập viện hoặc có nằm viện trong vòng 1 năm trước lần nhập viện này. Phần lớn BN (93,62%) được chuyển từ các BV khác đến, trong đó đa số đến từ các BV tuyến tỉnh. Các bệnh lý nền gặp phổ biến nhất là bệnh lý tim mạch, đái tháo đường và nghiện rượu.

3.2.2. Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện

a) Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện



Biểu đồ 3. 8. Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện (n=47)

Nhận xét: Tỷ lệ tử vong, xin về để tử vong và chuyển do bệnh nặng là 36,18%.

b) Điểm MRS của bệnh nhân tại thời điểm ra viện

Bảng 3. 4. Điểm MRS của bệnh nhân tại thời điểm xuất viện

| MRS | Số BN (n=47) | Tỷ lệ % |
|-------------|--------------|------------|
| 0 | 1 | 2,13 |
| 1 | 3 | 6,38 |
| 2 | 3 | 6,38 |
| 3 | 6 | 12,77 |
| 4 | 7 | 14,89 |
| 5 | 26 | 55,32 |
| 6 | 1 | 2,13 |
| Tổng | 47 | 100 |

Nhận xét: Đa số BN xuất viện có điểm MRS từ 4 trở lên (72,34%) tức là có giảm khả năng lao động vừa và nặng, chỉ có 1 BN (2,13%) hoàn toàn bình phục với điểm MRS là 0.

3.2.3. Các thuốc, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân

a) Các can thiệp, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân

Bảng 3. 5. Các can thiệp, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân

| Loại can thiệp | Số BN (n=47) | Tỷ lệ % |
|---|--------------|---------|
| Thở máy xâm nhập (n=47) | 47 | 100.00 |
| Đặt nội khí quản (n=46) | 42 | 89.36 |
| Mở khí quản (n=45) | 37 | 78.72 |
| Đặt catheter tĩnh mạch trung tâm (n=46) | 43 | 91.49 |
| Đặt catheter động mạch (n=42) | 9 | 19.15 |
| Đặt sonde tiểu | 47 | 100.00 |
| Đặt sonde dạ dày | 47 | 100.00 |
| Dẫn lưu não thất (n=42) | 1 | 2.13 |
| Chọc/dẫn lưu dịch các màng (n=43) | 5 | 10.64 |
| Cắt lọc vết thương/vết loét (n=42) | 2 | 4.26 |
| ECMO/lọc máu/lọc huyết tương (n=43) | 13 | 27.66 |

Nhận xét: Toàn bộ BN trong nghiên cứu được thực hiện tối thiểu 3 can thiệp là thở máy xâm nhập, đặt sonde dạ dày và đặt sonde tiểu.

b) Thời gian duy trì các can thiệp, thủ thuật trên bệnh nhân

Bảng 3. 6. Thời gian duy trì các can thiệp, thủ thuật (n=47)

| Loại can thiệp | Số ngày trung bình thực hiện các can thiệp | Min | Max |
|------------------------------|--|-----|-----|
| Thở máy xâm nhập | 29,7 ± 20,2 | 2 | 102 |
| Đặt nội khí quản | 11,5 ± 8,7 | 2 | 64 |
| Mở khí quản | 24,5 ± 14,9 | 4 | 69 |
| Đặt catheter TMTT | 25,9 ± 21,2 | 3 | 107 |
| Đặt catheter động mạch | 10,6 ± 7,0 | 2 | 32 |
| Đặt sonde tiểu | 25,3 ± 14,8 | 5 | 64 |
| Đặt sonde dạ dày | 25,9 ± 16,0 | 2 | 64 |
| ECMO/lọc máu/lọc huyết tương | 11 ± 5,9 | 2 | 50 |

Nhận xét: thời gian duy trì các can thiệp tương đối dài, trung bình trên 20 ngày.

c) Tình hình sử dụng kháng sinh trên bệnh nhân

Bảng 3. 7. Tình hình sử dụng kháng sinh trên bệnh nhân

| Tình hình sử dụng kháng sinh | | Tử vong (n=17) | Sống (n=30) | p |
|-------------------------------|----------------|----------------|-------------|------|
| Kháng sinh ban đầu | Phù hợp | 7 (41,18%) | 21 (70,00%) | 0,51 |
| | Không phù hợp | 10 (58,82%) | 9 (30,00%) | |
| Phối hợp kháng sinh | 2 kháng sinh | 4 (23,53%) | 10 (33,33%) | 0,08 |
| | 3 kháng sinh | 8 (47,06%) | 15 (50,00%) | |
| | ≥ 4 kháng sinh | 5 (29,41%) | 5 (16,67%) | |
| Thời gian điều trị kháng sinh | ≤ 7 ngày | 2 (11,76%) | 6 (20,00%) | 0,78 |
| | 8-14 ngày | 5 (29,41%) | 3 (10,00%) | |
| | 15-21 ngày | 3 (17,64%) | 3 (10,00%) | |
| | ≥ 22 ngày | 7 (41,18%) | 18 (60,00%) | |
| | Trung bình | 23,7 ± 17,7 | 26,4 ± 19,5 | |

Nhận xét: Kháng sinh ban đầu được chỉ định phù hợp với căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM ở 70,00% BN nhóm sống và 41,18% BN nhóm tử vong, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nhóm BN được chỉ định dùng phối hợp từ 3 kháng sinh trở lên chiếm tỷ lệ cao nhất, trong đó những BN được chỉ định dùng từ 4 kháng sinh trở lên là dùng các kháng sinh điều trị lao phổi hợp với kháng sinh điều trị viêm phổi do vi khuẩn khác. Thời gian điều trị kháng sinh trung bình là trên 3 tuần, trong đó ngắn hơn ở nhóm tử vong so với nhóm sống nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

3.2.4. *Tổn thương trên phim X-quang phổi tại thời điểm chẩn đoán VPLQTM*

Bảng 3. 8. Tổn thương trên phim X-quang phổi

| Tổn thương phổi | | Số BN (n=47) | Tỷ lệ % |
|----------------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| Thâm nhiễm | Có thâm nhiễm | 35 | 74,47 |
| | - Thùy đỉnh phổi phải | 29 | 82,86 |
| | - Thùy giữa phổi phải | 33 | 94,29 |
| | - Thùy dưới phổi phải | 18 | 51,43 |
| | - Thùy đỉnh phổi trái | 25 | 71,43 |
| | - Thùy dưới phổi trái | 12 | 34,29 |
| Đông đặc | | 12 | 25,53 |
| Tràn dịch màng phổi | | 13 | 27,66 |

Nhận xét: tại thời điểm được chẩn đoán mắc VPLQTM, 74,47% BN có tổn thương thâm nhiễm trên phim X-quang, trong đó tổn thương gặp nhiều nhất ở thùy giữa phổi phải, thùy đỉnh phổi phải và thùy đỉnh phổi trái. Ngoài ra, còn gặp tổn thương đông đặc gặp và tràn dịch màng phổi.

3.2.5. Các yếu tố tiên lượng tử vong trên bệnh nhân

Bảng 3. 9. Mô hình hồi quy các yếu tố tiên lượng tử vong (n=47)

| Yếu tố tiên lượng | Odds ratio | P value | 95% CI |
|---|------------|---------|-------------|
| Tuổi > 65 | 0.99 | 0.776 | 0.95 - 1.04 |
| Giới nam | 0.40 | 0.227 | 0.90 - 1.77 |
| Chuyển từ các BV khác đến | 1 | - | - |
| Có sử dụng kháng sinh trong vòng 90 ngày trước vào viện | 1 | - | - |
| Có sử dụng kháng sinh trong đợt bệnh này trước vào viện | 0.95 | 0.937 | 0.28 - 3.20 |
| Có tiền sử nhập viện khác trong 1 năm qua | 0.37 | 0.112 | 0.11 - 1.26 |
| Đã được can thiệp các thủ thuật trước khi vào khoa HSTC | 2.46 | 0.438 | 0.25 - 24.0 |
| Có các bệnh lý mạn tính | 1.06 | 0.925 | 0.31 - 3.67 |
| Thời gian nằm viện \geq 14 ngày | 0.94 | 0.008 | 0.89 - 0.98 |

Nhận xét: Kết quả phân tích hồi quy đơn biến các yếu tố tiên lượng tử vong cho thấy hầu hết các biến số được đưa vào phân tích đều có giá trị $p > 0,1$ tức là không tìm thấy sự khác biệt về nguy cơ tử vong khi BN có hay không mang các yếu tố này. Chỉ duy nhất một yếu tố là thời gian nằm viện ≥ 14 ngày có giá trị $p = 0,008$ tức là nhóm BN nằm viện trên 14 ngày có nguy cơ tử vong cao hơn nhóm nằm viện dưới 14 ngày. Do chỉ có 1 yếu tố nguy cơ có $p < 0,1$ nên nhóm nghiên cứu không tiến hành phân tích mô hình hồi quy đa biến về các yếu tố tiên lượng tử vong.

3.3. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

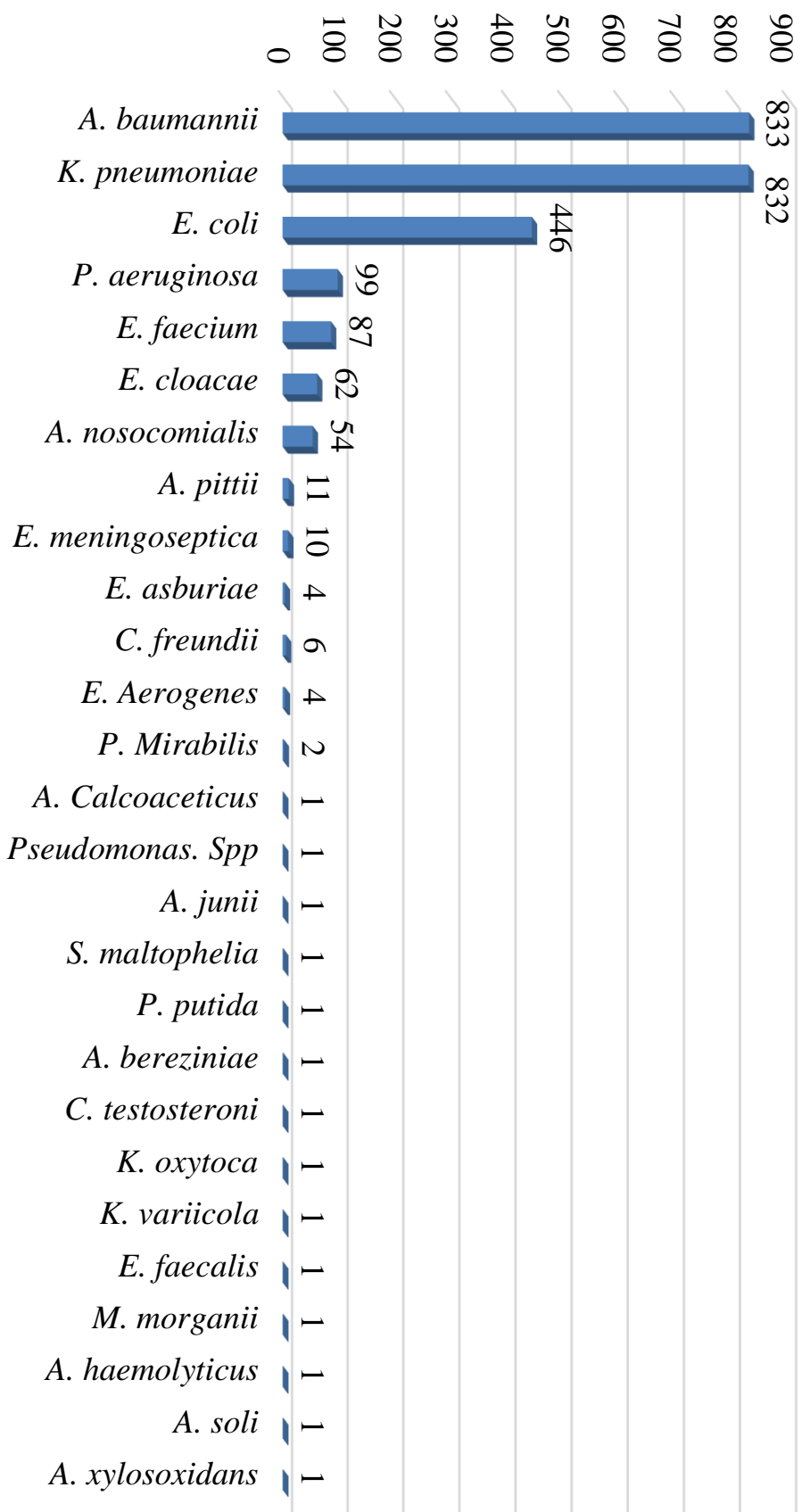
Nhằm xác định được toàn diện các cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc, tránh bỏ sót các cụm lây truyền do thiếu những mắt xích (chính là những BN) trong cụm lây truyền, việc xây dựng đường lây truyền được thực hiện trên các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc phân lập được từ 4 loại bệnh phẩm (đờm, phân, nước tiểu, mủ vết thương) của tất cả BN (196 BN) nằm tại khoa HSTC (bao gồm 47 BN VPLQTM và 149 BN khác) và mẫu môi trường (150 mẫu) khu vực xung quanh giường bệnh trong thời gian nghiên cứu (7/2017 – 1/2018).

3.3.1. Phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen

Nhận xét: 2775 chủng vi khuẩn nuôi cấy dương tính (phát hiện 27 loài vi khuẩn) từ 196 BN và 150 mẫu môi trường được đưa vào chuẩn hóa để giải trình tự gen. Sau chuẩn hóa, 311 chủng vi khuẩn bị loại (63 chủng có chất lượng lắp ráp kém, 182 chủng nghi ngờ có nhiễm bản giữa các loài và 65 chủng nghi ngờ có nhiễm bản trong cùng loài), 2464 chủng đủ chất lượng có thể đưa vào giải trình tự gen. 311 chủng bị loại bao gồm 114 chủng *A. baumannii*, 56 chủng *K. pneumoniae*, 44 chủng *E. Coli* và 97 chủng của 24 loài vi khuẩn còn lại; thu được từ 152 trong tổng số 196 BN và 19 trong tổng số 150 mẫu môi trường, trải dài trong cả 6 tháng tiến hành nghiên cứu. Như vậy, các mẫu bị loại mang tính ngẫu nhiên, không tập trung ở 1 nhóm BN cụ thể, 1 nhóm mẫu môi trường đặc biệt hay 1 khoảng thời gian nhất định nào đó của nghiên cứu.

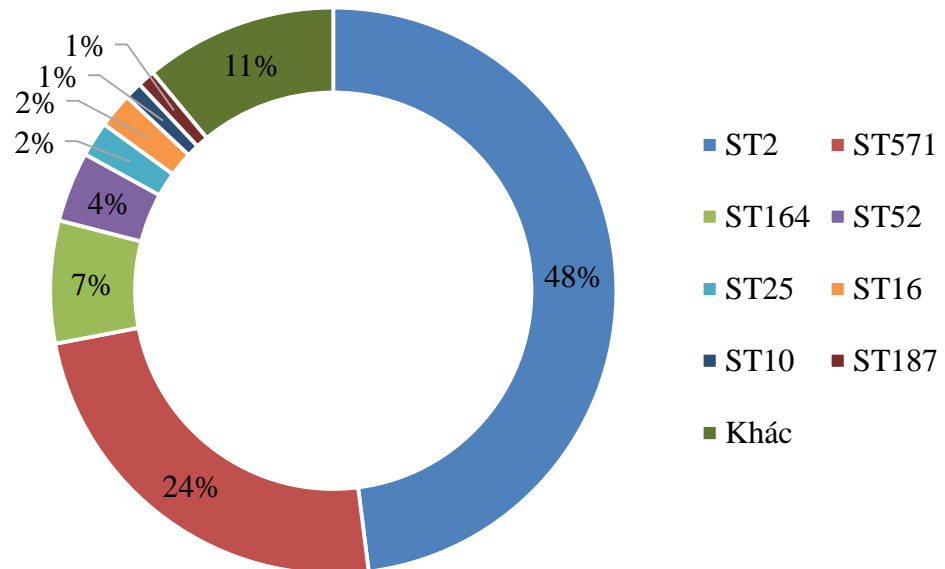
Trong các chủng có thể đưa vào giải trình tự gen, 3 loài vi khuẩn *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* chiếm tới 85,67% (2111/2464 chủng). Vì vậy, nghiên cứu chỉ tập trung giải trình tự gen của 2111 chủng của 3 loài vi khuẩn trên (bao gồm 1898 chủng từ bệnh nhân và 213 chủng từ môi trường) nhằm xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc này.

Biểu đồ 3. 9. Phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen



3.3.2. Phân bố các Sequence Types (STs) của vi khuẩn

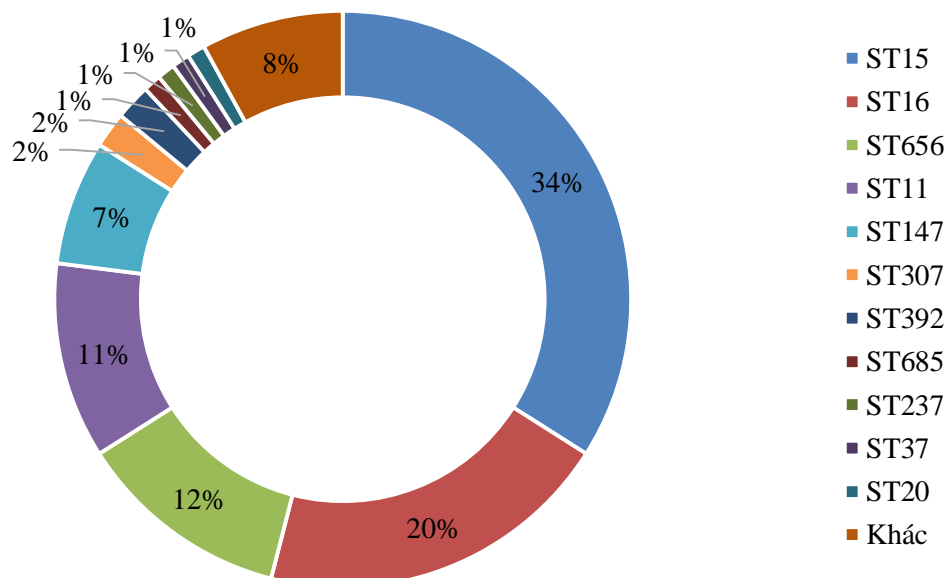
a) Phân bố các STs của *A. baumannii*



Biểu đồ 3. 10. Phân bố các STs của *A. baumannii* (n=833)

Nhận xét: Kết quả giải trình tự gen ghi nhận 57 STs của *A. baumannii* với sự nổi trội của ST2 và ST571.

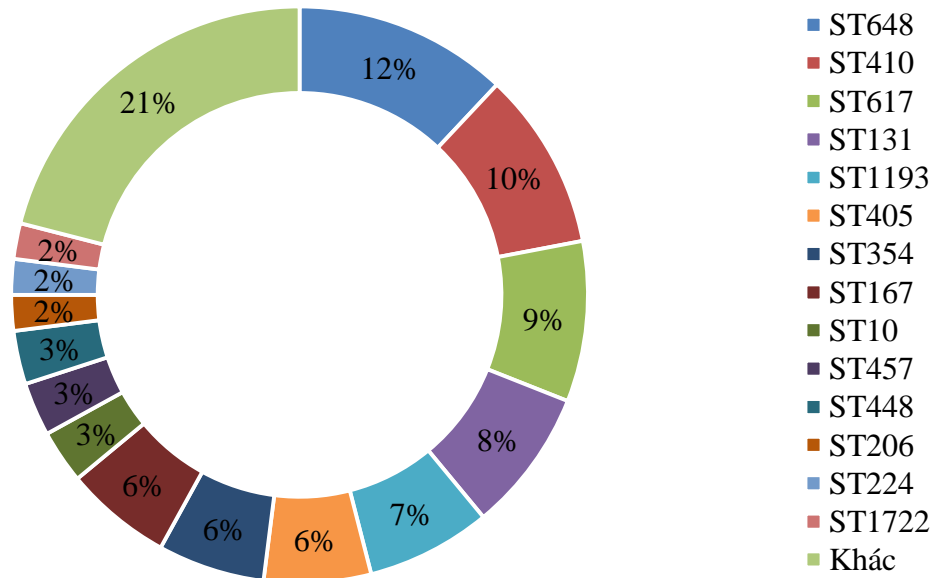
b) Phân bố các STs của *K. pneumoniae*



Biểu đồ 3. 11. Phân bố các STs của *K. pneumoniae* (n=832)

Nhận xét: Kết quả giải trình tự gen ghi nhận 68 STs của *K. pneumoniae* với sự nổi trội của 5 ST: ST15, ST16, ST656, ST11 và ST147.

c) Phân bố các STs của *E. coli*



Biểu đồ 3. 12. Phân bố các STs của *E. coli* (n=446)

Nhận xét: Kết quả giải trình tự gen cho thấy sự đa dạng các STs của *E. coli* với 80 STs, trong đó chiếm ưu thế là ST648, ST410, ST617, ST131 và ST1193. 33 trong số 80 STs chỉ được phát hiện 1 lần duy nhất.

3.3.3. Gen kháng thuốc của các loài vi khuẩn

Nhận xét: Các gen kháng thuốc gặp phổ biến ở các chủng *A. baumannii* là *blaOXA* và *blaTEM*. Đối với các chủng *K. pneumoniae*, số lượng các gen kháng thuốc gặp phổ biến khá nhiều, bao gồm *blaNDM*, *blaOXA*, *blaKPC*, *blaCTX*, *blaSHV*, *blaTEM*. Tương tự như vậy, các chủng *E. coli* cũng có nhiều gen kháng thuốc phổ biến như *blaNDM*, *blaOXA*, *blaCTX*, *blaTEM*, *blaCMY* và *blaEC*.

Bảng 3. 10. Các gen kháng thuốc của các loài vi khuẩn

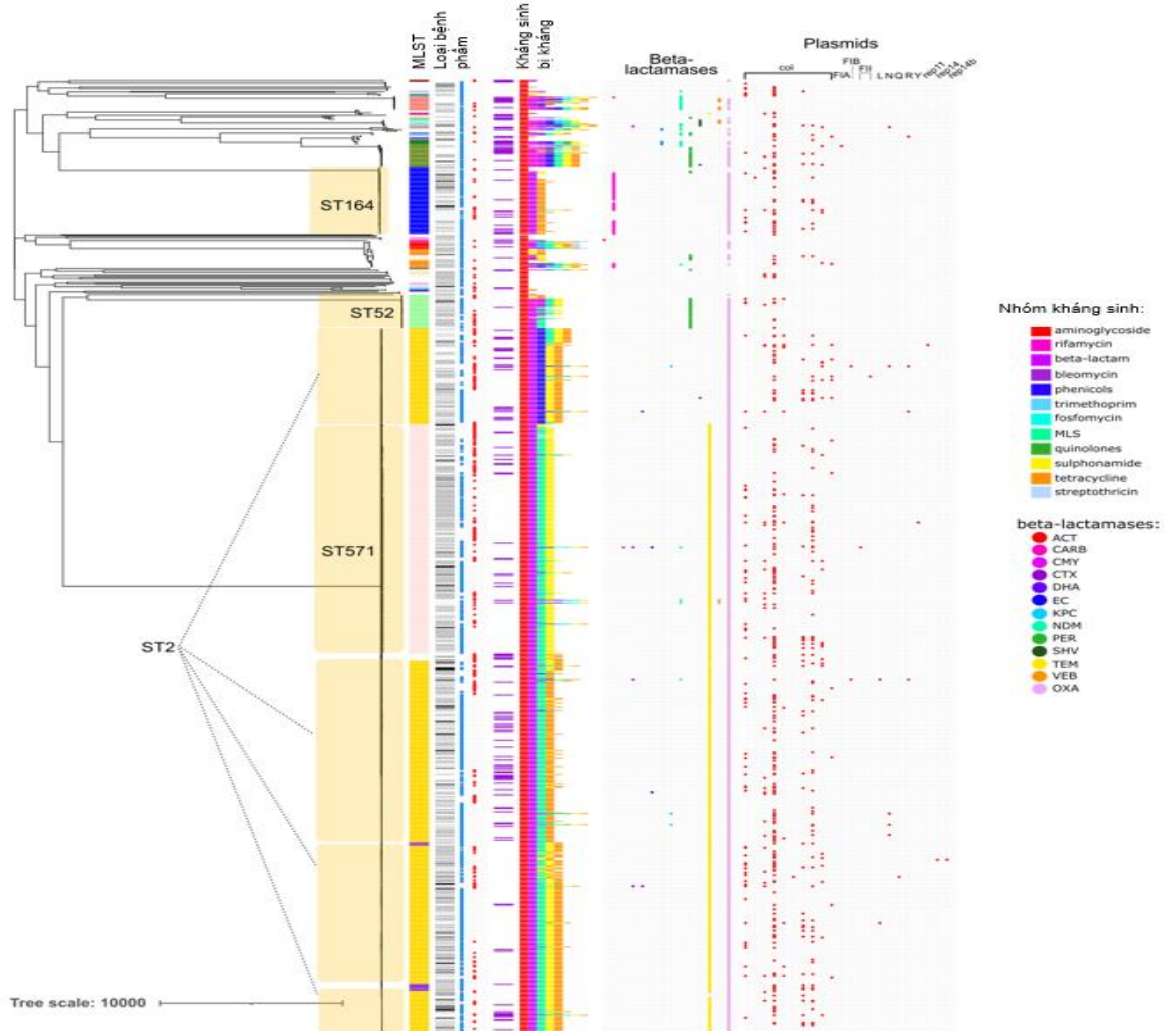
| Gen kháng thuốc Beta-lactamase | <i>A. baumannii</i> (n= 833) | | <i>K. pneumoniae</i> (n= 832) | | <i>E. coli</i> (n= 446) | |
|--------------------------------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------|--------|
| | n | % | n | % | n | % |
| <i>Class C:</i> | | | | | | |
| EC | 2 | 0,24 | 0 | 0,00 | 446 | 100,00 |
| ACT | 1 | 0,12 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| CMY | 1 | 0,12 | 1 | 0,12 | 129 | 28,92 |
| DHA | 2 | 0,24 | 15 | 1,80 | 16 | 3,59 |
| <i>Class A:</i> | | | | | | |
| LAP | 0 | 0,00 | 90 | 10,82 | 11 | 2,47 |
| CARB | 47 | 5,64 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| PER | 51 | 6,12 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| TEM | 520 | 62,42 | 434 | 52,16 | 215 | 48,21 |
| SHV | 7 | 0,84 | 819 | 98,44 | 4 | 0,90 |
| VEB | 9 | 1,08 | 2 | 0,24 | 0 | 0,00 |
| CTX | 3 | 0,36 | 431 | 51,80 | 379 | 84,98 |
| KPC | 2 | 0,24 | 375 | 45,07 | 58 | 13,00 |
| <i>Class D:</i> | | | | | | |
| OXA | 743 | 89,20 | 387 | 46,51 | 155 | 34,75 |
| <i>Class B:</i> | | | | | | |
| IMP | 4 | 0,48 | 1 | 0,12 | 0 | 0,00 |
| NDM | 26 | 3,12 | 453 | 54,45 | 107 | 23,99 |

Màu xám: gen sinh ESBL

Màu vàng: gen sinh carbapenemase

3.3.4. Cây phát sinh loài của các vi khuẩn

a) Cây phát sinh loài của *A. baumannii*



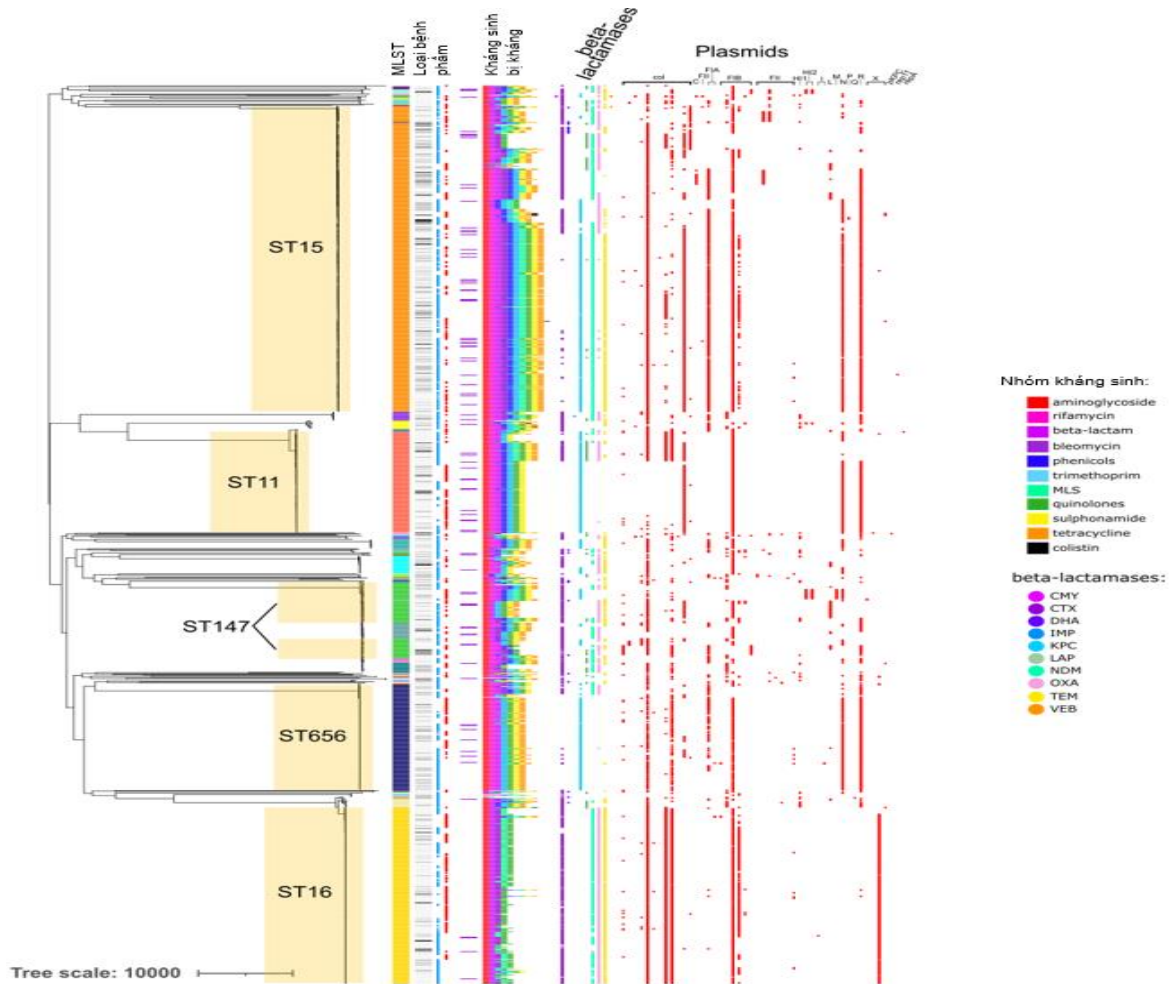
Chú thích cột dữ liệu: Cột đầu tiên bên trái: dữ liệu trình tự đa điểm (Multilocus sequence type – MLST); 4 cột tiếp theo: loại bệnh phẩm (bệnh phẩm của BN và bệnh phẩm môi trường); Cột tiếp theo: các nhóm kháng sinh đã bị kháng; Cột tiếp theo: các betalactamase; Cột tiếp theo: các nhóm plasmid.

Biểu đồ 3. 13. Cây phát sinh loài của *A. baumannii* tương ứng với các kháng sinh bị kháng, các beta-lactamase và các loại plasmid (n=833)

Nhận xét: Cây phát sinh loài của *A. baumannii* cho thấy đa số các chủng được phát hiện trong nghiên cứu đều thuộc global clone (GC)2, trong đó chủ yếu là ST2 và ST571. Việc đề kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng như

việc mang các gen beta-lactamase và các nhóm plasmid là đặc điểm tương đối đồng nhất của các dòng vi khuẩn (linage) thuộc cùng một ST.

b) Cây phát sinh loài của *K. pneumoniae*



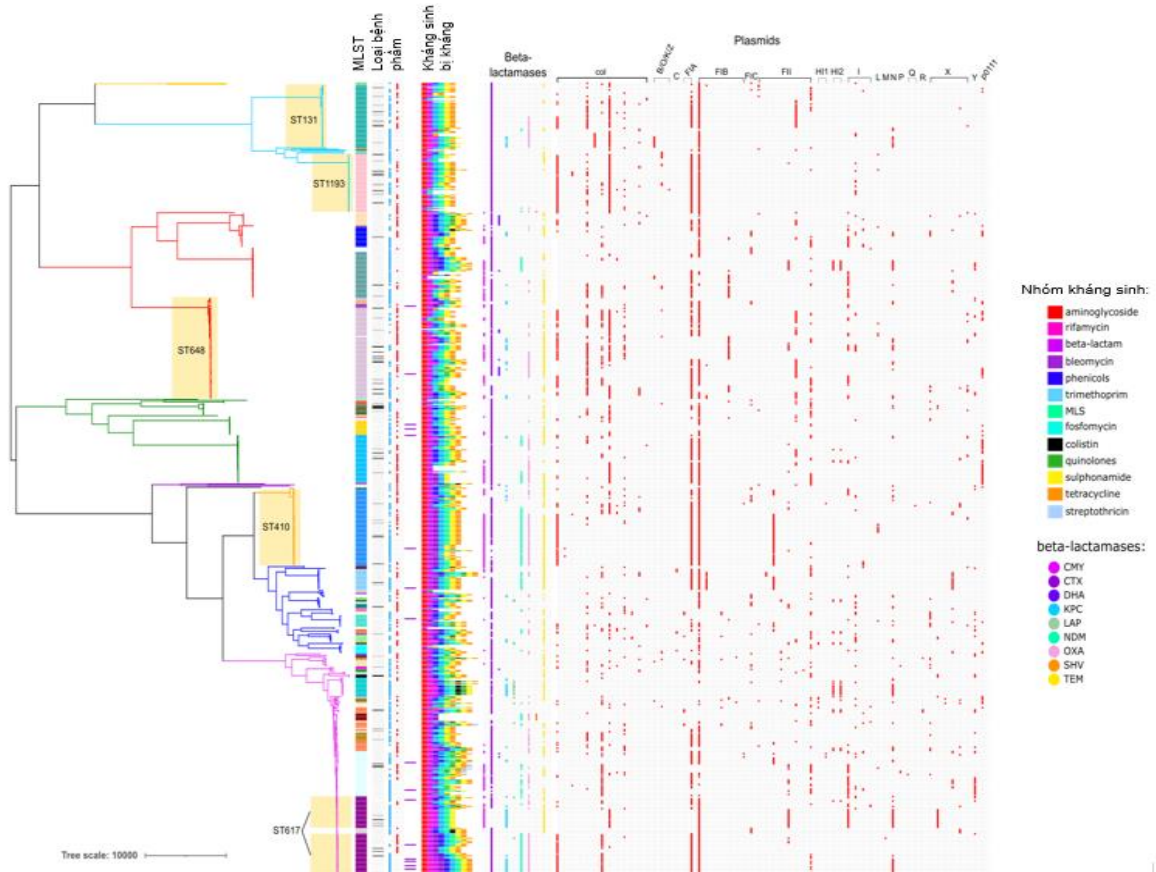
Chú thích cột dữ liệu: Cột đầu tiên bên trái: dữ liệu trình tự đa điểm (Multilocus sequence type – MLST); 4 cột tiếp theo: loại bệnh phẩm (bệnh phẩm của BN và bệnh phẩm môi trường); Cột tiếp theo: các nhóm kháng sinh đã bị kháng; Cột tiếp theo: các betalactamase; Cột tiếp theo: các nhóm plasmid.

Biểu đồ 3. 14. Cây phát sinh loài của *K. pneumoniae* tương ứng với các kháng sinh bị kháng, các beta-lactamase và các loại plasmid (n=832)

Nhận xét: Cây phát sinh loài của *K. pneumoniae* cho thấy đa số các chủng được phát hiện trong nghiên cứu (84%) đều thuộc 5 ST chủ yếu là ST15, ST16, ST656, ST11 và ST147. Việc đề kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng

nhu việc mang các gen beta-lactamase và mang các nhóm plasmid là đặc điểm tương đối đồng nhất của các dòng vi khuẩn (linage) thuộc về cùng một ST.

c) Cây phát sinh loài của *E. coli*



Chú thích cột dữ liệu: Cột đầu tiên bên trái: dữ liệu trình tự đa điểm (Multilocus sequence type – MLST); 4 cột tiếp theo: loại bệnh phẩm (bệnh phẩm của BN và bệnh phẩm môi trường); Cột tiếp theo: các nhóm kháng sinh đã bị kháng; Cột tiếp theo: các betalactamase; Cột tiếp theo: các nhóm plasmid.

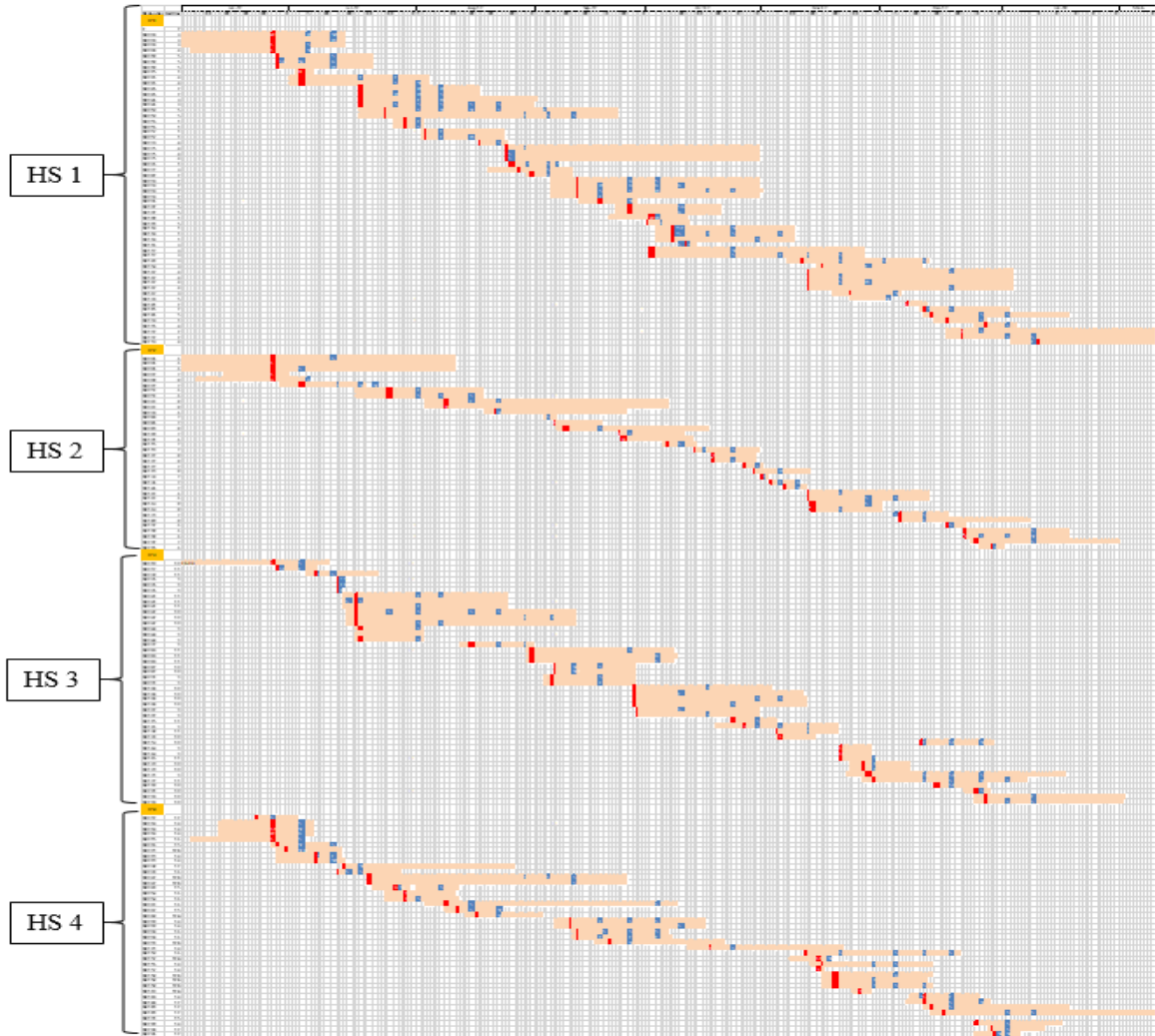
Biểu đồ 3. 15. Cây phát sinh loài của *E.coli* tương ứng với các kháng sinh bị kháng, các beta-lactamase và các loại plasmid (n=446)

Nhận xét: Cây phát sinh loài của *E.coli* cho thấy các chủng được phát hiện rất đa dạng, gồm 8 nhóm phát sinh loài (phylogroup) với 80 STs. Các STs phổ biến bao gồm ST648 (phylogroup A), ST410 (phylogroup C), ST617 (phylogroup A), ST131 (phylogroup B2) và ST1193 (phylogroup B2). Việc đề

kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng như việc mang các gen beta-lactamase và mang các nhóm plasmid rất đa dạng.

3.3.5. Sự xuất hiện các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc theo thời gian nghiên cứu

a) Sự xuất hiện các chủng *A. baumannii* theo thời gian nghiên cứu



Trục tung: cột 1: số phòng hồi sức; cột 2: mã số BN; cột 3: số giường

Trục hoành: thời gian tiến hành nghiên cứu (đơn vị: ngày)

■ thời gian BN nằm viện

■ thời gian bắt đầu thu mẫu

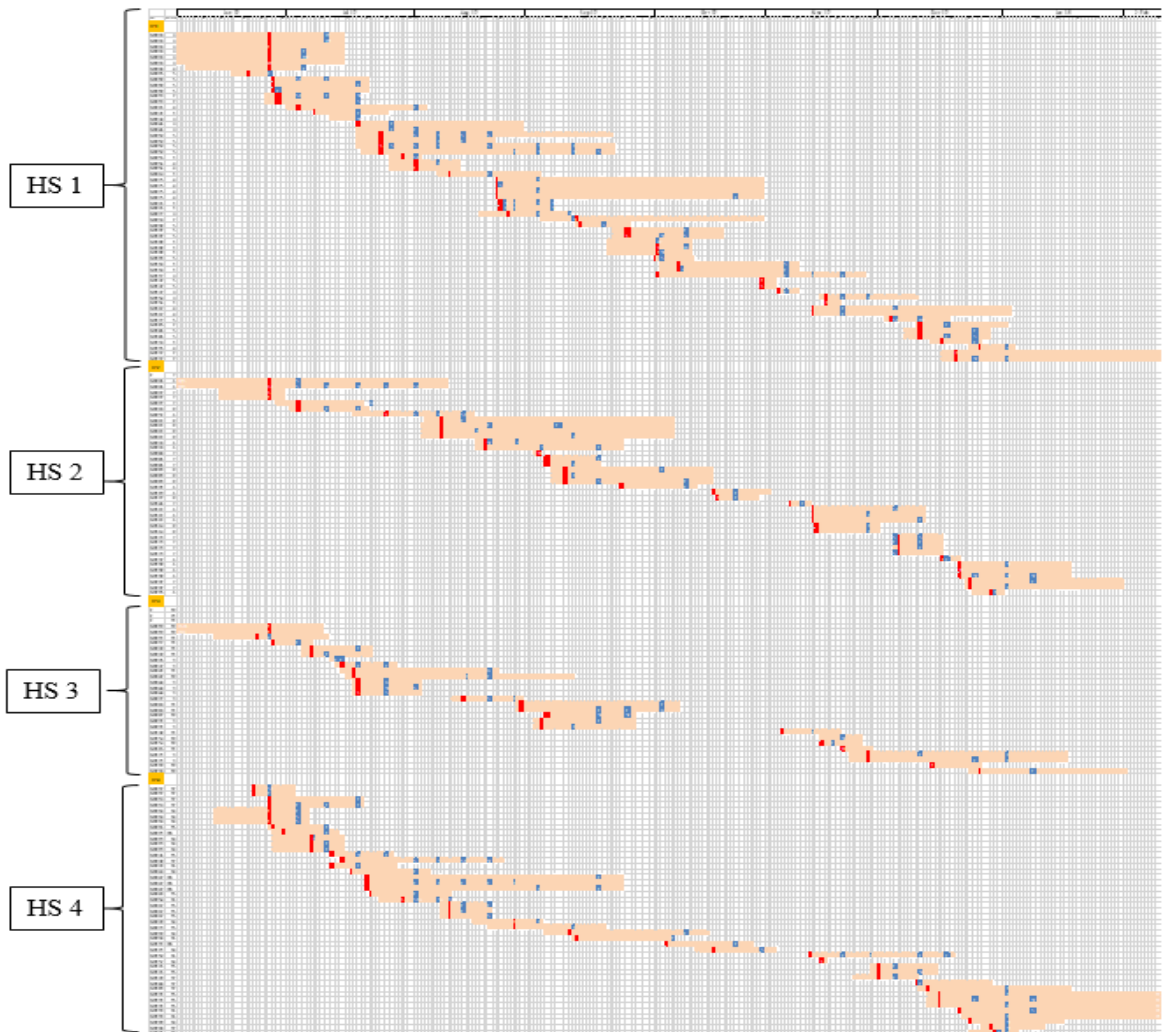
■ thời gian bắt đầu xuất hiện vi khuẩn

Biểu đồ 3. 16. Sự xuất hiện các chủng *A. baumannii* theo thời gian

(n=833)

Nhận xét: Đánh giá sự xuất hiện các chủng *A. baumannii* đa kháng thuốc theo thời gian nghiên cứu cho thấy tại tất cả 4 buồng hồi sức của khoa, thường xuyên có sự xuất hiện các vi khuẩn này trong toàn bộ thời gian nghiên cứu.

b) Sự xuất hiện các chủng *K. pneumoniae* theo thời gian nghiên cứu



Trục tung: cột 1: số phòng hồi sức; cột 2: mã số BN; cột 3: số giường

Trục hoành: thời gian tiến hành nghiên cứu (đơn vị: ngày)

■ thời gian BN nằm viện

■ thời gian bắt đầu thu mẫu

■ thời gian bắt đầu xuất hiện vi khuẩn

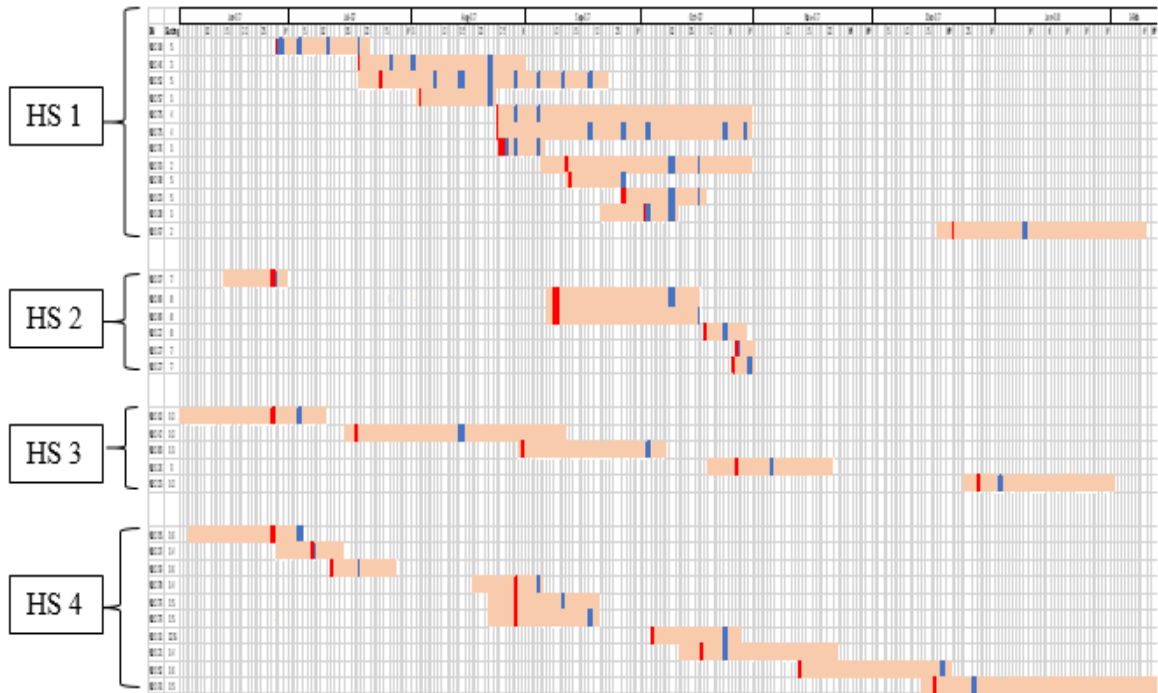
Biểu đồ 3.17. Sự xuất hiện các chủng *K. pneumoniae* theo thời gian

(n=832)

Nhận xét: Đánh giá sự xuất hiện các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc

theo thời gian nghiên cứu cho thấy tại các buồng hồi sức 1, 2 và 4, thường xuyên có sự xuất hiện các vi khuẩn này trong gần như toàn bộ thời gian nghiên cứu. Tuy nhiên, tại buồng hồi sức số 3, có khoảng thời gian tương đối dài (40 ngày) không ghi nhận sự xuất hiện của các chủng *K. pneumoniae*.

c) Sự xuất hiện các chủng *E. coli* theo thời gian nghiên cứu



Trục tung: cột 1: số phòng hồi sức; cột 2: mã số BN; cột 3: số giường

Trục hoành: thời gian tiến hành nghiên cứu (đơn vị: ngày)

■ thời gian BN nằm viện

■ thời gian bắt đầu thu mẫu

■ thời gian bắt đầu xuất hiện vi khuẩn

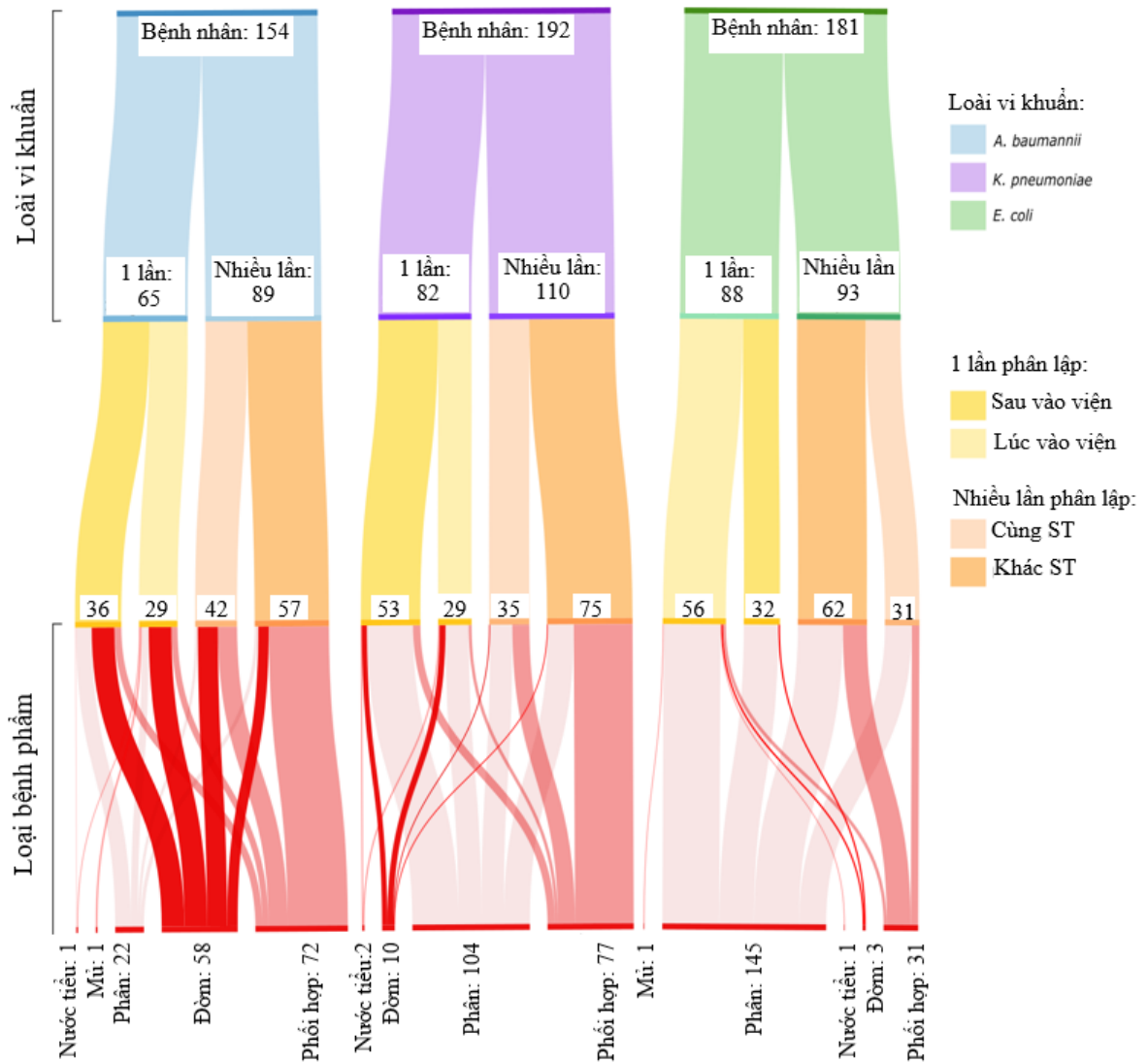
Biểu đồ 3.18. Sự xuất hiện các chủng *E. coli* theo thời gian (n=446)

Nhận xét: Đánh giá sự xuất hiện các chủng *E. coli* theo thời gian nghiên cứu cho thấy tại tất các buồng hồi sức đều có sự xuất hiện gián đoạn của *E. coli*. Cụ thể, tại buồng 1, không thấy các chủng *E. coli* trong thời gian tương đối dài (274 ngày). Tại buồng 2, vi khuẩn này không xuất hiện trong 103 ngày. Tại buồng 3, không ghi nhận sự xuất hiện của *E. coli* trong 3 khoảng thời gian khác nhau, lần lượt là 40, 47 và 85 ngày. Tại buồng 4, không ghi nhận vi khuẩn trong

2 khoảng thời gian khác nhau, lần lượt là 47 và 55 ngày.

3.3.6. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào Sequence Types

a) Sự đa dạng của các chủng vi khuẩn, tình trạng nhiễm các STs khác nhau và nguồn lây giữa các bệnh nhân



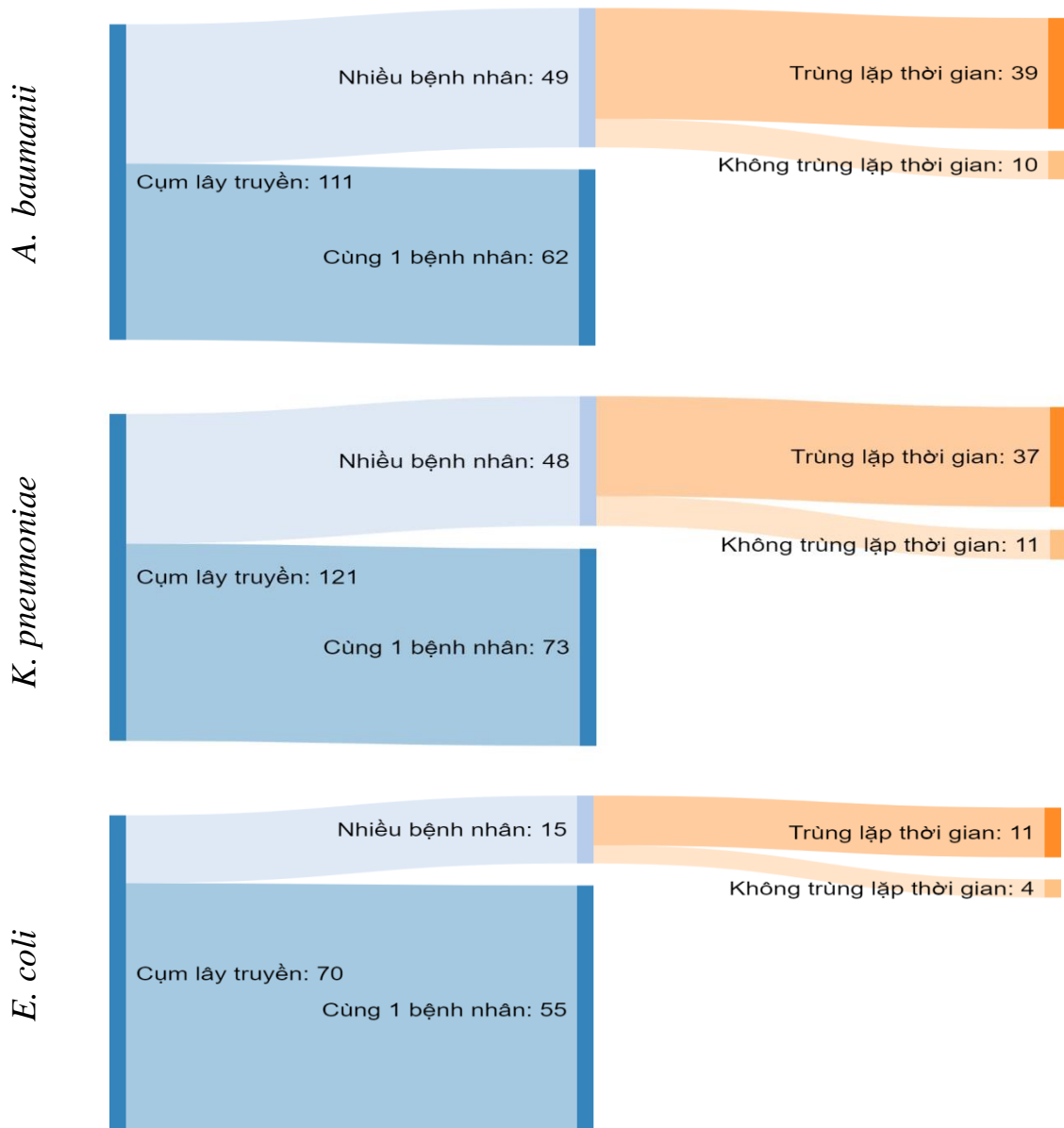
Biểu đồ 3. 19. Sự đa dạng của các chủng vi khuẩn, tình trạng nhiễm các STs khác nhau và nguồn lây giữa các bệnh nhân

Nhận xét: *A. baumannii* được phát hiện ở 154 BN, trong đó phát hiện từ 2 lần trở lên ở 89 BN. Trong các BN phân lập được vi khuẩn nhiều lần, 57 trường hợp nhiễm một ST khác. *A. baumannii* gặp nhiều nhất ở đờm.

K. pneumoniae được phát hiện ở 192 BN, trong đó phát hiện từ 2 lần trở lên ở 110 BN. Trong các BN phân lập được vi khuẩn nhiều lần, 75 trường hợp nhiễm một ST khác. *K. pneumoniae* gặp nhiều nhất ở phân.

E. coli được phát hiện ở 181 BN, trong đó được phát hiện từ 2 lần trở lên ở 93 trường hợp. Trong các BN phân lập được vi khuẩn nhiều lần, 62 trường hợp nhiễm một ST khác. *E. coli* gặp nhiều nhất ở bệnh phẩm phân.

b) Cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc giữa các bệnh nhân



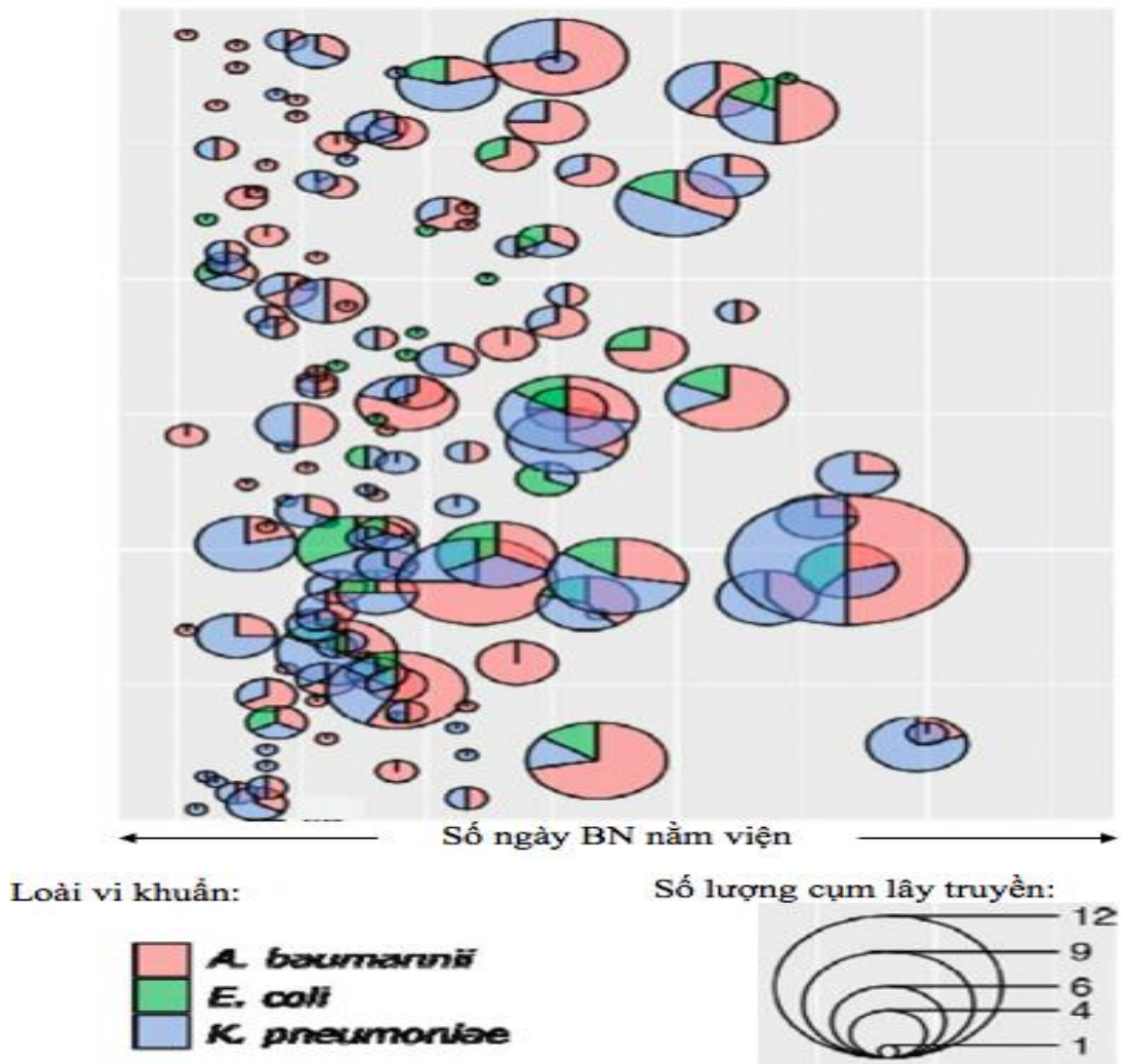
Biểu đồ 3. 20. Cụm lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc

Nhận xét: Đối với *A. baumannii*, nghiên cứu xác định được 111 cụm có các chủng được phân lập có khác biệt 0 SNP. Tuy nhiên, 62 cụm trong số đó được phát hiện trên cùng 1 BN qua các lần lấy mẫu khác nhau nên không được coi là có sự lây truyền. Trong số 49 cụm được phát hiện trên 2 BN và/hoặc mẫu môi trường trở lên, qua đối chiếu về thời gian thu thập mẫu, có 39 cụm có sự trùng lặp về mặt thời gian. Như vậy, nghiên cứu phát hiện được 39 cụm lây truyền của các chủng *A. baumannii*. Các cụm vi khuẩn này có liên quan tới từ 2 đến 22 chủng được phân lập và thường liên quan đến các chủng phân lập được từ môi trường. Cụm lây truyền lớn nhất có liên quan tới 22 chủng phân lập từ 5 BN và 6 mẫu môi trường.

Đối với *K. pneumoniae*, nghiên cứu xác định được 121 cụm có các chủng được phân lập có khác biệt 0 SNP. Tuy nhiên, 73 cụm trong số đó được phát hiện trên cùng 1 BN nên không được coi là có sự lây truyền. Trong số 48 cụm được phát hiện trên 2 BN và/hoặc mẫu môi trường trở lên, qua đối chiếu về thời gian thu thập mẫu, có 37 cụm có sự trùng lặp về mặt thời gian. Như vậy, nghiên cứu phát hiện được 37 cụm lây truyền của các chủng vi khuẩn *K. pneumoniae*. Các cụm *K. pneumoniae* tương đối lớn, có liên quan từ 2 đến 53 chủng được phân lập. 7 cụm có liên quan đến các chủng phân lập được từ môi trường.

Đối với *E. coli*, nghiên cứu xác định được 70 cụm có các chủng được phân lập có khác biệt 0 SNP. Tuy nhiên, 55 cụm trong số đó được phát hiện trên cùng 1 BN nên không được coi là có sự lây truyền. Trong số 15 cụm được phát hiện trên 2 BN và/hoặc mẫu môi trường trở lên, qua đối chiếu về thời gian thu thập mẫu, có 11 cụm có sự trùng lặp về mặt thời gian. Như vậy, nghiên cứu phát hiện được 11 cụm lây truyền của các chủng vi khuẩn *E. coli*. Các cụm *E. coli* tương đối nhỏ, liên quan từ 2 đến 6 chủng được phân lập và chỉ có 2 cụm có liên quan đến các chủng phân lập được từ môi trường.

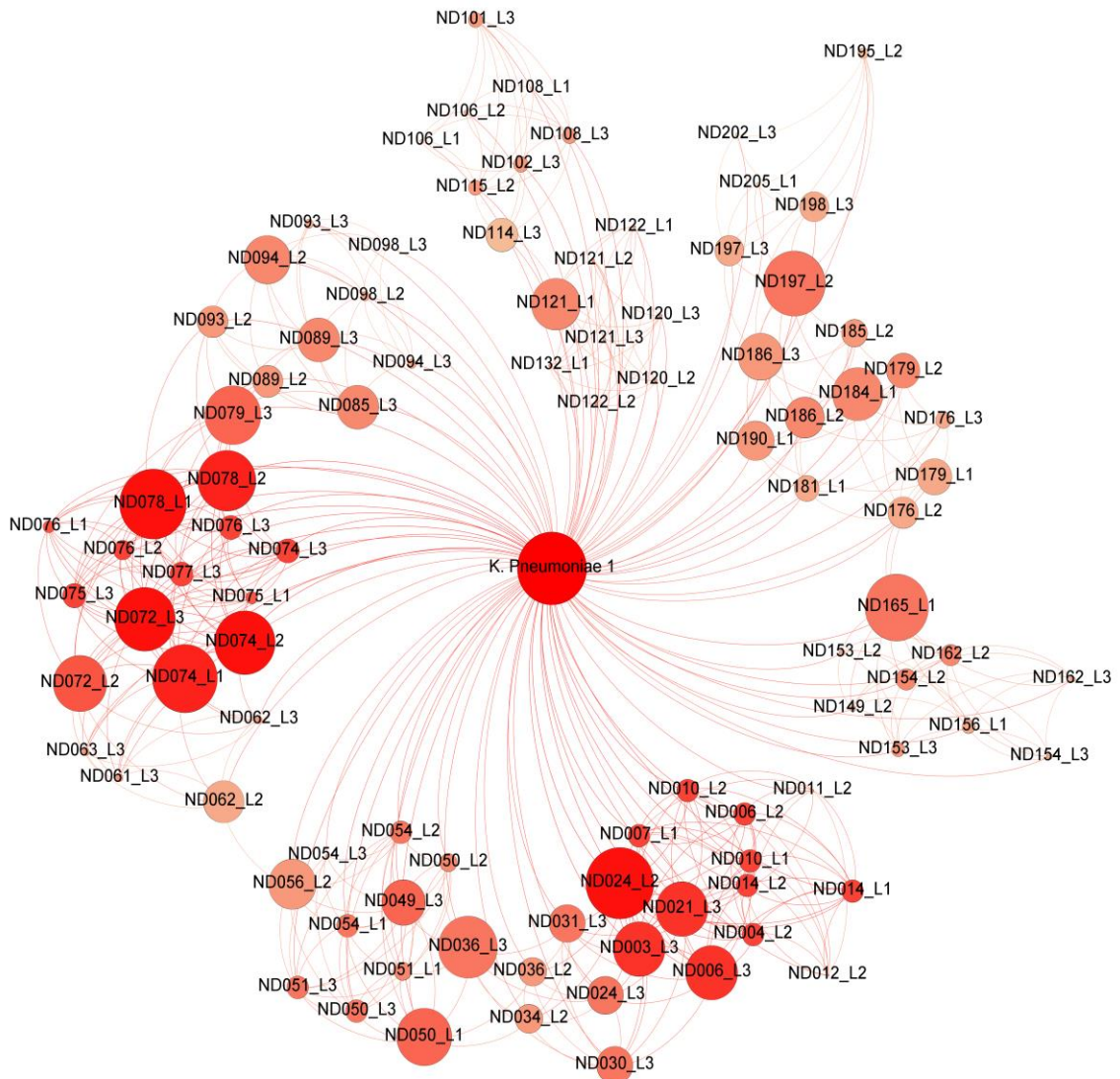
c) Các cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc trên một bệnh nhân



Biểu đồ 3. 21. Cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc trên một bệnh nhân

Nhận xét: 133 BN (68% nhóm nghiên cứu) có liên quan đến 89 cụm lây truyền của 3 loài vi khuẩn. 60 BN chỉ liên quan đến 1 cụm lây truyền trong toàn bộ thời gian nằm viện. 73 BN còn lại có liên quan tới ít nhất 2 cụm lây truyền, trong đó có 1 BN liên quan tới 12 cụm. Đối với BN có ít nhất hai cụm lây truyền, 11 BN có cụm lây truyền liên quan tới cả ba loài, 49 BN có cụm lây truyền liên quan tới hai loài và 13 BN chỉ có cụm lây truyền liên quan tới một loài. BN nằm viện lâu hơn có xu hướng liên quan tới nhiều cụm lây truyền hơn.

b) Đường lây truyền của *K. pneumoniae* giữa các bệnh nhân



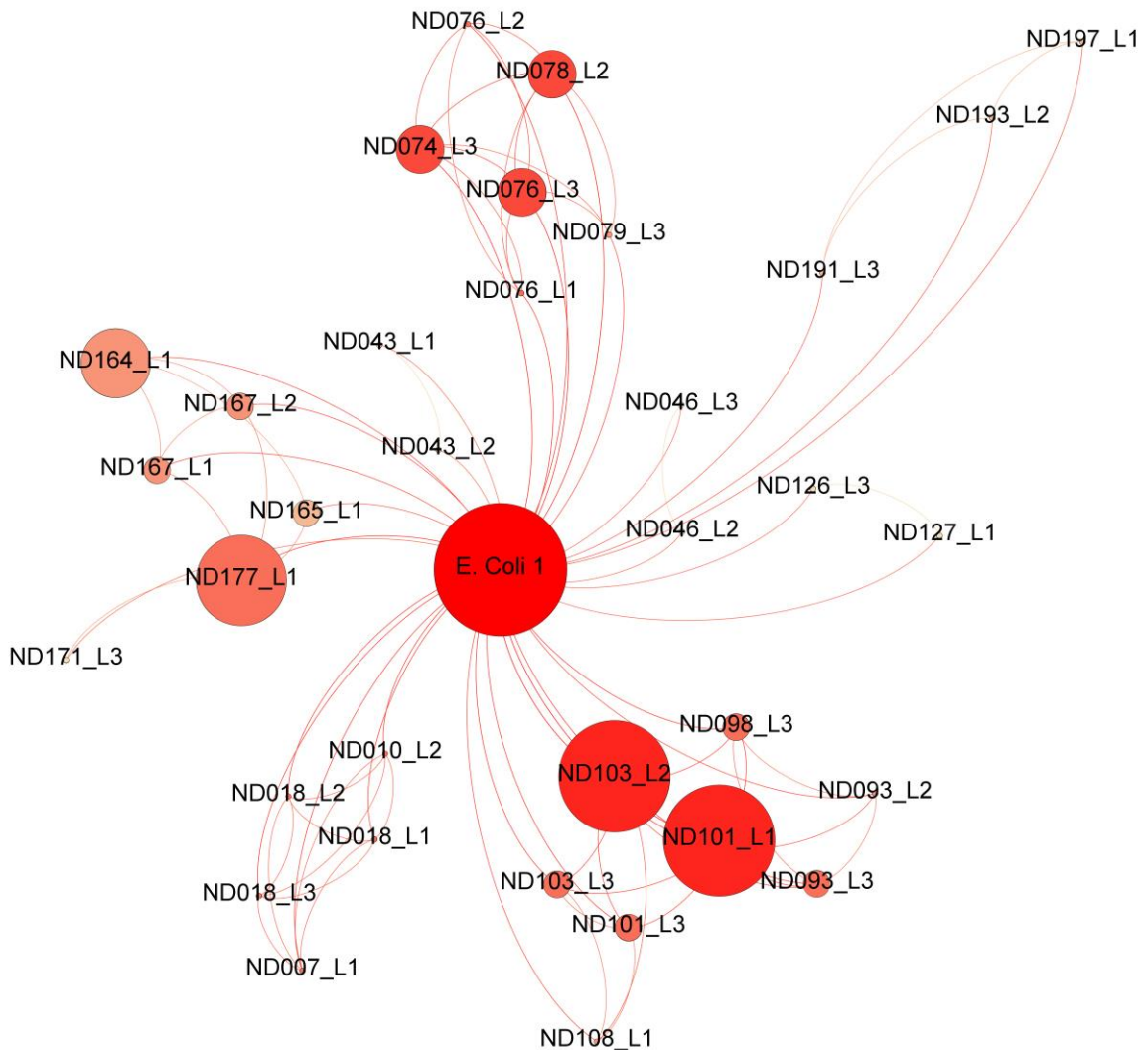
NDxxx: mã số nghiên cứu của BN

L1, L2, L3: lần lấy mẫu 1, 2, 3 của BN

Biểu đồ 3. 23. Cụm lây truyền của *K. pneumoniae* phenotype 1

Nhận xét: Nghiên cứu ghi nhận 85 phenotype của loài *K. pneumoniae* trong đó 17 phenotype xuất hiện đồng thời trên các BN tại cùng thời điểm hoặc trên BN và trên môi trường tại cùng thời điểm, tức là xác định được 17 cụm có khả năng lây truyền. 4 cụm có liên quan đến nhiều BN nhất được xác định là của *K. pneumoniae* phenotype 1, 2, 3 và 4. Cụm có khả năng lây truyền của *K. pneumoniae* phenotype 1 có liên quan tới 62 BN.

c) Đường lây truyền của *E. coli* giữa các bệnh nhân



NDxxx: mã số nghiên cứu của BN

L1, L2, L3: lần lấy mẫu 1, 2, 3 của BN

Biểu đồ 3. 24. Cụm lây truyền của *E. coli* phenotype 1

Nhận xét: Nghiên cứu ghi nhận 106 phenotype của loài *E. coli* trong đó 32 phenotype xuất hiện đồng thời trên các BN tại cùng thời điểm hoặc trên BN và trên môi trường tại cùng thời điểm, tức là xác định được 32 cụm có khả năng lây truyền. 4 cụm có liên quan đến nhiều BN nhất được xác định là của *E. coli* phenotype 1, 4, 2 và 5. Cụm có khả năng lây truyền của *E. coli* phenotype 1 có liên quan tới 23 BN.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy

4.1.1. Phân bố căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy

Các căn nguyên gây VPLQTM gặp phổ biến là các vi khuẩn Gram âm, trong đó hàng đầu là *A. baumannii* (80,85%), *K. pneumonia* (48,94%), và *P. aeruginosa* (29,97%). *E. coli* chiếm tỷ lệ thấp hơn (6,38%). Trong các vi khuẩn Gram dương, căn nguyên gặp nhiều nhất là *S. aureus* (21,28%), và cũng là căn nguyên thường gặp thứ 4 trong số các vi khuẩn gây VPLQTM. Ngoài ra, chỉ gặp một tỷ lệ nhỏ căn nguyên do *S. pneumoniae* (2,13%). Có thể nói, sự phân bố các căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM trong nghiên cứu của chúng tôi phản ánh bức tranh chung về căn nguyên VPLQTM tại hầu hết các khoa HSTC tại Việt Nam. Tại khu vực miền Bắc, ở BV Bạch Mai, nghiên cứu về đặc điểm VPLQTM tại khoa HSTC giai đoạn 2017-2018 của tác giả Hoàng Khánh Linh cho thấy các căn nguyên gặp phổ biến theo thứ tự là *A. baumannii* (51,04%), *K. pneumonia* (12,50%), *P. aeruginosa* (10,40%), *S. aureus* (10,40%) và *E. coli* (7,29%)²². Tại khu vực miền Nam, ở BV Thống Nhất, nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và tác nhân gây nhiễm khuẩn BV trên người cao tuổi cho thấy, căn nguyên VPLQTM gặp phổ biến theo thứ tự là *A. baumannii* (44%), *S. aureus* (38,40%), *P. aeruginosa* (29,60%), *K. pneumonia* (26,40%), và *E. coli* (16%)²¹. Trên thế giới, các báo cáo cũng ghi nhận nhóm 4 loài vi khuẩn *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* và *S. aureus* là những căn nguyên hàng đầu gây VPLQTM³. Tuy nhiên, tỷ lệ gặp các vi khuẩn này khác nhau tùy theo mức thu nhập của quốc gia. Theo tác giả Bonell, ở các nước có thu nhập trung bình thấp, *A. baumannii* là căn nguyên gặp nhiều nhất và tỷ lệ này giảm dần khi mức thu nhập trung bình của quốc gia tăng lên. Ở những nước có thu nhập trung

bình cao, căn nguyên hàng đầu lại là *P. aeruginosa* và *S. aureus*. Khi phân chia theo khu vực địa lý, các nước ở vùng nhiệt đới gặp *A. baumannii* nhiều nhất, trong khi ở các nước không thuộc khu vực nhiệt đới thì *S. aureus* gặp nhiều nhất³. Tóm lại, có thể thấy, căn nguyên VPLQTM nổi trội ở các nước đang phát triển là những vi khuẩn Gram âm mà hàng đầu là *A. baumannii*, còn ở các nước phát triển là những vi khuẩn Gram dương mà hàng đầu là *S. aureus*.

4.1.2. Thực trạng đồng nhiễm căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy

Trong 47 BN được chẩn đoán xác định mắc VPLQTM, hơn một nửa số BN (27/47 BN, tương đương 57,45%) đồng nhiễm từ 2 căn nguyên trở lên (36,17% số BN đồng nhiễm 2 căn nguyên và 21,28% số BN đồng nhiễm 3 căn nguyên). Số BN chỉ nhiễm 1 căn nguyên là 42,55% (20/47 BN). Kết quả này của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của tác giả Lê Thị Kim Nhung tại BV Thống Nhất cho thấy tỷ lệ BN mắc từ 2 căn nguyên trở lên là 61,8%²¹, của tác giả Patil H.V tại Ấn Độ với tỷ lệ là 55,40%⁸². Tuy nhiên, con số này lại khá cao so với một số nghiên cứu khác ở trong nước. Trong các nghiên cứu của mình, tác giả Đặng Văn Ninh tại BV Nguyễn Tri Phương báo cáo tỷ lệ đồng nhiễm từ 2 căn nguyên trở lên là 19%³³, tác giả Phạm Thái Dũng tại BV 103 báo cáo tỷ lệ này là 13,73%³¹ và tác giả Hoàng Khánh Linh tại BV Bạch Mai nêu tỷ lệ này là 4,17%²². Sự khác biệt này có thể do mô hình các khoa HSTC trong các nghiên cứu là khác nhau. Khoa HSTC trong nghiên cứu của chúng tôi là ở một BV tuyến cuối về các bệnh truyền nhiễm nên BN thường có nhiều yếu tố nguy cơ nhiễm nhiều vi khuẩn đa kháng thuốc hơn.

4.1.3. Đặc điểm kháng kháng sinh của các loài vi khuẩn

a) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. baumannii*

Các chủng *A. baumannii* trong nghiên cứu đã kháng với hầu hết các kháng sinh với tỷ lệ cao. Trên 80% các chủng kháng với ceftazidime và trên 75% các

chúng đã kháng với kháng sinh nhóm carbapenem. Kết quả này tương tự với rất nhiều nghiên cứu đã được công bố tại Việt Nam về tình hình KKS của *A. baumannii*^{22,34,83,84}. Tuy nhiên, nghiên cứu còn ghi nhận tỷ lệ nhạy cảm của *A. baumannii* với một số kháng sinh như minocycline (45,25%), TMP/SMX (56,42%) và đặc biệt là 100% các chủng *A. baumannii* nhạy cảm với colistin. Tác giả Dương Bửu Lộc cũng báo cáo tại BV Thống Nhất tỷ lệ *A. baumannii* nhạy TMP/SMX là 60%³⁴. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại ghi nhận tỷ lệ này thấp hơn như nghiên cứu của Hoàng Khánh Linh tại BV Bạch Mai (6,1%)²², nghiên cứu của Dương Minh Ngọc tại BV Chợ Rẫy (33,3%)⁸⁴. Đối với colistin, hầu hết các báo cáo đều ghi nhận tỷ lệ nhạy cảm đạt 100%^{22,34,83,84}. Tuy nhiên, cũng đã xuất hiện những báo cáo ghi nhận có sự đề kháng của *A. baumannii* với Colistin tại Việt Nam. Báo cáo của tác giả Nguyễn Ánh Tuyết tại BV Nhân dân Gia định cho thấy có 3 trong số 404 chủng vi khuẩn được phân lập (chiếm 0,75%) kháng colistin⁸⁵. Trên thế giới, *A. baumannii* kháng colistin được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Cộng hòa Séc⁸⁶. Từ đó đến nay, tình trạng *A. baumannii* kháng colistin đã được báo cáo ở hầu khắp các nơi trên thế giới với tỷ lệ ngày càng tăng cao. Báo cáo từ hệ thống giám sát KKS SENTRY cho thấy tỷ lệ *A. baumannii* kháng colistin tại Mỹ là 1,1%, Latin America (0,9%), khu vực Châu Á – Thái Bình Dương (0,7%) và Châu Âu (0,4%)⁸⁶.

b) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *K. pneumoniae*

Trên 90% các chủng vi khuẩn *K.pneumoniae* đã kháng với các kháng sinh cephalosporin (92,9% kháng cefepime, 97% kháng cefotaxime, 96% kháng cefuroxime, 88,9% kháng ceftazidime). Đối với các kháng sinh nhóm carbapenem cũng ghi nhận tỷ lệ đề kháng cao, trên 80% (80,8% kháng ertapenem và 80,8% kháng meropenem). Nhìn chung, các nghiên cứu tại Việt Nam đều ghi nhận tình hình đề KKS của *K.pneumoniae* tương tự như nghiên

cứu của chúng tôi. Tác giả Trần Đỗ Hùng tìm hiểu về tình hình đề KKS ở BN VPLQTM tại khoa HSTC, BV Đa khoa thành phố Cần Thơ cho thấy, tỷ lệ kháng các kháng sinh cephalosporin dao động từ 66,7% (cefepime) tới 100% (ceftriaxone), tỷ lệ kháng imipenem là 92,3%⁸⁷. Thực tế này cho thấy, thách thức lớn trong điều trị BN nhiễm *K.pneumoniae* đa kháng vì những vũ khí cuối cùng như kháng sinh cephalosporin, carbapenem đều đã bị kháng rất nhiều. Nghiên cứu của chúng tôi còn ghi nhận tỷ lệ nhạy cảm của một số kháng sinh với *K.pneumoniae* ở mức trung bình (68,7% nhạy với amikacin, 48,7% nhạy với tigecycline, 39,4% nhạy với gentamicin). Tác giả Trần Hữu Thông báo cáo tỷ lệ *K.pneumoniae* nhạy cảm với amikacin là 57,1%⁴. Báo cáo từ BV Đa khoa thành phố Cần Thơ cũng cho thấy, tỷ lệ này là 44,4%⁶.

c) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *P. aeruginosa*

Trong tất cả các kháng sinh được làm kháng sinh đồ với các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu thì gần như toàn bộ đã bị vi khuẩn này kháng tới trên 90% (100% kháng piperacillin/tazobactam; 98% kháng ticarcilli/acid clavulanic và levofloxacin; 92% kháng với meropenem, imipenem, cefepime, ciprofloxacin,...). Có những kháng sinh tuy chưa ghi nhận đề kháng 100% bởi *P. aeruginosa* nhưng cũng không còn nhạy cảm, chỉ duy trì độ nhạy cảm ở mức trung gian (8% trung gian với ciprofloxacin, 2% với levofloxacin). Duy nhất chỉ có colistin có độ nhạy cảm 100% với các chủng vi khuẩn này. Các báo cáo tại Việt Nam ở giai đoạn trước năm 2015 có ghi nhận tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *P. aeruginosa* ở mức thấp hơn. Tác giả Nguyễn Văn Chi báo cáo tỷ lệ đề kháng của vi khuẩn này với kháng sinh nhóm carbapenem trong giai đoạn 2009-2011 tại khoa Cấp cứu, BV Bạch Mai chỉ là 25%⁸⁸. Báo cáo của Trần Đỗ Hùng tại BV Đa khoa thành phố Cần Thơ năm 2015 cho thấy tỷ lệ này dao động 23,1% đến 27,3%⁶. Tuy nhiên, giai đoạn từ sau năm 2015 đến nay, tỷ lệ này đã tăng lên nhanh chóng. Báo cáo của tác giả Vũ Đình Phú năm 2016 tại khoa

HSTC BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương cho thấy tỷ lệ *P. aeruginosa* kháng carbapenem là 45,8%²³. Cũng trong năm 2016, tác giả Lê Kiến Ngãi báo cáo tỷ lệ này tại 6 khoa HSTC của 3 BV là 69%⁸⁹. Những kết quả trên cho thấy tình hình *P. aeruginosa* kháng carbapenem ngày càng gia tăng nhanh chóng và rất đáng lo ngại.

d) Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *S. aureus*

Trong nghiên cứu của chúng tôi, MRSA chiếm 78,70% tổng số các chủng *S. aureus* được phân lập. Tác giả Trần Đỗ Hùng ghi nhận tỷ lệ này trong nghiên cứu tại BV Đa khoa thành phố Cần Thơ là 76,5%⁶. Nhiều báo cáo trong nước đã ghi nhận tỷ lệ MRSA lên tới 100%^{4,31}. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, vi khuẩn còn nhạy trên 90% với tương đối nhiều kháng sinh như rifampin (94,80%), vancomycin (97,50%), linezolid (98,20%). Nghiên cứu không ghi nhận sự khác biệt lớn về đề kháng của các chủng *S. aureus* với vancomycin và linezolid. Các báo cáo trên thế giới cũng ghi nhận tỷ lệ đề kháng vancomycin thấp, tuy nhiên, đã xuất hiện tình trạng giảm tính nhạy cảm với MIC 1,5-2 mcg/mL⁹⁰. Một số kháng sinh mới như linezolid và daptomycin cũng bắt đầu xuất hiện đề kháng⁹⁰. Bên cạnh các kháng sinh đang được sử dụng rộng rãi, một số kháng sinh mới được phát triển để điều trị MRSA như oritavancin, dalbavancin,... nhưng chưa được sử dụng nhiều trên lâm sàng.

4.1.4. Yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc trên bệnh nhân

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra khá nhiều yếu tố để đánh giá nhằm xác định đó có thể là những nguy cơ khiến BN nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc hay không. Duy nhất biến thời gian nằm viện ≥ 14 ngày có $p = 0,001$ tức là nhóm BN nằm viện ≥ 14 ngày có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc cao hơn nhóm nằm viện dưới 14 ngày. Do chỉ có 1 yếu tố nguy cơ có $p < 0,1$ nhóm nghiên cứu không tiến hành phân tích mô hình hồi quy đa biến các yếu tố tiên lượng nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, do đó không kết luận được bất

kỳ yếu tố nào trong những yếu tố được đưa vào phân tích là nguy cơ khiến BN nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc. Nhiều báo cáo trên thế giới đã chỉ ra được một số yếu tố nguy cơ dẫn đến nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc. Tác giả Buhl M.S trong nghiên cứu của mình đã chỉ ra các yếu tố nguy cơ nhiễm *P. aeruginosa* đa kháng thuốc bao gồm tiền sử sử dụng kháng sinh nhóm carbapenems và fluoroquinolones; có đặt catheter tĩnh mạch trung tâm và đặt sonde tiêu; BN có ghép tạng và có bệnh lý máu ác tính; phân lập được *P. aeruginosa* đa kháng thuốc trong môi trường BV⁸. Đánh giá về nguy cơ nhiễm *K. pneumoniae* đa kháng thuốc, tác giả Jiao Yang đã chỉ ra các yếu tố bao gồm tiền sử sử dụng kháng sinh nhóm glycopeptides và cefoperazone/sulbactam; mở khí quản; suy thận⁹¹. Tác giả Huang Xu đánh giá về thực trạng và các yếu tố nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc cũng chỉ ra các yếu tố nguy cơ bao gồm có tiền sử sử dụng 2 loại kháng sinh trở lên; có tiền sử sử dụng 1 loại kháng sinh phổ rộng trong vòng 3 tháng trước; thời gian nằm khoa HSTC kéo dài trên 9 ngày⁹². Theo quan điểm cá nhân, nghiên cứu của chúng tôi chưa tìm ra được yếu tố nguy cơ dẫn đến nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc là do trong kết quả nghiên cứu đã chỉ ra phần lớn BN trong nghiên cứu (96,97% sau 3 tuần điều trị) đã nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, do đó số lượng BN không nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc quá nhỏ nên không thể tạo ra sự so sánh mang tính khác biệt có ý nghĩa thống kê.

4.1.5. Thực trạng mang vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường hô hấp của bệnh nhân

Ở bệnh phẩm đường hô hấp, nghiên cứu ghi nhận sự ưu thế của các chủng ESBL-PE và CRO, trong khi các chủng VRE lại có tỷ lệ rất thấp. Tỷ lệ BN mang ESBL-PE tăng dần theo thời gian (53,49% lúc vào khoa và 95,65% sau 3 tuần). Đối với CRO, tình trạng cũng tương tự (46,51% lúc vào khoa và 86,96% sau 3 tuần). Tuy nhiên, các vi khuẩn VRE thì ngược lại, tỷ lệ mang vi

khuẩn thấp hơn nhiều và giảm dần theo thời gian (4,65% lúc vào khoa và 0% sau 3 tuần). Sự phân bố các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc trong đường hô hấp với ưu thế của các chủng của ESBL-PE và CRO ở các BN trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự một số báo cáo đã được công bố. Tác giả Tang Xiang thu thập kết quả từ 50.417 chủng vi khuẩn được phân lập tại 91 BV ở Trung Quốc cho thấy tại bệnh phẩm đường hô hấp (đờm và dịch hút khí phế quản), vi khuẩn đa kháng thuốc gặp hàng đầu là ESBL-PE (81,38%), CRO (52,07%) và MRSA (39,31%)⁹³. Nhiều nghiên cứu cho thấy việc mang vi khuẩn đa kháng thuốc là yếu tố nguy cơ độc lập dẫn đến nhiễm khuẩn do những vi khuẩn này^{94,95}. Chính vì vậy, thông tin về phân bố các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc trong đường hô hấp giúp các bác sỹ lựa chọn kháng sinh ban đầu phù hợp trong điều trị viêm phổi.

4.2. Kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

4.2.1. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân trong nghiên cứu

Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian nằm viện trung bình của các BN là $28,0 \pm 18,0$ ngày. Kết quả này tương tự với nhiều báo cáo trong nước cho thấy thời gian BN mắc VPLQTM nằm viện thường là 3 đến 4 tuần như báo cáo của tác giả Dương Bửu Lộc tại BV Thống Nhất là $22,0 \pm 16,3$ ngày³⁴, của tác giả Trần Minh Giang tại BV Nhân dân Gia Định là 27,7 ngày⁹⁶, của tác giả Vũ Đình Phú cũng tại BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương là 25 (19-37) ngày²³. Nhằm đánh giá mức độ nặng cũng như tiên lượng tử vong của các BN, chúng tôi có đánh giá điểm APACHE II và qSOFA tại thời điểm BN vào khoa HSTC. Điểm APACHE II trung bình là $10,6 \pm 5,5$. Nghiên cứu về VPLQTM ở BN cao tuổi tại BV Thống Nhất cho thấy điểm APACHE II ở nhóm sống là $18,9 \pm 7,1$, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tử vong là $24 \pm 6,6$ ³⁴. Báo cáo tại BV An Giang cũng cho thấy, điểm APACHE II ở nhóm khỏe ra viện là $13,7 \pm 4,9$, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tử vong là $27,2 \pm 5,3$ ³⁵. Đối với

điểm qSOFA, BN trong nghiên cứu của chúng tôi có điểm qSOFA ≥ 2 chiếm 42,55%. Tuyên bố đồng thuận quốc tế lần thứ 3 về định nghĩa nhiễm khuẩn và sốc nhiễm khuẩn đã chỉ ra BN có điểm qSOFA ≥ 2 có nguy cơ tử vong cao gấp 2-25 lần so với dưới 2 điểm⁹⁷. Một đặc điểm đáng lưu ý của các BN trong nghiên cứu của chúng tôi là có hơn một nửa số BN đã từng sử dụng kháng sinh trong vòng 90 ngày trước nhập viện (59,56%) và có nằm viện trong vòng 1 năm trước lần nhập viện này (55,32%). Đây đều được coi là những yếu tố nguy cơ dẫn đến mang hoặc nhiễm các vi khuẩn đa kháng thuốc.

Về tình trạng chuyển viện của các BN, phần lớn BN (93,62%) được chuyển từ các BV khác đến khoa HSTC, BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương. Thực tế đây là tình trạng chung của các BV tuyến cuối trong cả nước. Báo cáo về tình hình VPLQTM tại BV Chợ Rẫy cũng ghi nhận 91,7% BN được chuyển từ các BV tuyến trước đến⁹⁸. Việc BN nằm ở các BV khác trước khi chuyển đến cơ sở y tế trong nghiên cứu được coi là yếu tố nguy cơ gây NKBV và cũng là yếu tố nguy cơ nhiễm các vi khuẩn đa kháng thuốc^{28,99}. Tuy nhiên, rất khó hạn chế yếu tố nguy cơ này vì khi BN chuyển nặng, buộc các BV tuyến dưới phải chuyển BN lên tuyến trên. Giải pháp cần thực hiện nhằm hạn chế yếu tố này là mỗi BV cần thực hiện tốt công tác kiểm soát nhiễm khuẩn tại BV mình, đặc biệt là tại các khoa HSTC nhằm hạn chế NKBV và hạn chế nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc.

Các bệnh lý nền gặp phổ biến nhất trong nhóm BN nghiên cứu của chúng tôi là bệnh lý tim mạch (27,66%), đái tháo đường (17,02%) và nghiện rượu (17,02%). Hầu hết các nghiên cứu tại Việt Nam đều ghi nhận nhóm bệnh lý nền thường gặp hàng đầu ở những BN VPLQTM là bệnh lý tim mạch, đái tháo đường và bệnh phổi mạn tính^{21,34,88,100}. Như vậy, kết quả của chúng tôi tương đồng về 2 nhóm bệnh lý nền là bệnh lý tim mạch và đái tháo đường. Nhóm BN mắc bệnh phổi mạn tính trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ đứng hàng thứ 4.

Điều này có thể do đặc thù riêng của BV Bệnh Nhiệt đới trung ương, là đơn vị chuyên điều trị các BN giai đoạn cuối về bệnh lý gan mật như xơ gan mất bù, ung thư gan và số BN mắc các bệnh lý về gan mức độ nặng luôn chiếm khoảng 30% tổng số BN trong BV. Hầu hết các BN này đều có tiền sử nghiện rượu. Chính vì vậy tỷ lệ BN có bệnh lý nền nghiện rượu trong báo cáo của chúng tôi cao hơn so với các đơn vị khác. Tuy nhiên, bệnh phổi mạn tính cũng là bệnh lý nền thường gặp thứ 4 trong nghiên cứu này và đây cũng được coi là một trong các yếu tố nguy cơ gây VPLQTM¹⁰¹.

4.2.2. Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện

a) Tình trạng bệnh nhân lúc ra viện

Mặc dù tỷ lệ tử vong tại BV trong báo cáo của chúng tôi tương đối thấp (2,13%) nhưng toàn bộ số BN tử vong tại BV và xin về để tử vong lại chiếm tới hơn 1/3 số BN (17/47 trường hợp). Tỷ lệ tử vong của BN VPLQTM nhìn chung khá cao, thường trên 30%, như báo cáo của tác giả Vũ Đình Phú cũng tại BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương cho thấy, tỷ lệ này là 35,1%²³, của tác giả Phạm Ngọc Trung tại BV An Giang là 36,2%³⁵. Thậm chí, nhiều nghiên cứu còn cho thấy, tỷ lệ tử vong ở BN VPLQTM lên tới trên 50% như báo cáo tại khoa HSTC BV Nhân dân Gia Định ghi nhận tỷ lệ này là 55,2%⁹⁶, tại BV Thống Nhất là 68,75%³⁴. Một báo cáo phân tích tổng hợp dữ liệu từ 38 nghiên cứu về VPLQTM chỉ ra rằng VPLQTM không phải là yếu tố nguy cơ gây tử vong nhưng có thể kéo dài thời gian nằm viện⁹⁹.

b) Điểm MRS của bệnh nhân tại thời điểm ra viện

Chúng tôi sử dụng thang điểm MRS để đánh giá tình trạng hồi phục của BN tại thời điểm xuất viện với 6 mức độ khác nhau, từ 0 điểm là BN hồi phục hoàn toàn, không còn triệu chứng gì đến 6 điểm là BN nặng, nằm liệt giường, không tự phục vụ và cần phải có chăm sóc, theo dõi của nhân viên y tế¹⁰². Phần lớn các BN trong nghiên cứu của chúng tôi có điểm MRS tại thời điểm chuyển

khỏi khoa HSTC ở mức 3 đến 5 điểm tức là có giảm khả năng lao động từ mức nhẹ (3 điểm) đến mức vừa và nặng (5 điểm). Điều này phù hợp với thực tế tại các khoa HSTC là sau khi BN thoát khỏi tình trạng nguy kịch sẽ được chuyển đến các khoa khác hoặc BV tuyến dưới tiếp tục chăm sóc đến khi hồi phục hoàn toàn mới xuất viện.

4.2.3. Các thuốc, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân

a) Các can thiệp, thủ thuật thực hiện trên bệnh nhân

Toàn bộ BN trong nghiên cứu được thực hiện tối thiểu 3 can thiệp là thở máy xâm nhập, đặt sonde dạ dày và đặt sonde tiêu. 91,49% BN được đặt catheter tĩnh mạch trung tâm. Đây đều là những can thiệp hầu như bắt buộc thực hiện trên những BN thở máy tại các khoa HSTC. Báo cáo của tác giả Lê Thị Kim Nhung tại BV Thống Nhất cũng cho thấy 2 thủ thuật gặp nhiều nhất tại khoa HSTC là đặt sonde dạ dày, thở máy xâm nhập và có 25,74% BN có từ 4 can thiệp trở lên²¹. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra các can thiệp, thủ thuật thực hiện trên BN là yếu tố nguy cơ dẫn đến VPLQTM. Tác giả Timsit J.F liệt kê một loạt các yếu tố nguy cơ gây VPLQTM bao gồm: đặt sonde dạ dày, mở khí quản, thời gian thở máy kéo dài, đặt lại ống NKQ, tư thế nằm đầu bằng trong quá trình thở máy,...¹. Việc hạn chế tối đa thực hiện các can thiệp, thủ thuật và đảm bảo vô trùng tuyệt đối khi thực hiện có thể giúp làm giảm nguy cơ mắc VPLQTM.

b) Thời gian duy trì các can thiệp, thủ thuật trên bệnh nhân

Thời gian duy trì các can thiệp, thủ thuật trên BN tương đối dài, trung bình trên 20 ngày với nhiều can thiệp như $29,7 \pm 20,2$ ngày với thở máy xâm nhập, $25,9 \pm 21,2$ ngày với đặt catheter tĩnh mạch trung tâm và $24,5 \pm 14,9$ ngày với mở khí quản. Báo cáo về tình hình VPLQTM tại BV Thống Nhất năm 2018 ghi nhận, thời gian BN thở máy là $18,6 \pm 13,4$ ngày³⁴. Báo cáo tại khoa HSTC BV Bạch Mai năm 2018 cho thấy, thời gian BN thở máy là $10,79 \pm 5,70$ ngày

²². Tuy thời gian BN thở máy trong nghiên cứu của chúng tôi dài hơn nhưng phù hợp với tình hình thực tế về thời gian nằm viện của BN. Nghiên cứu của chúng tôi có báo cáo thời gian điều trị trung bình của các BN tại khoa HSTC là 3 đến 4 tuần. Như vậy thời gian duy trì các thủ thuật hoàn toàn phù hợp với thực tế là BN được duy trì các can thiệp, thủ thuật trong phần lớn thời gian nằm tại khoa và sau khi tình trạng ổn định, được bỏ máy thở, rút ống NKQ,... thì sẽ được chuyển khỏi khoa HSTC.

c) Tình hình sử dụng kháng sinh trên bệnh nhân

Các hướng dẫn điều trị VPLQTM trên thế giới và tại Việt Nam đều nhấn mạnh việc lựa chọn kháng sinh cần dựa vào kết quả nuôi cấy vi sinh và kháng sinh đồ. Việc điều trị kháng sinh ban đầu theo kinh nghiệm cần căn cứ theo mô hình phân bố và sự đề KKS của vi sinh vật tại cơ sở điều trị và sẽ ảnh hưởng trực tiếp tới thời gian điều trị cũng như tiên lượng tử vong của BN. Đối với những cơ sở mà vi khuẩn Gram âm đa kháng thuốc là những căn nguyên hàng đầu gây VPLQTM thì các kháng sinh nên được cân nhắc sử dụng ban đầu bao gồm colistin, carbepenem, anti-pseudomonal cephalosporins ¹⁰³. Tuy nhiên, việc chỉ định kháng sinh phổ rộng cần cân nhắc thận trọng vì khi những kháng sinh này được sử dụng rộng rãi sẽ nguy cơ cao gây ra các vi khuẩn đa kháng thuốc. Trong nghiên cứu này, kháng sinh ban đầu được chỉ định phù hợp với căn nguyên vi khuẩn gây VPLQTM ở 70,00% BN nhóm sống và 41,18% BN nhóm tử vong, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Phần lớn BN (70,59% ở nhóm tử vong và 83,33% ở nhóm sống) trong nghiên cứu được sử dụng phối hợp từ 2 đến 3 loại kháng sinh khác nhau trong quá trình điều trị. Báo cáo của tác giả Vũ Đình Phú cũng cho thấy tỷ lệ sử dụng phác đồ phối hợp kháng sinh là 71%, trong đó sự phối hợp giữa carbapenem và colistin là 39,1% ²³. Các vi khuẩn đa kháng thuốc gia tăng trên toàn thế giới, tạo thành mối đe dọa nghiêm trọng cho các thế hệ tương lai. Vì vậy, các hướng

dẫn chẩn đoán và điều trị đều cố gắng hướng dẫn bác sỹ đánh giá và kết hợp các đặc điểm của BN để thu hẹp việc sử dụng kháng sinh phổ rộng nhằm làm giảm áp lực KKS trên toàn cầu. Các hướng dẫn của Châu Mỹ thường khuyến cáo sử dụng liệu pháp phối hợp khi bắt đầu điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm, sau đó xuống thang. Trái lại, các hướng dẫn của Châu Âu lại hướng dẫn chỉ dùng liệu pháp phối hợp kháng sinh khi BN có sốc nhiễm khuẩn¹⁰⁴. Arthur L.E báo cáo phân tích tổng hợp so sánh hiệu quả của việc sử dụng kháng sinh đơn trị liệu hay kết hợp trên BN VPLQTM cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ tử vong giữa 2 nhóm¹⁰⁵. Điều này ủng hộ khuyến cáo sử dụng kháng sinh đơn trị liệu trên cơ sở hiểu rõ về phân bố căn nguyên và đặc tính KKS của các vi khuẩn gây VPLQTM tại mỗi cơ sở điều trị.

Các BN trong nghiên cứu của chúng tôi có thời gian điều trị kháng sinh trung bình là $23,7 \pm 17,7$ ngày ở nhóm tử vong và $26,4 \pm 19,5$ ngày ở nhóm sống, khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Báo cáo của tác giả Vũ Đình Phú cũng tại BV Bệnh Nhiệt đới Trung ương cho thấy thời gian điều trị kháng sinh của BN VPLQTM là 31 (18 – 42,5) ngày²³. Nhìn chung, thời gian điều trị kháng sinh của các BN trong báo cáo của chúng tôi dài hơn so với một số báo cáo đã nêu. Tác giả Dương Bửu Lộc nêu thời gian điều trị kháng sinh cho nhóm BN cao tuổi mắc VPLQTM là $13,3 \pm 7,0$ ngày³⁴. Các hướng dẫn về sử dụng kháng sinh trên BN VPLQTM đều đưa ra khuyến cáo chỉ nên sử dụng kháng sinh trong 7 ngày và áp dụng các biện pháp xuống thang^{1,2,12,104}. Tuy nhiên, mức độ chặt chẽ của yêu cầu này không giống nhau giữa các hướng dẫn. Trong khi các hướng dẫn của Châu Mỹ đưa ra khuyến nghị chặt chẽ về việc chỉ sử dụng kháng sinh trong 7 ngày thì các hướng dẫn của Châu Âu chỉ nêu khuyến cáo và yêu cầu căn cứ vào một số đặc điểm quan trọng của BN như tình trạng suy giảm miễn dịch, BN có áp xe phổi, có viêm phổi hoại tử, đáp ứng lâm sàng của BN,... để đưa ra quyết định về thời gian sử dụng kháng sinh¹⁰⁴. Mục đích

chính của việc rút ngắn thời gian điều trị kháng sinh là làm giảm sự xuất hiện của các vi khuẩn đa kháng thuốc.

4.2.4. Tổn thương trên phim X-quang phổi tại thời điểm chẩn đoán VPLQTM

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tại thời điểm chẩn đoán mắc VPLQTM, 74,47% BN có tổn thương thâm nhiễm trên phim chụp X-quang phổi, trong đó tổn thương gặp nhiều nhất ở thùy giữa phổi phải (94,29%), thùy đỉnh phổi phải (82,86%) và thùy đỉnh phổi trái (71,43%). Tổn thương đông đặc gặp ở 25,53% BN và 27,66% BN bị tràn dịch màng phổi. Thông thường, tình trạng viêm phổi sẽ gây ra thay đổi thể tích thông khí trong nhu mô phổi dẫn đến hình ảnh điển hình là tổn thương thâm nhiễm hoặc đông đặc trên phim X-quang. Báo cáo của tác giả Phạm Thái Dũng tại BV 103 cho thấy 100% BN VPLQTM có tổn thương dạng thâm nhiễm lan tỏa³¹. Wang G. báo cáo tổn thương phổi trên phim X-quang ngực ở BN VPLQTM cũng ghi nhận 3 dạng tổn thương gặp phổ biến là xuất hiện thâm nhiễm, thâm nhiễm 1 thùy phổi và thâm nhiễm lan tỏa 2 bên phổi¹⁰⁶. Mặc dù tổn thương trên X-quang phổi là yếu tố được đưa vào tiêu chuẩn chẩn đoán VPLQTM của hầu hết các hướng dẫn lâm sàng, tuy nhiên, phương pháp này có những hạn chế nhất định như khó phát hiện tổn thương ở giai đoạn sớm hoặc tổn thương ở những vị trí khó quan sát, không phát hiện được các tổn thương đông đặc có kích thước <1cm, tia X phát ra trong quá trình chụp phim có thể làm tổn hại BN và những BN xung quanh,...¹⁰⁶. Chính vì những lý do đó, hiện nay siêu âm phổi để chẩn đoán VPLQTM bắt đầu được sử dụng ở nhiều nơi.

4.2.5. Các yếu tố tiên lượng tử vong trên bệnh nhân

Nhằm tìm hiểu các yếu tố tiên lượng tử vong ở nhóm BN VPLQTM có nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, chúng tôi tiến hành phân tích đơn biến và đa biến với hàng loạt các yếu tố có thể là yếu tố tiên lượng tử vong như các bệnh lý nền, tiền sử nằm viện, tiền sử sử dụng kháng sinh trước đó, số ngày nằm

viện,... Chỉ duy nhất một yếu tố là thời gian nằm viện ≥ 14 ngày có giá trị $p = 0,008$ tức là nhóm BN nằm viện trên 14 ngày có nguy cơ tử vong cao hơn nhóm nằm viện dưới 14 ngày. Do chỉ có 1 yếu tố nguy cơ có $p < 0,1$ nên nhóm nghiên cứu không tiến hành phân tích mô hình hồi quy đa biến về các yếu tố tiên lượng tử vong và không kết luận được bất kỳ yếu tố nào trong những yếu tố được đưa vào phân tích là nguy cơ khiến BN tử vong. Đánh giá các yếu tố tiên lượng tử vong trên BN VPLQTM, tác giả But Ayse ghi nhận thời gian nằm viện kéo dài là yếu tố có giá trị tiên lượng ¹⁰⁷. Ngoài ra, nghiên cứu trên còn nêu ra một số yếu tố khác như suy hô hấp, mất ý thức tại thời điểm nhập viện, có tiền sử bệnh lý mạch vành, có tiền sử sử dụng corticoid là những yếu tố độc lập có giá trị tiên lượng ¹⁰⁷. Một số nghiên cứu về yếu tố tiên lượng tử vong ở BN VPLQTM có đánh giá tiên lượng tử vong dựa trên các thang điểm APACHE II, SOFA, CPIS ^{49,48}. Tuy nhiên, chúng tôi không đánh giá những yếu tố này trong nghiên cứu của mình bởi các thang điểm này được xây dựng, sử dụng và chứng minh qua nhiều nghiên cứu là có giá trị trong việc tiên lượng tử vong cho các BN nằm tại khoa HSTC nói chung, bao gồm cả những BN mắc VPLQTM. Vì vậy, việc xác định khả năng tiên lượng tử vong của những thang điểm này là không cần thiết.

4.3. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

4.3.1. Phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc được chuẩn hóa mẫu để giải trình tự gen

Nghiên cứu của chúng tôi xác định được 2775 mẫu bệnh phẩm được thu thập từ BN và môi trường có kết quả nuôi cấy dương tính và định danh được 27 loài vi khuẩn. Các bệnh phẩm tiếp đó được đưa vào chuẩn hóa để thực hiện giải trình tự gen. Sau chuẩn hóa, 2464 mẫu đủ chất lượng có thể đưa vào giải trình tự gen, trong đó 3 loài vi khuẩn *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. Coli*

chiếm tới 85,67% (2111/2464 mẫu). Vì vậy, nghiên cứu tập trung giải trình tự gen 2111 chủng (1898 chủng từ BN và 213 chủng từ môi trường) của 3 loài vi khuẩn trên nhằm xác định đường lây truyền của chúng tại khoa HSTC. Có thể nói, đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam có số lượng lớn nhất các chủng vi khuẩn được giải trình tự gen toàn bộ bộ gen. Sự phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự một số báo cáo đã nêu. Nghiên cứu về sự phân bố các vi khuẩn đa kháng thuốc tại khoa HSTC của 1 BV ở Pakistan, tác giả D'Souza ghi nhận 3 loài vi khuẩn phổ biến nhất là *A. baumannii*, *E. faecium* và *K. pneumoniae*¹⁰⁸. Cũng trong nghiên cứu này, đánh giá sự phân bố vi khuẩn đa kháng thuốc tại khoa HSTC của 1 BV ở Mỹ ghi nhận 2 loài vi khuẩn phổ biến nhất là *A. baumannii* và *E. coli*¹⁰⁸. Báo cáo về tình hình nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc trên 3223 BN nhiễm khuẩn BV tại một BV tuyến cuối ở Trung Quốc, tác giả Shrivastava S.R ghi nhận các căn nguyên gặp nhiều nhất là *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* và *K. pneumoniae*¹⁰⁹. Ba loài vi khuẩn được tập trung phân tích trong nghiên cứu này cũng là những vi khuẩn Gram âm quan trọng nhất trong thực hành lâm sàng và được Tổ chức y tế thế giới coi là những mầm bệnh ưu tiên quan trọng trong việc nghiên cứu và phát triển các kháng sinh mới¹¹⁰. Việc tập trung xác định đường lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc phổ biến tại các khoa HSTC sẽ giúp phát hiện các ổ dịch lây truyền vi khuẩn gây nhiễm khuẩn BV, từ đó đưa ra các can thiệp thù hợp nhằm làm giảm tình trạng này.

4.3.2. Phân bố các Sequence Types (ST) của vi khuẩn

a) Phân bố các STs của *A. baumannii*

Kết quả giải trình tự gen ghi nhận 57 STs của *A. baumannii*, trong đó có sự phổ biến của ST2 (48%) và ST571 (24%), đều thuộc về Global clone 2 (GC2). Điều này cho thấy sự phân bố nổi trội tại cơ sở nghiên cứu của một số lineages của vi khuẩn *A. baumannii*. Kết quả giải trình tự gen 93 chủng *A.*

baumannii tại khoa HSTC, BV Chợ Rẫy cũng cho thấy sự nổi trội của Global clone 2 (GC2) với ST2 (31%), ST570 (20%) và ST571 (30%)⁵⁶. Tuy nhiên, khi tìm hiểu sự phân bố các lineages của *A. baumannii* tại các quốc gia khác trên thế giới, chúng tôi ghi nhận sự nổi trội của các STs khác nhau. Nghiên cứu tại Nhật Bản của Matsui M. cho thấy sự nổi trội của GC2 với ST469, ST208 và ST219¹¹¹. Báo cáo tại một BV tuyến cuối ở Tây Ban Nha ghi nhận sự phổ biến của *A. baumannii* GC2 với các STs: ST3 (26,7%), ST15 (6,7%) và ST80 (6,7%)¹¹². Sự phân bố các STs phổ biến của *A. baumannii* giống nhau ở 2 BV lớn thuộc 2 miền của Việt Nam (miền Bắc: BV Bệnh Nhiệt đới trung ương, miền Nam: BV Chợ Rẫy) và khác biệt so với các STs phổ biến tại các quốc gia khác cho thấy những lineages này của *A. baumannii* đã lây lan phổ biến ở khắp đất nước Việt Nam. Điều này đặt ra yêu cầu cần tiến hành thêm các nghiên cứu nhằm đánh giá xem các STs này có thể đã xuất hiện rộng rãi trong cộng đồng.

b) Phân bố các STs của *K. pneumoniae*

Sự phân bố các STs của *K. pneumoniae* cũng tương tự như *A. baumannii* với sự nổi trội của một số lineages đặc trưng riêng và phổ biến ở nhiều nơi tại Việt Nam. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận 68 STs của *K. pneumoniae* với sự nổi trội của 5 STs: ST15 (34%), ST16 (30%), ST656 (12%), ST11 (12%) và ST147 (7%). Báo cáo năm 2017 về kết quả giải trình tự gen các chủng *K. pneumoniae* tại BV Chợ Rẫy cũng ghi nhận, 2 STs phổ biến nhất là ST15 và ST16⁵⁷. Trong báo cáo này, Tada Tatsuya đã nhận định có thể ST15 và ST16 đã lan tràn rộng rãi ở nhiều cơ sở y tế tại Việt Nam. Việc giải trình tự gen các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc tại nhiều cơ sở y tế giúp đưa ra dữ liệu đánh giá sự lây truyền của những vi khuẩn này ở cấp độ quốc gia, từ đó có chiến lược can thiệp phù hợp, hạn chế sự lây lan của các vi khuẩn này. Nghiên cứu về các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc tại 244 BV ở 32 nước Châu Âu, Kiaei S. ghi nhận 69,9% các chủng được phân lập thuộc về ST11, ST15, ST101 và

ST258/512 ¹¹³. Phân tích sâu hơn, tác giả xác nhận sự lây truyền các chủng này chủ yếu xảy ra trong từng BV chứ chưa lan tràn đến mức độ quốc gia, ngoại trừ ST258/512 đã ghi nhận lây truyền tại nhiều nước Châu Âu ¹¹³.

c) Phân bố các STs của *E. coli*

Trái ngược với *A. baumannii* và *K. pneumoniae*, các chủng *E. coli* trong nghiên cứu lại có sự phân bố đa dạng với 80 STs được ghi nhận, trong đó 33 STs chỉ được phát hiện 1 lần duy nhất. Các STs chiếm ưu thế là ST648 (12%), ST410 (10%), ST617 (9%), ST131 (8%) và ST1193 (7%). Khi so sánh với các dữ liệu trên thế giới, nghiên cứu không ghi nhận sự nổi trội của bất cứ lineages nào đặc trưng riêng cho địa điểm nghiên cứu. Pietsch M. báo cáo về các chủng *E. coli* đa kháng thuốc tại các BV thuộc 16 bang của Đức cho thấy ST131 gặp phổ biến nhất và gặp ở cả những BN điều trị nội trú cũng như các BN đến khám ngoại trú. Điều này cho thấy sự phân bố rộng rãi và đặc trưng của *E. coli* ST131 trong các quần thể tại Đức ¹¹⁴. Nghiên cứu tại Mỹ về trình tự gen quy mô lớn của các chủng *E. coli* gây bệnh thu thập được 312 mẫu bệnh phẩm, ghi nhận 83 STs khác nhau, trong đó 43 STs chỉ xuất hiện 1 lần duy nhất và các STs thường gặp nhất bao gồm ST131, ST95, ST127, ST73, ST69 và ST393 ¹¹⁵. Điều này cho thấy sự đa dạng các STs của *E. coli* gặp phổ biến trong nhiều nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu tiên cứu đa trung tâm thực hiện trong 1 năm tại 83 BV ở Tây Ban Nha về các chủng *Enterobacteriaceae* ghi nhận, 27 mẫu bệnh phẩm nuôi cấy có phát hiện *E. coli* và kết quả giải trình tự gen cho thấy 16 STs khác nhau, trong đó phổ biến nhất là ST131 (26%) và ST156 (11,1%). Nghiên cứu cũng đưa ra nhận định so với các loài *Enterobacteriaceae* khác thì *E. coli* có cấu trúc quần thể đa dòng và đa dạng hơn ¹¹⁶.

4.3.3. Gen kháng thuốc của các loài vi khuẩn

Ứng dụng kỹ thuật NGS nhằm xác định các gen kháng thuốc kháng sinh của các loài vi khuẩn đang được triển khai rộng rãi nhằm giúp xác định chính

xác cơ chế đề KKS của các vi khuẩn. Đối với *A. baumannii*, do có khuynh hướng thu nhận DNA ngoại lai nên chúng có thể thu nhận, lắp ráp và điều chỉnh một loạt các cơ chế kháng thuốc để tồn tại trước áp lực chọn lọc mà chúng gặp phải, mang lại lợi thế sinh tồn mạnh mẽ trong môi trường BV. Trong nghiên cứu của chúng tôi, ở nhóm các gen sinh ESBL, *blaTEM* là phổ biến nhất, chiếm 62,42%. Kết quả này tương tự báo cáo của nhiều tác giả trên thế giới, ghi nhận *blaTEM* là gen kháng thuốc gặp phổ biến ở *A. baumannii* như trong nghiên cứu của tác giả Odewale ghi nhận tỷ lệ này là 45,5%¹¹⁷, tác giả Rao Mohan ghi nhận tỷ lệ này 53,85%¹¹⁸. Thậm chí, báo cáo của tác giả Han Lei tại Trung Quốc còn ghi nhận, tỷ lệ *A. baumannii* mang *blaTEM* lên tới 91,1%¹¹⁹. Tuy nhiên, các báo cáo cũng ghi nhận sự xuất hiện của một số gen sinh ESBL khác gặp phổ biến ở *A. baumannii* như *blaCTX-M* (gặp ở 45,5% trường hợp¹¹⁷), *blaPER* (gặp ở 54% trường hợp¹²⁰) nhưng lại không ghi nhận trong nghiên cứu của chúng tôi. Điều này có thể do đặc điểm đặc trưng riêng của loài *A. baumannii* tại địa điểm nghiên cứu của chúng tôi. Đối với nhóm gen sinh carbapenemase, *blaOXA* là phổ biến nhất, chiếm 89,20%. Các báo cáo trên thế giới đều ghi nhận *blaOXA* là gen gặp nhiều nhất trong nhóm gen sinh carbapenemase^{117,118,119,120}. Trong nhóm gen này, *blaNDM* được quan tâm đặc biệt do sự đề KKS rất nghiêm trọng mà chúng gây ra. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ mang gen này là 3,12%, thấp hơn nhiều so với một số báo cáo tại Ấn Độ, quốc gia đầu tiên ghi nhận *A. baumannii* mang gen này như báo cáo của Pragasam A.K nêu tỷ lệ này là 22%¹²⁰. Đối với các chủng *K. pneumoniae*, số lượng các gen kháng thuốc gặp phổ biến khá nhiều, bao gồm *blaNDM* (54,45%), *blaOXA* (46,51%), *blaKPC* (45,07%), *blaCTX* (51,80%), *blaSHV* (98,44%), *blaTEM* (52,16%). Cơ chế đề KKS của các chủng *K. pneumoniae* bao gồm đề kháng tự nhiên và đề kháng mắc phải. Các chủng vi khuẩn này đều mang gen *blaSHV* trên nhiễm sắc thể và có khả năng đề kháng tự nhiên với các

kháng sinh nhóm penicilin. Đối với các đề kháng mắc phải, thường là do lây truyền qua plasmid từ những *Enterobacteriae* khác ở đường ruột ¹²¹. Chính vì vậy, mỗi cơ sở y tế cần có dữ liệu trình tự gen các chủng *K. pneumoniae* tại cơ sở của mình để hiểu rõ về sự lây truyền các gen kháng thuốc thông qua plasmid từ đó đề ra chiến lược sử dụng kháng sinh phù hợp cũng như những giải pháp để hạn chế sự lây truyền các gen này. Tương tự như *K. pneumoniae*, các chủng *E. coli* cũng có nhiều gen kháng thuốc phổ biến như *bla*NDM (23,99%), *bla*OXA (34,75%), *bla*CTX (84,98%), *bla*TEM (48,21%), *bla*CMY (28,92%) và *bla*EC (100%). Nghiên cứu tại 17 BV ở Nam Kinh, Trung Quốc, Zhou H. cũng ghi nhận các gen kháng thuốc gặp phổ biến ở *E. coli* là *bla*NDM (100%), *bla*CTX (90,9%), *bla*TEM (72,7%) ¹²². Báo cáo của tác giả Dagher Christel về đặc điểm sinh học phân tử của các chủng *E. coli* phân lập tại một BV tuyến cuối của Li-Băng ghi nhận các gen kháng thuốc thường gặp là trong nhóm gen sinh carbapenemase là *bla*OXA (48,1%) và trong nhóm gen sinh ESBL là *bla*CTX (55,6%) ¹²³. Báo cáo của tác giả Tyson Gregory cho thấy các gen kháng thuốc thường gặp nhất là *bla*TEM (43,4%), *bla*OXA (17,1%) và *bla*CMY (30,3%) ¹²⁴. Mặc dù các gen kháng thuốc thường gặp ở các chủng *E. coli* là giống nhau trong nhiều nghiên cứu, tuy nhiên tần suất xuất hiện thay đổi rất khác nhau giữa các điểm nghiên cứu do đó mỗi cơ sở y tế nên có dữ liệu trình tự gen các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc tại cơ sở của mình để đưa ra phác đồ điều trị phù hợp.

4.3.4. Cây phát sinh loài của các vi khuẩn

a) Cây phát sinh loài của *A. baumannii*

Cây phát sinh loài của *A. baumannii* cho thấy đa số các chủng được phát hiện trong nghiên cứu đều thuộc global clone (GC)2, trong đó chủ yếu là ST2 (48%) và ST571 (24%). Việc đề kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng như việc mang các gen beta-lactamase và mang các nhóm plasmid không tương

thích là đặc điểm tương đối đồng nhất của các dòng vi khuẩn (linage) thuộc về cùng một ST. Điều này gợi ý đây là sự lây truyền của các clone chứ không phải là sự đa dạng loài. Báo cáo về sự phân bố các dòng vi khuẩn (linage) của *A. baumannii* trên toàn cầu ghi nhận trong 3 dòng vi khuẩn GC1, GC2 và GC3 thì GC1 và GC2 phổ biến trên toàn thế giới trong khi GC3 thường gặp ở một số nước Châu Âu ¹²⁵. Tại khu vực Châu Á, Kim D.H báo cáo về sự phân bố các chủng *A. Baumannii*, cũng ghi nhận sự phổ biến của GC2, trong đó đặc biệt là CC92 (clonal complex 92), gặp ở 83 trong tổng số 108 chủng được phân lập tại tất cả 8 địa điểm nghiên cứu là Hồng Kông, Ấn Độ, Hàn Quốc, Malaysia, Singapore, Đài Loan, Thái Lan và Philippines ¹²⁶. Tuy nhiên, khác biệt với nghiên cứu của chúng tôi, nghiên cứu này chỉ ra 2 STs phổ biến nhất tại 8 điểm nghiên cứu trên là ST92 (17,59%) và ST195 (16,67%) ¹²⁶. Chúng tôi chưa tìm được dữ liệu về kết quả giải trình tự toàn bộ bộ gen của các chủng *A. baumannii* tại các khu vực khác nhau ở Việt Nam để so sánh với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi nên chưa thể đưa ra kết luận về sự phổ biến của bất cứ STs nào của *A. baumannii* tại Việt Nam.

b) Cây phát sinh loài của *K. pneumoniae*

Cây phát sinh loài *K. pneumoniae* trong nghiên cứu cho thấy đa số (84%) các chủng được phát hiện đều thuộc 5 STs chủ yếu là ST15, ST16, ST656, ST11 và ST147. Việc đề kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng như việc mang các gen beta-lactamase và mang các nhóm plasmid không tương thích là đặc điểm tương đối đồng nhất của các dòng vi khuẩn (linage) thuộc về cùng một ST. Điều này gợi ý đây là sự lây truyền của các clone chứ không phải là sự đa dạng loài. David S. nghiên cứu về tình hình dịch bệnh do *K. pneumoniae* kháng carbapenem tại các nước Châu Âu thu thập hơn 1700 chủng tại 244 BV thuộc 32 quốc gia, cho thấy 477 trong 682 chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem (69,9%) cũng chỉ thuộc về 4 linage với các STs phổ biến là ST11,

ST15, ST101 và ST258/512¹²⁷. Nghiên cứu cũng đưa ra kết luận việc thu nhận các gen carbapenemase là nguyên nhân chính dẫn đến vi khuẩn kháng các kháng sinh nhóm carbapenem và có sự lây truyền theo các clone. Về lây truyền các gen kháng thuốc, bên cạnh việc lây truyền dọc theo nhiễm sắc thể thì còn gặp phổ biến hiện tượng lây truyền ngang thông qua plasmid¹²⁷. Báo cáo cũng chỉ ra hơn một nửa số BV trong nghiên cứu có hiện tượng phổ biến về lây truyền các chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem trong nội bộ BV và giữa các BV nhưng chưa đến mức có hiện tượng lây truyền phổ biến giữa các quốc gia¹²⁷. Tuy nhiên, Runcharoen C. báo cáo kết quả giải trình tự toàn bộ bộ gen các chủng *K. pneumoniae* được phân lập từ 2 nhóm khác nhau là từ BN và từ môi trường tại một BV của Thái Lan cho thấy, các chủng trong 2 nhóm này trộn lẫn vào nhau trong cây phát sinh loài, một số trường hợp thuộc về cùng 1 nhánh cho thấy nguồn gốc gần gũi của chúng và các chủng đều thuộc về các dòng lưu hành chung trên toàn cầu chứng tỏ đã có sự lây truyền rộng rãi ở cấp độ quốc gia¹²⁸. Sự khác biệt trong các kết quả nghiên cứu trên cho thấy mỗi cơ sở y tế, mỗi quốc gia cần có dữ liệu của riêng mình để có thể đánh giá chính xác tình hình thực tế và các mối nguy cơ tại đơn vị của mình.

c) Cây phát sinh loài của *E. coli*

Cây phát sinh loài của *E. coli* cho thấy các chủng được phát hiện rất đa dạng, gồm 8 nhóm phát sinh loài (phylogroup) với 80 STs. Hiện tại, các báo cáo trên toàn thế giới cũng ghi nhận có tất cả 8 nhóm phát sinh loài của *E. coli*, bao gồm A, B1, B2, C, D, E, F và G¹²⁹ thì cả 8 nhóm này đều gặp trong nghiên cứu của chúng tôi. Các STs phổ biến trong nghiên cứu này bao gồm ST648 (phylogroup A), ST410 (phylogroup C), ST617 (phylogroup A), ST131 (phylogroup B2) và ST1193 (phylogroup B2). Việc đề kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng như việc mang các gen beta-lactamase và mang các nhóm plasmid không tương thích rất đa dạng, phản ánh sự đa dạng của các

chúng thu được trong nghiên cứu. Các nghiên cứu trên thế giới đều ghi nhận sự xuất hiện đa dạng của các nhóm phát sinh loài khác nhau của *E.coli* nhưng vẫn có sự nổi trội của một hoặc một số nhóm phát sinh loài với đặc điểm đặc trưng riêng ở mỗi địa điểm nghiên cứu. Báo cáo tại Ấn Độ ghi nhận sự xuất hiện của cả 8 nhóm phát sinh loài, trong đó nổi trội là B2 và D. Nghiên cứu cũng đưa ra kết luận việc kháng nhiều kháng sinh là rất phổ biến ở 2 nhóm phát sinh loài này và tỷ lệ BN bị bệnh tái phát hoặc tử vong cũng cao hơn so với các nhóm khác¹²⁹. Runcharoen C. báo cáo tại Thái Lan về giải trình tự toàn bộ bộ gen của các chủng *E.coli* được phân lập từ BN và từ các mẫu môi trường nước kênh mương, nước thải chăn nuôi, cho thấy *E.coli* ST131 (phylogroup B2) là phổ biến nhất ở BN và tuy đã xuất hiện các chủng đề kháng carbapenem nhưng tỷ lệ rất thấp¹³⁰. Tuy nhiên, điều đáng lo ngại là các chủng vi khuẩn này có khả năng tích lũy dần các gen kháng thuốc theo thời gian, có khả năng lây truyền các gen kháng thuốc thông qua plasmid và lây truyền vi khuẩn giữa các BN tạo nên mối đe dọa cho các cơ sở y tế.

4.3.5. Sự xuất hiện các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc theo thời gian nghiên cứu

a) Sự xuất hiện các chủng A. baumannii theo thời gian nghiên cứu

Năm 2017-2018, khoa HSTC của BV Bệnh Nhiệt đới trung ương, cơ sở Giải Phóng có 4 buồng hồi sức: hồi sức 1 (giường 1 đến giường 5), hồi sức 2 (giường 6 đến giường 8), hồi sức 3 (giường 9 đến giường 11), hồi sức 4 (giường 12 đến giường 16). Chúng tôi đánh giá sự xuất hiện các chủng *A. baumannii* đa kháng thuốc theo thời gian nghiên cứu và nhận thấy tại cả 4 buồng bệnh, thường xuyên có sự xuất hiện các vi khuẩn này ở BN nằm tại các giường bệnh hồi sức hoặc ở môi trường của khoa hoặc ở cả hai trong toàn bộ thời gian nghiên cứu. Việc xuất hiện thường xuyên và tồn tại lâu dài của *A. baumannii* trong các khoa HSTC đã được nhiều báo cáo trên thế giới nêu ra và được lý giải bởi một số lý

do. Đối với sự tồn tại lâu dài trong môi trường, thứ nhất, vi khuẩn này có khả năng tạo ra các màng sinh học (biofilm) mạnh mẽ trên nhiều bề mặt khác nhau, bao gồm cả bề mặt sinh học như trên da người hoặc các bề mặt không phải sinh học như trên thành giường bệnh, bề mặt máy thở,... Chính nhờ những màng sinh học này mà *A. baumannii* có thể chống lại sự tiêu diệt của các hóa chất sát khuẩn thường dùng. Thứ hai, nhiều yếu tố nội sinh giúp vi khuẩn này có thể tồn tại lâu dài trong môi trường như protein màng ngoài, polysaccharide hình mũ và lipopolysaccharide, nang màng ngoài, hệ thống thu nhận kim loại, hệ thống tiết protein và β -lactamase¹³¹. *A. baumannii* có thể tồn tại tới 5 tháng ở nhiệt độ -20 đến 44°C và pH thông thường, tồn tại từ 5 ngày tới 5 phút ở nhiệt độ 50 đến 80°C và bị tiêu diệt sau 3 phút ở pH 2¹³¹. Đối với sự tồn tại kéo dài trên các BN, *A. baumannii* có thể tồn tại dưới dạng quần cư không gây bệnh hoặc trở thành tác nhân gây bệnh và thông qua nhiều cơ chế khác nhau như đề kháng tự nhiên, đề kháng qua lây truyền các gen kháng thuốc trên plasmid,... để trốn thoát sự tiêu diệt của các kháng sinh và tồn tại kéo dài. Sự xuất hiện thường xuyên của *A. baumannii* tại khoa HSTC như trên tuy chưa đủ cơ sở để đưa ra kết luận nhưng cũng gợi ý rất nhiều về sự xuất hiện của các vụ dịch do *A. baumannii* gây ra.

b) Sự xuất hiện các chủng *K. pneumoniae* theo thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy thường xuyên có sự xuất hiện các vi khuẩn *K. pneumoniae* đa kháng thuốc trong gần như toàn bộ thời gian nghiên cứu. Tuy nhiên, tại buồng hồi sức số 3, có khoảng thời gian tương đối dài (40 ngày) không ghi nhận sự xuất hiện của các chủng vi khuẩn này. *K. pneumoniae* được xem là căn nguyên vi khuẩn đa kháng thuốc quan trọng gây bệnh cho con người, có thể tồn tại ở nhiều nơi như trong môi trường BV, môi trường chăn nuôi, thịt gia súc, gia cầm tiêu thụ, hải sản, rau, đường ruột của con người, phân,...¹³². *K. pneumoniae* có nhiều gen KKS được mã hóa trên nhiễm sắc thể

và plasmid, dưới áp lực chọn lọc của kháng sinh, vi khuẩn liên tục tích lũy gen kháng thuốc bằng các đột biến mới (de novo), bằng thu nhận các plasmid và các yếu tố di truyền có thể chuyển giao dẫn đến các chủng cực kỳ kháng thuốc giúp vi khuẩn có thể tồn tại lâu dài¹³³. Sự xuất hiện gián đoạn của *K. pneumoniae* trong thời gian nghiên cứu cho thấy có thể một trong các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn thường qui đang được thực hiện tại khoa HSTC của BV Bệnh Nhiệt đới trung ương đã có hiệu quả trong việc hạn chế sự xuất hiện và lây lan của các chủng *K. pneumoniae* đa kháng. Vì vậy, cần có các đánh giá sâu hơn về từng vụ dịch cụ thể do vi khuẩn đa kháng thuốc gây ra tại BV để có thể chỉ ra các biện pháp can thiệp hiệu quả.

c) Sự xuất hiện các chủng *E. coli* theo thời gian nghiên cứu

Đánh giá sự xuất hiện các chủng *E. coli* đa kháng thuốc theo thời gian nghiên cứu cho thấy, tại tất các buồng hồi sức đều ghi nhận sự xuất hiện gián đoạn của các chủng *E. coli* trong đó có những khoảng thời gian không xuất hiện vi khuẩn tương đối dài (103 ngày) và sự gián đoạn xuất hiện thành nhiều đợt khác nhau. Sự vắng mặt của *E. coli* tại khoa HSTC như trên, tuy chưa đủ cơ sở để đưa ra kết luận nhưng cũng gợi ý rất nhiều về sự xuất hiện tương đối ít các vụ dịch do *E. coli* gây ra tại BV so với *K. pneumoniae* (có ghi nhận một số ít xuất hiện gián đoạn) và đặc biệt là *A. baumannii* (hoàn toàn không xuất hiện gián đoạn). Điều này cho thấy, có thể một trong các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn thường qui đang được thực hiện tại khoa HSTC của BV Bệnh Nhiệt đới trung ương đã có hiệu quả trong việc hạn chế sự xuất hiện và lây lan của các chủng *E. coli* đa kháng. Thực tế nhiều nghiên cứu cũng đã chỉ ra khả năng dễ dàng khử khuẩn *E. coli* hơn so với các vi khuẩn đa kháng khác. Đánh giá về hiệu quả khử khuẩn của sản phẩm Firebird F130 (thành phần bao gồm: alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, didecyl dimethyl ammonium chloride, octyl decyl dimethyl ammonium chloride, dioctyl dimethyl ammonium

chloride, ethanol) tác giả Rutala William cho thấy sau 24 giờ khử khuẩn bằng Firebird F130, số lượng vi khuẩn giảm của *E. coli* là 4,8 (4,6-5,0) x 10⁶, cao hơn hẳn so với các vi khuẩn khác như *K. pneumonia* là 1,5 (1,4-1,6) x 10⁶, *S. aureus* là 4,1 (3,8-4,4) x 10⁶ ¹³⁴.

4.3.6. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào Sequences Type

a) Sự đa dạng của các chủng vi khuẩn, tình trạng nhiễm các STs khác nhau và nguồn lây giữa các bệnh nhân

Ba loài vi khuẩn *A. baumannii*, *K. pneumonia* và *E. coli* được phát hiện ở hơn 80% BN trong nghiên cứu, trong đó *A. baumannii* gặp chủ yếu ở bệnh phẩm đờm còn *K. pneumonia* và *E. coli* gặp nhiều nhất ở bệnh phẩm phân. Việc xuất hiện các vi khuẩn này trong bệnh phẩm phân ở BN VPLQTM cho thấy có tình trạng mang các vi khuẩn đa kháng thuốc ở đường ruột. Việc mang các vi khuẩn đa kháng thuốc như vậy được coi là nguồn chứa và lây nhiễm tiềm tàng của các vi khuẩn này. Nhiều trường hợp BN có kết quả nuôi cấy vi khuẩn đa kháng thuốc dương tính chỉ một lần trong toàn bộ quá trình nằm viện nhưng là dương tính ngay tại thời điểm BN nhập khoa HSTC. Điều đó cho thấy, BN đã mang hoặc nhiễm các vi khuẩn đa kháng thuốc này trước thời điểm nhập khoa, tức là đã xuất hiện các vi khuẩn đa kháng thuốc trong cộng đồng hoặc trong môi trường BV tại các BV tuyến trước hoặc các khoa phòng khác trong BV trước khi vào khoa HSTC. Nhiều BN có kết quả nuôi cấy vi khuẩn đa kháng thuốc dương tính nhiều lần trong toàn bộ quá trình nằm viện, trong đó mỗi lần lại dương tính với một ST khác nhau của cùng một loài vi khuẩn. Điều đó cho thấy rõ ràng đã có sự lây nhiễm thêm các vi khuẩn đa kháng thuốc trong quá trình BN nằm tại khoa HSTC. Việc lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc tại các khoa HSTC đã là vấn đề đáng báo động, tuy nhiên, nếu có sự lây truyền rộng rãi trong cộng đồng hoặc trong các cơ sở y tế tuyến dưới hoặc trong các

khoa không phải khoa chăm sóc BN nặng thì thực sự là vấn đề nghiêm trọng. Nghiên cứu của chúng tôi chỉ có thể xác định được nguồn lây truyền của các BN tại khoa HSTC của BV Bệnh Nhiệt đới trung ương chứ chưa đủ khả năng xác định những nguồn lây truyền khác. Tuy nhiên, những phát hiện được trong nghiên cứu đã gióng lên hồi chuông cảnh báo về nguy cơ lây lan rộng rãi vi khuẩn đa kháng thuốc trong cộng đồng hoặc từ các BV tuyến trước. Điều này đặt ra nhu cầu cấp thiết cần có các nghiên cứu đánh giá rộng rãi hơn nữa về sự lan truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc, đặc biệt là tại quy mô cộng đồng.

b) Cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc giữa các bệnh nhân

Ứng dụng kỹ thuật NGS để xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV bắt đầu được sử dụng nhiều trong khoảng 10 năm trở lại đây và đặc biệt trở nên khá phổ biến ở các quốc gia phát triển trong 5 năm gần đây, trong đó *A. baumannii* dành được rất nhiều sự quan tâm vì vai trò quan trọng của vi khuẩn này trong NKBV. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện được 39 cụm lây truyền của các chủng *A. baumannii*. Các cụm vi khuẩn này có liên quan tới từ 2 đến 22 chủng được phân lập và thường liên quan đến các chủng phân lập được từ môi trường. Cụm lây truyền lớn nhất có liên quan tới 22 chủng phân lập từ 5 BN và 6 mẫu môi trường. Một nghiên cứu được công bố nào năm 2019 của tác giả Eigenbrod Tatjana đánh giá về nguồn lây truyền của *A. baumannii* trong khoa HSTC của một BV tại Đức đã tiến hành đánh giá hồi cứu toàn bộ các chủng *A. baumannii* được phân lập tại BV này trong khoảng thời gian 3 năm (2012 đến 2015). Sau khi tiến hành giải trình tự toàn bộ bộ gen các chủng vi khuẩn thu thập được từ 268 BN, nghiên cứu đã xác định được 4 cụm lây truyền, liên quan từ 2 đến 6 chủng¹³⁵. Nếu so sánh về số lượng BN được thu tuyển thì nghiên cứu của Eigenbrod Tatjana thu tuyển được nhiều BN hơn nghiên cứu của chúng tôi nhưng số cụm lây truyền được xác định lại ít hơn và số chủng liên quan trong mỗi cụm cũng ít hơn. Điều này có thể phần nào lý

giải do tình trạng lây truyền các vi khuẩn gây NKBV tại các nước phát triển không ở mức trầm trọng như các nước đang phát triển. Các cụm lây truyền trong nghiên cứu của chúng tôi hầu hết có liên quan đến mẫu môi trường, cho thấy nguồn lây bệnh tiềm tàng từ tại môi trường của khoa HSTC. Điều này cũng khác biệt so với kết quả một nghiên cứu về nguồn lây truyền của *A. baumannii* tại khoa HSTC ngoại khoa ở một BV ở Đức, đánh giá trong thời gian 1 năm (2017-2018) cho thấy, tác giả xác định được 2 cụm lây truyền, trong đó cụm lây truyền thứ nhất liên quan đến 8 BN và không liên quan đến môi trường, cụm lây truyền thứ hai có liên quan đến 12 BN và 3 mẫu môi trường. Nghiên cứu cũng chỉ ra các biện pháp can thiệp về kiểm soát nhiễm khuẩn nhằm làm sạch môi trường đã hạn chế được sự lây truyền của *A. baumannii* ¹³⁶. So sánh tính ưu việt của NGS so với phương pháp điều tra dịch tễ thông thường để xác định đường lây truyền của *A. baumannii*, nghiên cứu của tác giả Bogaty Chloe cho thấy, phương pháp điều tra dịch tễ thông thường xác định được 27 cụm lây truyền, trong khi sử dụng NGS xác định được chỉ 12 trong tổng số 27 cụm thực sự có mối liên hệ lây truyền ¹³⁷, giúp giảm thiểu thời gian và chi phí tốn kém khi thực hiện các biện pháp can thiệp. Bên cạnh đó, NGS còn giúp phát hiện một số cụm lây truyền mà phương pháp điều tra dịch tễ thông thường đã bỏ qua. Tính ưu việt của NGS đã được rất nhiều nghiên cứu nêu ra, tuy nhiên, không phải cơ sở y tế nào cũng có đủ năng lực và kinh phí để thực hiện được xét nghiệm này. Nghiên cứu của tác giả Bogaty Chloe cũng chỉ ra rằng NGS được coi như tiêu chuẩn vàng giúp xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc trong BV, tuy nhiên, trong điều kiện hạn chế, việc sử dụng phương pháp điều tra dịch tễ thông thường về không gian, thời gian, kết hợp với kỹ thuật đơn giản hơn là kỹ thuật điện di trường xung đẩy (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE) DNA cũng giúp xác định được đường lây truyền của các vi khuẩn ¹³⁷.

Tìm hiểu về nguồn lây truyền của *K. pneumoniae* và *E. coli*, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tình hình lây truyền của *K. pneumoniae* là tương tự *A. baumannii* với 37 cụm lây truyền được xác định, trong đó các cụm tương đối lớn, có liên quan từ 2 đến 53 chủng được phân lập. Điều này khác biệt so *E. coli* với chỉ 11 cụm lây truyền được xác định, các cụm tương đối nhỏ, liên quan từ 2 đến 6 chủng được phân lập và chỉ có 2 cụm có liên quan đến các chủng phân lập được từ môi trường. Điều này là đặc trưng riêng về vi sinh vật tại mỗi cơ sở nghiên cứu, phản ánh thực tế về sự xuất hiện và lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc tại đó. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận sự xuất hiện phổ biến và mức độ lan truyền quy mô lớn của *A. baumannii* và *K. pneumoniae* nhưng với *E. coli* chỉ xuất hiện ít và lây truyền hạn chế. Đây là cơ sở đề xuất các chiến lược can thiệp phòng ngừa NKBV phù hợp tại khoa HSTC.

c) Các cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc trên một bệnh nhân

Kết quả nghiên cứu ghi nhận 133 BN (chiếm 68% quần thể nghiên cứu) có liên quan đến 89 cụm lây truyền, trong đó 73 BN liên quan tới ít nhất 2 cụm lây truyền và có 1 BN liên quan tới 12 cụm. BN nằm trong khoa HSTC lâu hơn có xu hướng liên quan tới nhiều cụm lây truyền hơn. Điều này phản ánh tình trạng nghiêm trọng của sự xuất hiện cũng như lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc trên các BN điều trị tại khoa HSTC. Một BN khi nhập khoa HSTC có thể là người khởi đầu gây ra cụm lây nhiễm và cũng có thể trở thành người bị kéo vào thành một mắt xích trong chuỗi lây nhiễm. Blanco N. nghiên cứu phân tích tổng hợp về các con đường lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc trong BV đã chỉ ra 5 con đường có thể làm lây truyền các vi khuẩn này, bao gồm BN – môi trường, BN – nhân viên y tế, môi trường – BN, nhân viên y tế – BN và BN – BN, trong đó nguy cơ lây BN – BN có thể lên tới 40%¹³⁸. Một BN tại khoa HSTC có rất nhiều yếu tố nguy cơ mang hoặc nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc, đồng thời các con đường lây truyền những vi khuẩn này lại rất đa dạng và phức

tạp khiến cho mỗi BN dễ dàng liên quan tới ít nhất một hoặc nhiều cụm lây truyền, đặc biệt khi thời gian nằm viện dài.

4.3.7. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc dựa vào phenotypes

Căn cứ vào kiểu hình đề KKS của ba loài vi khuẩn trong nghiên cứu (phenotypes), kết hợp với điều tra dịch tễ về thời gian (thời gian BN nằm viện) và không gian (buồng bệnh HSTC mà BN nằm), chúng tôi đã xác định được một số cụm có khả năng lây truyền của các vi khuẩn này. Tuy xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn dựa vào phenotypes không được xem là tiêu chuẩn vàng nhưng trong điều kiện hạn chế về nguồn lực ở các nước đang phát triển thì đây cũng có thể là giải pháp phù hợp giúp kiểm soát các vụ dịch do vi khuẩn đa kháng thuốc gây ra, đặc biệt khi tác động của những vụ dịch này là rất nặng nề. Nghiên cứu đã phát hiện 55 phenotypes của loài *A. baumannii*, 85 phenotypes của loài *K. pneumoniae* và tới 106 phenotypes của loài *E. coli*. Việc xác định các phenotypes của 3 loài vi khuẩn này cho kết quả tương tự như kết quả xác định các sequence types với sự khu trú của một số lineages đặc trưng riêng đối với *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và sự đa dạng các lineages của *E. coli*. Tương tự như vậy, việc xác định các cụm lây truyền căn cứ vào phenotypes cũng cho kết quả tương tự với các cụm lây truyền của *A. baumannii* và *K. pneumoniae* tương đối lớn, liên quan đến nhiều BN, trong khi các cụm lây truyền của *E. coli* thì nhỏ hơn và liên quan đến ít BN hơn. Căn cứ vào kết quả nghiên cứu này có thể đề xuất việc xác định nguồn lây truyền của vi khuẩn dựa vào phenotypes là giải pháp có thể khuyến cáo sử dụng trong nỗ lực kiểm soát các vụ dịch do vi khuẩn đa kháng thuốc gây ra ở những cơ sở y tế chưa có điều kiện áp dụng ngay kỹ thuật NGS.

Theo tìm hiểu của chúng tôi, nghiên cứu chúng tôi tiến hành là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam thực hiện giải trình tự toàn bộ bộ gen bằng công nghệ

giải trình tự gen thể hệ mới cho hơn 2000 chủng vi khuẩn đa kháng thuốc nhằm giám sát về dịch tễ lây truyền của chúng trong bệnh viện. Nghiên cứu đã chỉ ra sự ưu thế của một số dòng (linage) vi khuẩn đa kháng thuốc của 3 loài vi khuẩn *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *E. coli* tại khoa HSTC, chỉ ra được các gen KKS phổ biến của những chủng vi khuẩn này. Đồng thời, chúng tôi cũng xác định được nguy cơ lây lan và các cụm lây truyền của những vi khuẩn đa kháng thuốc trên tại khoa HSTC trong thời gian nghiên cứu. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng còn những hạn chế nhất định. Thứ nhất, chúng tôi mới tập trung đánh giá sự xuất hiện và lây truyền các vi khuẩn trên BN và trên môi trường BV mà chưa đánh giá mối liên quan với nhân viên y tế và người nhà bệnh nhân, trong khi đây cũng có thể là những mắt xích quan trọng trong chuỗi lây truyền. Thứ hai, do hạn chế của kết quả đọc giải trình tự gen những đoạn ngắn nên chúng tôi chưa phân tích sâu được về cấu hình plasmid của các vi khuẩn để có thêm các thông tin về dịch tễ học di truyền của các chủng vi khuẩn. Thứ 3, nghiên cứu mới tìm hiểu các yếu tố lây truyền trong BV mà chưa tìm hiểu các yếu tố lây truyền trong cộng đồng nên chưa cung cấp được cái nhìn tổng thể về sự tồn tại cũng như các con đường lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc. Vì vậy, cần tiếp tục tiến hành các nghiên cứu giám sát dịch tễ học phân tử của vi khuẩn đa kháng thuốc trong bệnh viện và trong cộng đồng, giúp đánh giá toàn diện về sự ưu thế của các dòng vi khuẩn đa kháng thuốc, đặc điểm KKS, đặc điểm lây truyền để từ đó có những chiến lược kiểm soát phù hợp, hạn chế tối đa sự xuất hiện và lan tràn của chúng.

KẾT LUẬN

47 BN chẩn đoán xác định mắc VPLQTM được phân tích về căn nguyên gây bệnh và đánh giá kết quả điều trị; 2111 chủng vi khuẩn của 3 loài *A. baumannii*, *K. pneumonia*, *E. coli* (phân lập từ 196 BN và 150 mẫu môi trường) được giải trình tự toàn bộ bộ gen bằng công nghệ giải trình tự thế hệ mới để xác định các cụm lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc.

1. Căn nguyên và đặc tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây viêm phổi liên quan thở máy

- Căn nguyên gây VPLQTM gặp phổ biến là các vi khuẩn Gram âm, trong đó hàng đầu là *A. baumannii* (80,85%), *K. pneumonia* (48,94%) và *P. aeruginosa* (29,97%). Trong các vi khuẩn Gram dương, căn nguyên gặp nhiều nhất là *S. aureus* (21,28%) và cũng là căn nguyên thường gặp thứ 4.
- Ghi nhận sự đề kháng cao của các vi khuẩn với kháng sinh. *A. baumannii*: > 80% các chủng đã kháng với hầu hết các kháng sinh được làm kháng sinh đồ nhưng 100% còn nhạy với colistin; *K. pneumoniae*: > 90% các chủng đã kháng với nhóm cephalosporin, > 80% kháng với nhóm carbapenem; *P. aeruginosa*: > 90% các chủng đã kháng với gần như tất cả kháng sinh được thử, duy nhất Colistin còn nhạy cảm 100%; *S. aureus*: MRSA chiếm 77,80% nhưng còn nhạy cao với vancomycin (98,20%) và linezolid (98,70%).

2. Đánh giá kết quả điều trị bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy

- 36,18% BN tử vong hoặc xin về để tử vong; 63,82% BN ổn định ra viện hoặc chuyển viện do bệnh đỡ.
- Thời gian nằm viện tương đối dài, trung bình là $28,0 \pm 18,0$ ngày.
- Điều trị kháng sinh ban đầu phù hợp ở 41,18% nhóm BN tử vong và 70,00% nhóm BN sống. Phần lớn BN được điều trị phối hợp 2 hoặc 3 kháng sinh. Thời gian điều trị kháng sinh trung bình ở nhóm BN tử vong là $23,7 \pm 17,7$

ngày và ở nhóm BN sống là $26,4 \pm 19,5$ ngày. Sự khác biệt giữa 2 nhóm không có ý nghĩa thống kê.

3. Xác định nguồn lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

- Xuất hiện sự nổi trội của một số STs đặc trưng riêng tại địa điểm nghiên cứu (ST2 (48%) và ST571 (24%) của *A. baumannii*; ST15 (34%) và ST16 (30%) của *K. pneumoniae*). Đây cũng là những STs đặc trưng cho loài *A. baumannii* và *K. pneumoniae* tại Việt Nam và đã phân bố rộng khắp tại các BV. Không ghi nhận STs đặc trưng của *E. coli* tại cơ sở nghiên cứu.
- Nguồn lây truyền các vi khuẩn đa kháng thuốc luôn thường trực: có sự xuất hiện liên tục của *A. baumannii* và sự xuất hiện gián đoạn trong một thời gian ngắn của *K. pneumoniae* (trên BN và/hoặc trên môi trường) trong toàn bộ thời gian nghiên cứu. Tuy nhiên, *E. coli* xuất hiện gián đoạn nhiều lần, trong nhiều khoảng thời gian dài.
- Ghi nhận sự xuất hiện phổ biến và mức độ lan truyền quy mô lớn, hầu hết liên quan đến các chủng phân lập được từ môi trường của *A. baumannii* (39 cụm lây truyền, liên quan tới từ 2 đến 22 chủng) và *K. pneumoniae* (37 cụm lây truyền, liên quan từ 2 đến 53 chủng). Tuy nhiên, *E. coli* chỉ xuất hiện ít và lây truyền hạn chế (11 cụm lây truyền, liên quan từ 2 đến 6 chủng).

KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi xin đưa ra một số kiến nghị sau:

1. Các cơ sở y tế cần định kỳ nghiên cứu để xây dựng dữ liệu về thực trạng vi khuẩn đa kháng thuốc, đặc tính KKS và sự lây truyền của những vi khuẩn này tại cơ sở của mình, đặc biệt là tại các khoa HSTC, để từ đó có khuyến cáo sử dụng kháng sinh hợp lý trong điều trị và các biện pháp can thiệp kiểm soát nhiễm khuẩn hiệu quả, làm giảm lây lan các vi khuẩn đa kháng thuốc.
2. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới đã chứng tỏ được tính ưu việt trong việc xác định chính xác các ổ lây truyền vi khuẩn đa kháng thuốc tại BV. Tuy nhiên, kỹ thuật đòi hỏi nhân lực chất lượng cao và trang thiết bị hiện đại. Vì vậy, trong giai đoạn hiện nay, các BV tuyến cuối tại Việt Nam nên đưa kỹ thuật này vào triển khai khi cần đánh giá các ổ dịch NKBV và dần tiến tới triển khai thường qui trong sàng lọc, giám sát NKBV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Timsit J.F, Esaied W, Neuville M et al (2017). Update on ventilator-associated pneumonia. *F1000 Research*, 6 (1), 10-40.
2. Papazian L, Klompas M, Luyt C (2020). Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Medicine*, 1-19.
3. Bonell A, Azarrafiy R, Vu Thi Lan Huong et al (2019). 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*, 68(3), 511-518.
4. Trần Hữu Thông, Nguyễn Đạt Anh, Đặng Quốc Tuấn (2012). Nghiên cứu căn nguyên gây viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Cấp cứu và Hồi sức tích cực bệnh viện Bạch Mai. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 2, 65-69.
5. Võ Hữu Ngoan (2013). Nghiên cứu đặc điểm viêm phổi liên quan đến thở máy tại khoa sản sóc đặc biệt Bệnh viện Chợ Rẫy. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*. 17 (Phụ bản số 1), 213-219.
6. Trần Đỗ Hùng, Phạm Thành Suôi (2016). Khảo sát việc sử dụng kháng sinh trên bệnh nhân viêm phổi liên quan đến thở máy tại khoa Hồi sức tích cực - Bệnh viện đa khoa thành phố Cần Thơ - 2015. *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tháng 2, Số 1, 101 - 107.
7. Wilhelmina G.M, Rovers M.M, Bonten M.J (2009). Ventilator-associated pneumonia and mortality: a systematic review of observational studies. *Critical Care Medicine*, 37(10), 2709-18.
8. Buhl M, Peter S, Willmann M (2015). Prevalence and risk factors associated with colonization and infection of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(9), 1159-1170.

9. American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America (2005). Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(4), 388.
10. Kalil A.C, Metersky M.L, Klompas M et al (2016). 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*, 63(5), e61-e111.
11. Horan T.C, Andrus M, Dudeck M.A (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American journal of infection control*, 36(5), 309-332.
12. Mietto C, Pinciroli R, Patel N et al (2013). Ventilator Associated Pneumonia: Evolving Definitions and Preventive Strategies Discussion. *Respiratory care*, 58(6), 990-1007.
13. Centers for Disease Control Prevention (2019). CDC/NHSN Surveillance Definitions for Specific Types of Infections. *National Healthcare Safety Network*.
14. Kalil A.C, Metersky M.L, Klompas M et al (2016). 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*, 63(5), e61-e111.
15. Dudeck M.A, Edwards J.R, Allen-Bridson K et al (2015). National Healthcare Safety Network report, data summary for 2013, device-

- associated module. *American journal of infection control*, 43(3), 206-221.
16. Koulenti D, Tsigou E, Rello J et al (2017). Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *European journal of clinical microbiology infectious diseases*, 36(11), 1999-2006.
 17. Nguyễn Ngọc Quang, Đoàn Thị Mai Phương, Lê Thị Diễm Tuyết và cộng sự (2012). Tình hình viêm phổi liên quan đến thở máy tại khoa Hồi sức tích cực bệnh viện Bạch Mai. *Tạp chí Nội khoa Việt Nam*, 5, 57-62.
 18. Hà Sơn Bình (2015). *Nhận xét một số yếu tố liên quan và hiệu quả điều trị ở bệnh nhân viêm phổi liên quan đến thở máy*, Luận văn Bác sỹ chuyên khoa II, Trường Đại học Y Hà Nội.
 19. Lê Kiến Ngãi, Khu Thị Khánh Dung (2011). Tỷ lệ mắc, tử vong và một số yếu tố liên quan của viêm phổi thở máy. *Tạp chí nghiên cứu y học*, Phụ trương 74 (3).
 20. Trần Minh Điền, Phạm Anh Tuấn, Đặng Ánh Dương và cộng sự (2012). Viêm phổi liên quan thở máy ở bệnh nhân sau mổ tim mở tại khoa Hồi sức ngoại bệnh viện Nhi Trung ương. *Tạp chí nghiên cứu y học*, Phụ trương 80 (3A).
 21. Lê Thị Kim Nhung, Nguyễn Ngọc Khánh, Đỗ Thanh Hương và cộng sự (2015). Một số đặc điểm lâm sàng và tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện trên người cao tuổi tại bệnh viện Thống Nhất. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Phụ bản tập 19, Số 6.
 22. Hoàng Khánh Linh (2018). *Nghiên cứu đặc điểm viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực bệnh viện Bạch Mai giai đoạn 2017-2018*, Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

23. Vu Dinh Phu, Nadjm B, Nguyen Hoang Anh Duy et al (2017). Ventilator-associated respiratory infection in a resource-restricted setting: impact and etiology. *Journal of intensive care*, 5(1), 69.
24. Lê Kiến Ngãi, Khu Thị Khánh Dung (2017). Một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng và tỷ lệ tử vong của viêm phổi thở máy ở trẻ sơ sinh tại bệnh viện Nhi Trung ương năm 2012. *Tạp chí nghiên cứu và thực hành nhi khoa*, Số 1 (8-2017), 58-67.
25. Ronald J (2010). Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 51(Supplement_1), S81-S87.
26. European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Annual Epidemiological Report 2014: Antimicrobial Resistance and Healthcare-Associated Infections.
27. Toney B.S, Lynch-Smith D.J (2016). Chronic obstructive pulmonary disease and ventilator-associated pneumonia: an analysis and literature review into the intensive care unit exacerbation progression and acute pulmonary management. *Dimensions of Critical Care Nursing*. 35(1), 16-22.
28. Blot S, Kourenti D, Dimopoulos G et al (2014). Prevalence, risk factors, and mortality for ventilator-associated pneumonia in middle-aged, old, and very old critically ill patients. *Critical care medicine*, 42(3), 601-609.
29. Torres A, Niederman M.S, Chastre J et al (2017). 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), 50(3).

30. Restrepo M.I, Peterson J, Fernandez J.F et al (2013). Comparison of the bacterial etiology of early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia in subjects enrolled in 2 large clinical studies. *Respiratory care*, 58(7), 1220-1225.
31. Phạm Thái Dũng, Đỗ Quyết (2013). Nghiên cứu đặc điểm vi khuẩn ở bệnh nhân viêm phổi thở máy. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 17, Phụ bản số 3, 159 - 163
32. Vũ Đức Định, Nguyễn Thế Anh (2017). Nghiên cứu căn nguyên và tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây viêm phổi ở bệnh nhân thở máy do đột quỵ não tại khoa Hồi sức tích cực bệnh viện Hữu Nghị (6/2009 - 6/2015). *Tạp chí Truyền nhiễm Việt Nam*, Số 1 (17), 64 - 68.
33. Đặng Văn Ninh, Trần Văn Ngọc, Phạm Hùng Vân (2016). Đề kháng Carbapenem của *Pseudomonas aeruginosa* & *Acinetobacter baumannii* gây viêm phổi bệnh viện và viêm phổi thở máy tại khoa Hồi sức tích cực bệnh viện Nguyễn Tri Phương. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, Phụ bản Tập 20, số 1, 85 - 90.
34. Dương Bửu Lộc, Hoàng Văn Quang, Trịnh Thị Bích Hà (2018). Tỷ lệ viêm phổi thở máy và đề kháng kháng sinh do *Acinobacter baumannii* ở người cao tuổi tại bệnh viện Thống Nhất. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Phụ bản Tập 22, Số 1, 244 - 249.
35. Phạm Ngọc Trung, Lê Hồ Tiến Phương, Tôn Hoàng Dũng (2013). Khảo sát nguyên nhân gây viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích

cực bệnh viện An Giang. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học bệnh viện An Giang*, Số tháng 10/2013, 79 - 86.

36. Shamsuzzaman S.M (2015). Multidrug-resistant, Extensively drug-resistant and Pandrug-resistant bacteria and antimicrobial therapy in combination. *Journal of Medical Microbiology*, 9(2), 1-2.
37. Xie R, Zhang X.D, Zhao Q et al (2018). Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. *Emerging microbes infections*, 7(1), 1-10.
38. Chatterjee M, Anju C, Biswas L et al (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(1) 48-58.
39. World Health Organization (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. *South African Medical Journal*, 105 (5) 325-325.
40. Gelband H, Molly-Miller P, Pant S et al (2015). The state of the world's antibiotics 2015. *Wound healing southern africa*, 8(2) 30-34.
41. Chastre J, Fagon J.Y (2002). Ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory critical care medicine*, 165(7) 867-903.
42. Othman A.A, Abdelazim M.S (2017). Ventilator-associated pneumonia in adult intensive care unit prevalence and complications. *The Egyptian Journal of Critical Care Medicine*, 5(2) 61-63.
43. Bialvaei A.Z, Samadi-Kafil H (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current medical research opinion*, 31(4), 707-721.
44. Choi E.Y, Huh J.W, Lim C.M et al (2011). Relationship between the MIC of vancomycin and clinical outcome in patients with MRSA nosocomial pneumonia. *Intensive care medicine*, 37(4):639-647.

45. Bekaert M, Timsit J.F, Vansteelandt S et al (2011). Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184(10), 1133-1139.
46. Forel J.M., Voillet F, Pulina D et al (2012). Ventilator-associated pneumonia and ICU mortality in severe ARDS patients ventilated according to a lung-protective strategy. *Journal of Critical Care*, 16(2), 1-10.
47. Melsen W.G, Rovers M.M, Groenwold R.H et al (2013). Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *The Lancet infectious diseases*, 13(8), 665-671.
48. Larsson J, Itenov T.S, Bestle M.H (2017). Risk prediction models for mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of critical care*, 37, 112-118.
49. Karakuzu Z, Iscimen R, Akalin H et al (2018). Prognostic risk factors in ventilator-associated pneumonia. *International medical journal of experimental clinical research*, 24, 1321.
50. Tanrıverdi H, Tor M.M, Kart L et al (2015). Prognostic value of serum procalcitonin and C-reactive protein levels in critically ill patients who developed ventilator-associated pneumonia. *Annals of thoracic medicine*, 10(2), 137.
51. Souza-Oliveira A.C, Cunha T.M, Passos L.B.S et al (2016). Ventilator-associated pneumonia: the influence of bacterial resistance, prescription errors, and de-escalation of antimicrobial therapy on mortality rates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(5), 437-443.

52. Tang P, Gardy J.L (2014). Stopping outbreaks with real-time genomic epidemiology. *Genome medicine*, 6(11), 104.
53. Peacock S.J, Parkhill J, Brown N.M (2018). Changing the paradigm for hospital outbreak detection by leading with genomic surveillance of nosocomial pathogens. *Microbiology*, 164(10), 1213-1219.
54. Pallen M, Halachev M.R, Chan J.Z et al (2014). Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Birmingham, England. *Genome medicine*. 6(11), 1-13.
55. Török M, Peacock S (2012). Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory—pipe dream or reality? *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(10):2307-2308.
56. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K et al (2015). Dissemination of clonal complex 2 *Acinetobacter baumannii* strains co-producing carbapenemases and 16S rRNA methylase ArmA in Vietnam. *BMC infectious diseases*, 15(1), 1-7.
57. Tada T, Tsuchiya M, Shimada K et al (2017). Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC infectious diseases*, 17(1), 1-7.
58. Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương (2017). Báo cáo tổng kết năm 2016 và phương hướng, nhiệm vụ, giải pháp thực hiện năm 2017. Tháng 2 năm 2017.
59. Bộ Y tế (2015). *Hướng dẫn chẩn đoán và xử trí Hội sức tích cực*, 42-49. Quyết định số 1493/QĐ-BYT ngày 22/4/2015 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

60. Bộ Y tế (2017). *Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng*. Quyết định số 1539/QĐ-BYT ngày 20/4/2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
61. Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương (2016), *Sổ tay lấy bệnh phẩm*. Quy trình ISO 15189.
62. Lwanga S.K, Lemeshow S (1991). Sample size determination in health studies: a practical manual. World Health Organization.
63. Siegel J.D, Rhinehart E, Jackson M et al (2007). Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American journal of infection control*, 35(10), S165-S193.
64. Casadevall A, Pirofski L (2000). Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection immunity*, 68(12), 6511-6518.
65. Hong K. S, Saver J. L (2009). Quantifying the value of stroke disability outcomes: WHO global burden of disease project disability weights for each level of the modified Rankin Scale. *Stroke a journal of cerebral circulation*, 40(12), 3828.
66. Zhou X.Y, Ben S.Q, Chen H.L et al (2015). A comparison of APACHE II and CPIS scores for the prediction of 30-day mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. *International Journal of Infectious Diseases*, 30, 144-147.
67. Asai N, Watanabe H, Shiota A et al (2019). Efficacy and accuracy of qSOFA and SOFA scores as prognostic tools for community-acquired and healthcare-associated pneumonia. *International Journal of Infectious Diseases* 84, 89-96.

68. Nguyễn Đạt Anh, Nguyễn Thị Hương (2013). Các xét nghiệm thường qui áp dụng trong thực hành lâm sàng. Nhà xuất bản y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
69. Illumina (2016), *Nextera XT DNA library prep reference guide. Document 15031942 v 01*, Illumina, San Diego, CA.
70. Ewels P, Magnusson M, Lundin S et al (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048.
71. Wood D.E, Lu J, Langmead B.J (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome biology*, 20(1), 1-13.
72. Lu J, Breitwieser F.P, Thielen P et al (2017). Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *Peer Computer Science*, 3, e104.
73. Bankevich A, Nurk S, Antipov D et al (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.
74. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N et al (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
75. Parks D.H, Imelfort M, Skennerton C.T et al (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043-1055.
76. Treangen T.J, Ondov B.D, Koren S et al (2014). The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome biology*, 15(11), 1-15.
77. Croucher N.J, Page A.J, Connor T.R et al (2015). Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic acids research*, 43(3), e15-e15.

78. Stamatakis A (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
79. Letunic I, Bork P (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*, 47(W1), W256-W259.
80. Feldgarden M, Brover V, Haft D.H et al (2019). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates.
81. Jolley, K.A., J.E. Bray, M.C.J. Maiden. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open research*, 3.
82. Stimson J, Gardy J, Mathema B et al (2019). Beyond the SNP threshold: identifying outbreak clusters using inferred transmissions. *Molecular biology*, 36(3), 587-603.
83. Patil H.V, Patil V.C (2017). Incidence, bacteriology, and clinical outcome of ventilator-associated pneumonia at tertiary care hospital. *Journal of natural science, biology, medicine*, 8(1), 46.
84. Trần Văn Ngọc, Phạm Thị Ngọc Thảo, Trần Thị Thanh Nga (2017). Khảo sát đặc điểm kháng thuốc của *Pseudomonas aeruginosa* và *Acinetobacter baumannii* gây viêm phổi bệnh viện. *Thời sự Y học TP HCM*, Chuyên đề hô hấp, tập 3/2017.
85. Dương Minh Ngọc, Trần Văn Ngọc (2017). Khảo sát đặc điểm lâm sàng và đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi thở máy tại khoa Hô hấp bệnh viện Chợ Rẫy. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 21, số 2.

86. Nguyễn Ánh Tuyết, Trần Cát Đông, Đặng Công Hân và cộng sự (2019). Khảo sát tỉ lệ phân lập và đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* tại bệnh viện Nhân dân Gia định năm 2017-2018. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 23, số 6.
87. Ahmed S.S, Alp E, Hopman J et al (2016). Global epidemiology on colistin resistant *Acinetobacter baumannii*, *Journal of Infectious Diseases Therapy*, 4 (4), 287-292.
88. Đỗ Mạnh Hùng, Phạm Thành Suôi (2016). Khảo sát việc sử dụng kháng sinh trên bệnh nhân viêm phổi liên quan đến thở máy ở khoa Hồi sức tích cực bệnh viện Đa khoa thành phố Cần Thơ - 2015. *Tạp chí y học Việt Nam*, Tháng 2 - Số 1.
89. Nguyễn Văn Chi (2017). Nghiên cứu đặc điểm vi sinh gây viêm phổi bệnh viện sớm và viêm phổi bệnh viện muộn ở bệnh nhân thở máy tại khoa Cấp cứu bệnh viện Bạch Mai. *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tập 451 - Tháng 2-Số 2.
90. Le Kien Ngai, Wertheim H, Vu Dinh Phu et al (2016). High prevalence of hospital-acquired infections caused by gram-negative carbapenem resistant strains in Vietnamese pediatric ICUs: A multi-centre point prevalence survey. *Medicine*, 95(27).
91. Guo Y, Song G, Sun M et al (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 107.
92. Jiao Y, Qin Y, Liu J et al (2015). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study. *Pathogens global health*, 109(2), 68-74.

93. Huang X, Li G, Yi L et al (2015). The epidemiology of multidrug-resistant bacteria colonization and analysis of its risk factors in intensive care unit. *Europe PMC*, 27(8), 667-671.
94. Tang X, Xiao M, Zhuo C et al (2018). Multi-level analysis of bacteria isolated from inpatients in respiratory departments in China. *Journal of Thoracic Disease*, 10(5), 2666.
95. McConville T.H, Sullivan S.B, Gomez-Simmonds A et al (2017). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS One*, 12(10), e0186195.
96. Tischendorf J, De-Avila R.A, Safdar N (2016). Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review. *American journal of infection control* 44(5), 539-543.
97. Trần Minh Giang, Bùi Vạn Phú Quốc, Trần Văn Ngọc (2016). *P. aeruginosa* đa kháng: kết quả từ nghiên cứu lâm sàng trên bệnh nhân viêm phổi thở máy. *Tạp chí Y học thực hành*, 993, số 1/2016.
98. Singer M, Deutschman C.S, Seymour C.W et al (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*, 315(8), 801-810.
99. Dương Minh Ngọc, Trần Văn Ngọc (2017). Khảo sát đặc điểm lâm sàng và đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi thở máy tại khoa Hô Hấp, bệnh viện Chợ Rẫy. *Y học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 21, Số 2.
100. Li Y, Liu C, Xiao W et al (2020). Incidence, risk factors and outcomes of ventilator-associated pneumonia in traumatic brain injury: a meta-analysis. *Neurocritical care*, 32(1), 272-285.

101. Dương Bửu Lộc, Hoàng Văn Quang, Trịnh Thị Bích Hà (2018). Các yếu tố tiên lượng tử vong viêm phổi thở máy do *Acinetobacter baumannii* ở người cao tuổi. *Tạp chí nghiên cứu y học*, Phụ bản tập 22 - Số 1.
102. Wu D, Wu C, Zhang S et al (2019). Risk factors of ventilator-associated pneumonia in critically III patients. *Frontiers in pharmacology*, 10, 482.
103. Berzina G, Sveen U, Paanalahti M et al (2016). Analyzing the modified Rankin scale using concepts of the international classification of functioning, disability and health. *European journal of physical and rehabilitation medicine*, 52(2), 203-13.
104. Schreiber M.P, Shorr A.F (2017). Challenges and opportunities in the treatment of ventilator-associated pneumonia. *Expert review of anti-infective therapy*, 15(1), 23-32.
105. Martin-Loeches I, Rodriguez A.H, Torres A (2018). New guidelines for hospital-acquired pneumonia/ventilator-associated pneumonia: USA vs. Europe. *Current opinion in critical care*, 24(5), 347-352.
106. Arthur L.E, Kizor R.S, Selim A.G et al (2016). Antibiotics for ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10.
107. Wang G, Ji X, Xu Y et al (2016). Lung ultrasound: a promising tool to monitor ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Critical Care*, 20(1), 1-10.
108. But A, Yetkin M.A, Kanyilmaz D et al (2017). Analysis of epidemiology and risk factors for mortality in ventilator-associated pneumonia attacks in intensive care unit patients. *Turkish journal of medical sciences*, 47(3), 812-816.
109. D'Souza A.W, Potter R.F, Wallace M et al (2019). Spatiotemporal dynamics of multidrug resistant bacteria on intensive care unit surfaces. *Nature communications*, 10(1), 1-19.

110. Wang, M., H. Wei, Y. Zhao, et al. (2019). Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 19(1):86.
111. Shrivastava S.R, Shrivastava P.S, Ramasamy J (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*, 32(1), 76.
112. Matsui M, Suzuki M, Suzuki M et al. (2018). Distribution and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* international clone II lineage in Japan. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 62(2).
113. Villalón P, Valdezate S, Cabezas T et al (2015). Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC microbiology*, 15(1), 1-9.
114. Kiaei S, Moradi M, Hosseini-Nave H et al (2019). Endemic dissemination of different sequence types of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains harboring bla_{NDM} and 16S rRNA methylase genes in Kerman hospitals, Iran, from 2015 to 2017. *Infection drug resistance*, 12, 45.
115. Pietsch M, Eller C, Wendt C et al (2017). Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. *Veterinary microbiology*, 200, 130-137.
116. Salipante S.J, Roach D.J, Kitzman J.O et al (2015). Large-scale genomic sequencing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Genome research*, 25(1), 119-128.

117. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R et al (2015). Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 59(6), 3406-3412.
118. Odewale G, Adefioye O, Ojo J et al (2016). Multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* in Ladoke Akintola university teaching hospital, Osogbo, Nigeria. *European Journal of Microbiology Immunology*, 6(3), 238-243.
119. Rao M, Rashid F.A, Shukor S et al (2020). Detection of antimicrobial resistance genes associated with carbapenem resistance from the whole-genome sequence of *Acinetobacter baumannii* isolates from Malaysia. *Canadian Journal of Infectious Diseases Medical Microbiology*, 2020, 1-9.
120. Han L, Lei J, Xu J et al (2017). *bla*OXA-23-like and *bla*TEM rather than *bla*OXA-51-like contributed to a high level of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* strains from a teaching hospital in Xi'an, China. *Baltimore Medicine*, 96(48).
121. Pragasam A, Vijayakumar S, Bakthavatchalam Y et al (2017). Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India. *Indian journal of medical microbiology*, 34(4), 433-441.
122. Wyres K.L, Lam M.M, Holt K.E (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6):344-359.
123. Zhou H, Zhang K, Chen W et al (2020). Epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* collected from 17 hospitals in Nanjing district of China. *Antimicrobial Resistance Infection Control*, 9(1), 1-10.

124. Dagher C, Salloum T, Alousi S et al (2018). Molecular characterization of Carbapenem resistant *Escherichia coli* recovered from a tertiary hospital in Lebanon. *PLoS One*, 13(9), e0203323.
125. Tyson G.H, McDermott P.F, Li C et al (2015). WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(10), 2763-2769.
126. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M et al (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International journal of antimicrobial agents*, 41(1), 11-19.
127. Kim D.H, Choi J.Y, Kim H.W et al. (2013). Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 2 in Asia and AbaR-type resistance islands. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 57(11), 5239-5246.
128. David S, Reuter S, Harris S.R et al (2019). Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nature microbiology*, 4(11), 1919-1929.
129. Runcharoen C, Moradigaravand D, Blane B et al (2017). Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. *Genome medicine*, 9(1), 1-10.
130. Clermont O, Dixit O.V, Vangchhia B et al (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental microbiology*, 21(8), 3107-3117.
131. Runcharoen C, Raven K.E, Reuter S et al (2017). Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. *Genome medicine*, 9(1), 1-11.

132. Dekic S, Hrenovic J, Ivankovic T et al (2018). Survival of ESKAPE pathogen *Acinetobacter baumannii* in water of different temperatures and pH. *Water Science Technology*, 78(6), 1370-1376.
133. Davis G.S, Price L.B (2016). Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections. *Current environmental health reports*, 3(2), 128-135.
134. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 252-275.
135. Rutala W.A, Gergen M.F, Sickbert-Bennett E.E et al (2019). Antimicrobial activity of a continuously active disinfectant against healthcare pathogens. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 40(11), 1284-1286.
136. Eigenbrod T, Reuter S, Gross A et al (2019). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using WGS revealed missed transmission events in Germany from 2012–15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(12), 3473-3480.
137. Wendel A.F, Malecki M, Otchwemah R et al (2018). One-year molecular surveillance of carbapenem-susceptible *A. baumannii* on a German intensive care unit: diversity or clonality. *Antimicrobial Resistance Infection Control*, 7(1), 1-9.
138. Bogaty C, Mataseje L, Gray A et al (2018). Investigation of a Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* outbreak using whole genome sequencing versus a standard epidemiologic investigation. *Antimicrobial Resistance Infection Control*, 7(1), 1-7.

139. Blanco N, O'Hara L.M, Harris A.D et al (2019). Transmission pathways of multidrug-resistant organisms in the hospital setting: a scoping review. *Infection control hospital epidemiology*, 40(4), 447.

PHỤ LỤC 1

PHIẾU THÔNG TIN DÀNH CHO BỆNH NHÂN

Tên nghiên cứu: Nghiên cứu căn nguyên, kết quả điều trị và xác định đường lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc gây viêm phổi liên quan đến thở máy bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

Tên nhà tài trợ: Đề tài hợp tác song phương giữa chính phủ Anh và chính phủ Việt Nam

Thông tin chung về nghiên cứu

Nghiên cứu này do Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung Ương (NHTD) phối hợp với Trường Đại học Cambridge, Vương quốc Anh thực hiện. Nghiên cứu viên chính là GS.TS.BS Nguyễn Văn Kính của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung Ương và TS Estee Torok của Trường Đại học Cambridge.

Anh/chị/người nhà anh/chị được lựa chọn tham gia nghiên cứu vì anh/chị/người nhà anh/chị là những người có nguy cơ bị nhiễm khuẩn bệnh viện. Việc tham gia vào nghiên cứu này của anh/chị/người nhà anh/chị là hoàn toàn tự nguyện và quyết định có tham gia hay không không ảnh hưởng tới những dịch vụ hoặc những lợi ích khác mà anh/chị/người nhà anh/chị được nhận.

Vì sao cần thực hiện nghiên cứu này?

Mục đích của nghiên cứu là tìm ra căn nguyên vi khuẩn và xác định các thức lây truyền của các vi khuẩn này ở những bệnh nhân bị nhiễm khuẩn bệnh viện. Những thông tin được anh chị cung cấp cho chúng tôi sẽ có giá trị trong xây dựng các qui trình giúp hạn chế tình trạng nhiễm khuẩn bệnh viện, giúp giảm được gánh nặng kinh tế xã hội cho các bệnh nhân và cho toàn xã hội.

Anh/chị/người nhà anh/chị sẽ làm gì khi tham gia?

Nếu đồng ý tham gia, anh/chị/người nhà anh/chị sẽ thực hiện những nội dung:

- Ký bản chấp thuận tham gia nghiên cứu

- Cho phép sử dụng mẫu bệnh phẩm là phân, nước tiểu, đờm/dịch hút phế quản, dịch vết thương của anh/chị/người nhà anh/chị để làm xét nghiệm tìm căn nguyên vi khuẩn và đặc tính di truyền của các vi khuẩn đó.

Thời gian tham gia là bao lâu?

Trong thời gian anh/chị/người nhà anh/chị nằm viện, tại thời điểm vào nghiên cứu, kết thúc nghiên cứu và cứ mỗi 7 ngày chúng tôi sẽ lấy 1 mẫu bệnh phẩm phân, nước tiểu, đờm/dịch hút phế quản, dịch vết thương để làm xét nghiệm.

Có bất kỳ rủi ro hoặc bất lợi nào có thể xảy ra khi tham gia không?

Đây là nghiên cứu quan sát mô tả, không thực hiện bất kỳ can thiệp nào đối với anh/chị/người nhà anh/chị. Việc thu thập mẫu bệnh phẩm được thực hiện theo đúng qui trình thường qui đang được áp dụng tại bệnh viện. Do đó nghiên cứu không mang tới thêm bất kỳ nguy cơ về thể chất nào cho anh/chị/người nhà anh/chị.

Có lợi ích gì khi tham gia?

Bệnh nhân sẽ không được trả tiền khi tham gia nghiên cứu, nhưng tất cả xét nghiệm của nghiên cứu sẽ được chi trả bởi nhà tài trợ. Một số kết quả kiểm tra này sẽ giúp các bác sỹ trong việc chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh nhân và cho phép xác định được nguyên nhân gây viêm phổi, đặc tính kháng kháng sinh từ đó giúp bác sỹ đưa ra quyết định điều trị phù hợp cho anh/chị/người nhà anh/chị. Kết quả của nghiên cứu sẽ giúp chúng tôi tìm được các phương pháp làm giảm tỷ lệ bệnh nhân bị nhiễm khuẩn bệnh viện, giúp giảm gánh nặng bệnh tật, tổn thất kinh tế xã hội cho các bệnh nhân và cho toàn xã hội.

Lựa chọn khác nếu không tham gia nghiên cứu là gì?

Sự giam gia của anh/chị trong nghiên cứu này là hoàn toàn tự nguyện. Anh/chị/người nhà anh/chị có thể quyết định dừng tham gia nghiên cứu trong bất kỳ thời điểm nào, quyết định có tham gia nghiên cứu hay không sẽ không ảnh hưởng tới các dịch vụ và lợi ích hiện tại của anh/chị/người nhà anh/chị.

Thông tin về người tham gia có được giữ bí mật không?

Bệnh nhân sẽ được bảo đảm rằng mọi thông tin thu được từ nghiên cứu sẽ được bảo mật. Tên của bệnh nhân sẽ không được ghi trong cơ sở dữ liệu hoặc trên các mẫu được lưu trữ. Bất kỳ ấn phẩm hay báo cáo khoa học nào đều không nêu tên bệnh nhân, bao gồm cả tên đầy đủ hay tên viết tắt. Khi nhóm nghiên cứu xem thông tin trong bệnh án, họ cũng sẽ phải đảm bảo giữ bí mật thông tin.

Quyền của người tham gia nghiên cứu

Anh/chị/người nhà anh/chị có thể lựa chọn tham gia nghiên cứu hoặc không và có thể hủy bỏ sự đồng ý, ngừng tham gia bất cứ lúc nào.

Với bất kỳ quyết định nào, anh/chị/người nhà anh/chị sẽ không gặp phải bất lợi, công việc của anh/chị sẽ không bị ảnh hưởng.

Anh/chị/người nhà anh/chị có thể từ chối trả lời bất kỳ câu hỏi nào mà anh/chị không muốn trả lời mà vẫn tiếp tục tham gia nghiên cứu.

Liên lạc với ai nếu có câu hỏi về nghiên cứu?

Nếu có bất kỳ câu hỏi, ý kiến hoặc quan tâm tới nghiên cứu, anh/chị có thể liên hệ với:

- Nghiên cứu viên chính luôn sẵn sàng trả lời bất kỳ câu hỏi nào của anh/chị về nghiên cứu tại các thời điểm phù hợp:

GS.TS.BS Nguyễn Văn Kính, Giám đốc Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TW

78 Giải Phóng, Đống Đa, Hà Nội

ĐT: 0913315243

Email: kinhnv@nhtd.vn

- Hội đồng đạo đức Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung Ương:

78 Giải Phóng, Đống Đa, Hà Nội

ĐT: 04.35764088

Hà Nội, ngày tháng năm

Họ tên và chữ ký của nghiên cứu viên

PHIẾU CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tên nghiên cứu: Nghiên cứu căn nguyên, kết quả điều trị và xác định đường lây truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc gây viêm phổi liên quan đến thở máy bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

Tên nhà tài trợ: Đề tài hợp tác song phương giữa chính phủ Anh và chính phủ Việt Nam

Tôi đã đọc phiếu thông tin và tự nguyện đồng ý tham gia nghiên cứu. Nhóm nghiên cứu đã dành thời gian cho tôi đặt câu hỏi. Tôi sẽ ký vào hai bản Phiếu chấp thuận tham gia nghiên cứu và được giữ một bản.

Tôi đã được trao đổi về nguy cơ và lợi ích khi tham gia nghiên cứu. Tôi đã nhận được câu trả lời thỏa đáng cho câu hỏi của mình.

Tôi đồng ý cho nhóm nghiên cứu thu thập các thông tin liên quan đến sức khỏe và các mẫu bệnh phẩm quy định trong nghiên cứu; và sử dụng vào các nghiên cứu y học tương lai.

Tôi hiểu rằng tôi có thể rút khỏi nghiên cứu bất kỳ lúc nào. Nếu rút khỏi nghiên cứu, tôi hiểu rằng việc chăm sóc sức khỏe trong tương lai sẽ không bị ảnh hưởng; và tôi đồng ý cho nghiên cứu tiếp tục sử dụng các thông tin thu thập cho tới thời điểm rút khỏi nghiên cứu.

MÃ SỐ NGHIÊN CỨU: [_ _] – [_] [_] [_]

NGƯỜI THAM GIA NGHIÊN CỨU: Sau khi ký tên và ghi ngày ký, tôi xác nhận vào các nội dung nêu trên đây.

| | | |
|--------|--------|----------------|
| | | __ / __ / ____ |
| Chữ ký | Họ tên | Ngày ký |

NGƯỜI ĐẠI DIỆN: Sau khi ký tên và ghi ngày ký, tôi xác nhận vào các nội dung nêu trên đây.

| | | | |
|--------|--------|---|-------------------|
| | | | ___/___/____ - |
| Chữ ký | Họ tên | Quan hệ với người tham gia nghiên cứu | Ngày ký |

NHÂN VIÊN NGHIÊN CỨU: Sau khi ký tên và ghi ngày ký, tôi xác nhận đã giải thích đầy đủ thông tin nghiên cứu cho người tham gia nghiên cứu trên đây và cung cấp một bản phiếu chấp thuận cho người tham gia nghiên cứu/người đại diện.

| | | |
|--------|--------|--------------|
| | | ___/___/____ |
| Chữ ký | Họ tên | Ngày ký |

NGƯỜI LÀM CHỨNG ĐỘC LẬP: Sau khi ký tên và ghi ngày ký, tôi xác nhận đã có mặt trong suốt toàn bộ quá trình lấy chấp thuận tham gia nghiên cứu. Phiếu này đã được đọc chính xác cho người tham gia nghiên cứu/ người đại diện. Nhóm nghiên cứu đã trả lời tất cả các câu hỏi và người tham gia nghiên cứu/ người đại diện đồng ý tham gia nghiên cứu.

| | | |
|--------|--------|--------------|
| | | ___/___/____ |
| Chữ ký | Họ tên | Ngày ký |

PHỤ LỤC 2

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--|
| CRF THÔNG TIN BỆNH NHÂN | PINF |
| Mã số nghiên cứu [] [] - [] [] [] [] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] [] [] [] [] [] |

| | |
|---|--|
| 1 | Họ và tên (IN HOA)* [_____] |
| 2 | Mã hồ sơ bệnh án* [_____] |
| 3 | Giới tính <input type="radio"/> Nam <input type="radio"/> Nữ |
| 4 | Tuổi [] [] [] hoặc năm sinh [] [] [] [] |
| 5 | Địa chỉ a. Xã/phường [_____] b. Quận/huyện [_____] c. Tỉnh/thành [_____] |
| 6 | Nghề nghiệp <input type="radio"/> Học sinh / sinh viên <input type="radio"/> Nhân viên hành chính / văn phòng <input type="radio"/> Kinh doanh / bán hàng <input type="radio"/> Công nhân / lao động phổ thông <input type="radio"/> Nông dân / ngư dân <input type="radio"/> Nội trợ <input type="radio"/> Hưu trí <input type="radio"/> Thất nghiệp <input type="radio"/> Không biết <input type="radio"/> Khác, ghi rõ: [_____] |

*: Không nhập vào cơ sở dữ liệu

| | |
|--|--|
| Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ | Ngày điền (nn/tt/nn): [] [] / [] [] / [] [] |
|--|--|

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--------------------------------------|
| CRF VÀO VIỆN (1) | ADM1 |
| Mã số nghiên cứu []-[] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] |

I – THÔNG TIN VỀ NHẬP VIỆN

| | |
|---|--|
| 1 | Bệnh nhân hiện đang nằm ở giường số [] |
| 2 | Thời gian vào viện (nn/tt/nm gg:pp) []/[]/[] []:[] |
| 3 | Thời gian vào nghiên cứu (nn/tt/nm gg:pp) []/[]/[] []:[] |
| 4 | Nơi chuyển tới <input type="radio"/> Vào thẳng <input type="radio"/> Chuyển viện Nếu chuyển viện: Tổng thời gian nằm viện ở tuyến trước: [] ngày Tuyến cao nhất mà bệnh nhân từng nằm: <input type="radio"/> Trung ương <input type="radio"/> Tỉnh <input type="radio"/> Huyện |
| 5 | Số ngày khởi phát triệu chứng [] ngày |
| 6 | Trong 1 năm qua từng nhập viện hiện tại <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không Nếu có, có từng nằm ICU không <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| 7 | Trong 1 năm qua từng nhập viện khác <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không Nếu có, có từng nằm ICU không <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| 8 | Trong 1 năm qua từng nhập viện ở nước ngoài <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không Nếu có, có từng nằm ICU không <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |

II – TIỀN SỬ

| | | Có | Không | Không rõ |
|----|---|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 9 | Bệnh lý tim mạch | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 10 | Bệnh lý hô hấp | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 11 | Bệnh lý mạch máu não | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 12 | Suy thận mạn có lọc máu chu kỳ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 13 | Xơ gan | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 14 | Ung thư | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 15 | Đái tháo đường | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 16 | Sử dụng thuốc ức chế miễn dịch, corticoid | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 17 | HIV | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 18 | Ghép tuỷ xương | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 19 | Ghép tạng | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 20 | Bệnh lý tự miễn | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 21 | Tiêm chích ma tuý | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--|
| CRF VÀO VIỆN (1) | ADM1 |
| Mã số nghiên cứu []-[]-[]-[] | Tên viết tắt của đối tượng NC []-[]-[]-[] |

| | | | | |
|----|---|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 22 | Nghiện rượu | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 23 | Nghiện thuốc lá | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 24 | Phẫu thuật/tiểu phẫu trong vòng 90 ngày trước vào viện / đối với răng: trong vòng 1 năm nếu có implant (không tính trong đợt bệnh hiện tại) (ghi rõ loại phẫu thuật, vị trí) | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 25 | Đẻ thường trong vòng 6 tuần | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 26 | Bệnh lý khác: <input type="radio"/> Có, ghi rõ: <input type="radio"/> Không | | | |

III – SỬ DỤNG KHÁNG SINH TRƯỚC KHI VÀO VIỆN

| | | | | |
|----|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 27 | Bệnh nhân có dùng kháng sinh trong vòng 90 ngày trước khi khởi phát triệu chứng không? <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không <input type="radio"/> Không biết | | | |
| | | <i>Tên kháng sinh</i> | <i>Tự mua</i> | <i>Kê đơn</i> |
| | | | <i>Không biết</i> | |
| | | 1 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 2 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 3 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 4 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 5 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 28 | Bệnh nhân có dùng kháng sinh trong thời gian sau khi khởi phát triệu chứng và trước khi nhập viện hiện tại không? <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không <input type="radio"/> Không biết | | | |
| | | <i>Tên kháng sinh</i> | <i>Tự mua</i> | <i>Kê đơn</i> |
| | | | <i>Không biết</i> | |
| | | 1 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 2 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 3 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 4 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | | 5 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

IV – CAN THIỆP/THỦ THUẬT TRONG ĐỢT BỆNH NÀY TRƯỚC KHI VÀO ICU

| | | | | |
|----|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Có | Không | Không rõ |
| 29 | Đặt ống NKQ/MKQ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 30 | Đặt catheter TM, ĐM | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 31 | Phẫu thuật (đại phẫu và tiểu phẫu) | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--|
| CRF VÀO VIỆN (1) | ADM1 |
| Mã số nghiên cứu [] [] - [] [] [] [] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] [] [] [] [] [] |

| | | | | |
|----|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 32 | Lọc máu/lọc huyết thương/ECMO | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 33 | Đặt sonde tiểu | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 34 | Đặt sonde dạ dày | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 35 | Chọc dịch các màng, chọc hút tế bào | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 36 | Các thủ thuật khác | <input type="radio"/> Ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

V – PHÂN LẬP VI SINH TRƯỚC KHI VÀO ICU

| | |
|----|---|
| 37 | Số căn nguyên: [] |
| 38 | <p><i>Căn nguyên thứ nhất</i></p> <p>a. Bệnh phẩm: <input type="radio"/> Đờm <input type="radio"/> Nước tiểu <input type="radio"/> Phân <input type="radio"/> Máu <input type="radio"/> Vết thương <input type="radio"/> Khác, ghi rõ:</p> <p>b. Căn nguyên: <input type="radio"/> <i>A. baumannii</i> <input type="radio"/> <i>P. aeruginosa</i> <input type="radio"/> <i>K. pneumoniae</i> <input type="radio"/> <i>E. coli</i> <input type="radio"/> Khác:</p> |
| 39 | <p><i>Căn nguyên thứ hai</i></p> <p>a. Bệnh phẩm: <input type="radio"/> Đờm <input type="radio"/> Nước tiểu <input type="radio"/> Phân <input type="radio"/> Máu <input type="radio"/> Vết thương <input type="radio"/> Khác, ghi rõ:</p> <p>b. Căn nguyên: <input type="radio"/> <i>A. baumannii</i> <input type="radio"/> <i>P. aeruginosa</i> <input type="radio"/> <i>K. pneumoniae</i> <input type="radio"/> <i>E. coli</i> <input type="radio"/> Khác:</p> |
| 40 | <p><i>Căn nguyên thứ ba</i></p> <p>a. Bệnh phẩm: <input type="radio"/> Đờm <input type="radio"/> Nước tiểu <input type="radio"/> Phân <input type="radio"/> Máu <input type="radio"/> Vết thương <input type="radio"/> Khác, ghi rõ:</p> <p>b. Căn nguyên: <input type="radio"/> <i>A. baumannii</i> <input type="radio"/> <i>P. aeruginosa</i> <input type="radio"/> <i>K. pneumoniae</i> <input type="radio"/> <i>E. coli</i> <input type="radio"/> Khác:</p> |
| 41 | Kháng sinh đồ: Có (ghi kết quả trong giấy chuyển ở dưới hoặc photo kết quả) <input type="radio"/> Không |

VI – CHẨN ĐOÁN SƠ BỘ LÚC VÀO VIỆN

(có thể lựa chọn nhiều chẩn đoán)

| 42 | Chẩn đoán |
|----|--|
| a | Sốc nhiễm trùng <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--|
| CRF VÀO VIỆN (1) | ADM1 |
| Mã số nghiên cứu [] [] - [] [] [] [] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] [] [] [] [] [] |

| | | |
|---|--|--|
| b | Viêm phổi Phân loại | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không <input type="radio"/> Mắc phải tại bệnh viện <input type="radio"/> Mắc phải tại cộng đồng <input type="radio"/> Không rõ |
| c | Nhiễm trùng huyết Phân loại | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không <input type="radio"/> Có sonde tiểu <input type="radio"/> Không có sonde tiểu |
| d | Nhiễm trùng huyết có liên quan đến catheter | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| e | Nhiễm khuẩn tiết niệu Phân loại | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không <input type="radio"/> Có sonde tiểu <input type="radio"/> Không có sonde tiểu |
| f | Nhiễm trùng hệ thần kinh trung ương Phân loại | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không <input type="radio"/> Viêm não <input type="radio"/> Viêm màng não <input type="radio"/> Viêm não – màng não |
| g | Nhiễm trùng tiêu hoá | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| h | Nhiễm trùng đường mật | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| i | Nhiễm trùng da, mô mềm | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| j | Nhiễm trùng vết mổ, vết thương, vết loét | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| k | Viêm nội tâm mạc | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| l | Uốn ván | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| m | Khác | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| | 1. | |
| | 2. | |
| | 3. | |

| | |
|--|--|
| Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ | Ngày điền (nn/tt/nn): [] [] / [] [] / [] [] |
|--|--|

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--------------------------------------|
| CRF VÀO VIỆN (2) | ADM2 |
| Mã số nghiên cứu []-[] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] |

VII – TRIỆU CHỨNG CƠ NĂNG

| | Triệu chứng | Có | Không | Không rõ |
|----|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 43 | Sốt > 38°C | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 44 | Hạ thân nhiệt < 36°C | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 45 | Hạ huyết áp (HA tối đa <90mmHg) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 46 | Suy hô hấp hoặc nhịp thở >20 lần/phút | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 47 | Ho khạc đờm | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 48 | Xuất huyết dưới da | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 49 | Xuất huyết niêm mạc (vd. đường tiêu hóa) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 50 | Mụn, phỏng nước trên da | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 51 | Hạch ngoại vi sưng to | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 52 | Tiểu buốt/tiểu rắt/tiểu đục | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 53 | Rối loạn ý thức | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 54 | Tiêu chảy/đi ngoài phân lỏng | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 55 | Vết thương/vết loét/bong không mũ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 56 | Vết thương/vết loét/bong mưng mủ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

VIII – TRIỆU CHỨNG THỰC THỂ

| | |
|---|---|
| 57 | Tình trạng tinh thần: <input type="radio"/> Bình thường <input type="radio"/> Lú lẫn mới <input type="radio"/> Hôn mê <input type="radio"/> An thần |
| 58 | Điểm Glasgow: Mắt: []/4 Ngôn ngữ: []/5 (ghi “T” nếu đặt ống) Vận động: []/6 HOẶC Toàn bộ: []/15 |
| 59 | Nhiệt độ: []-[] °C |
| 60 | Mạch/nhịp tim: [] lần/phút |
| 61 | Huyết áp: []/[] mmHg |
| 62 | Nhịp thở: [] lần/phút (ghi thông số trên máy thở nếu đang thở theo máy) |
| 63 | SpO2: []% Chế độ thở: <input type="radio"/> Khí phòng <input type="radio"/> Oxy không xâm nhập <input type="radio"/> Oxy xâm nhập FiO2: []% HOẶC Lưu lượng oxy: [] L/ph |
| 64 | Số lượng nước tiểu 24h: [] mL/24h |
| 65 | Thuốc vận mạch đang dùng Dobutamine <input type="radio"/> Có, liều [] mcg/kg/phút <input type="radio"/> Không Dopamine <input type="radio"/> Có, liều [] mcg/kg/phút <input type="radio"/> Không Noradrenaline <input type="radio"/> Có, liều [] mcg/kg/phút <input type="radio"/> Không Adrenaline <input type="radio"/> Có, liều [] mcg/kg/phút <input type="radio"/> Không |
| Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ Ngày điền (nn/tt/nn): []/[]/[] | |

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--------------------------------------|
| CRF CẬN LÂM SÀNG | LAB |
| Mã số nghiên cứu []-[] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] |

Ghi nhận kết quả gần đây nhất

| | | |
|---|----------------------------|--|
| 1 | Ngày điền phiếu (nn/tt/nn) | []/[]/[] |
| 2 | Thời điểm điền phiếu | <input type="radio"/> Lúc vào nghiên cứu <input type="radio"/> Hàng tuần |

Khí máu động mạch

| | | | | | |
|---|------|----------|---|---------|----------------|
| 3 | FiO2 | [] % | 6 | HCO3 | [] mmol/L |
| 4 | pH | [].[] | 7 | PaCO2 | [] mmHg |
| 5 | PaO2 | [] mmHg | 8 | Lactate | [].[] mmol/L |

Huyết học / Sinh hóa

| | | | | | |
|----|------------|----------------|----|---------------|----------------|
| 9 | Bạch cầu | [].[] G/L | 18 | Na+ | [] mmol/L |
| 10 | % TT | [].[] % | 19 | K+ | [].[] mmol/L |
| 11 | % lympho | [].[] % | 20 | Bilirubin TP | [] μmol/L |
| 12 | Hematocrit | [].[] % | 21 | Albumin | [] g/L |
| 13 | Hemoglobin | [] g/L | 22 | AST | [] UI/L |
| 14 | Tiểu cầu | [] G/L | 23 | ALT | [] UI/L |
| 15 | Ure | [] mmol/L | 24 | LDH | [] UI/L |
| 16 | Creatinine | [] μmol/L | 25 | CRP | [] mg/L |
| 17 | Glucose | [].[] mmol/L | 26 | Procalcitonin | [].[] pg/L |

Tổng phân tích nước tiểu

| | | | | | |
|----|--------------|-------------|----|---------|-----|
| 27 | pH | [].[] | 29 | BC niệu | [] |
| 28 | Protein niệu | [].[] g/L | 30 | HC niệu | [] |

Siêu âm bụng

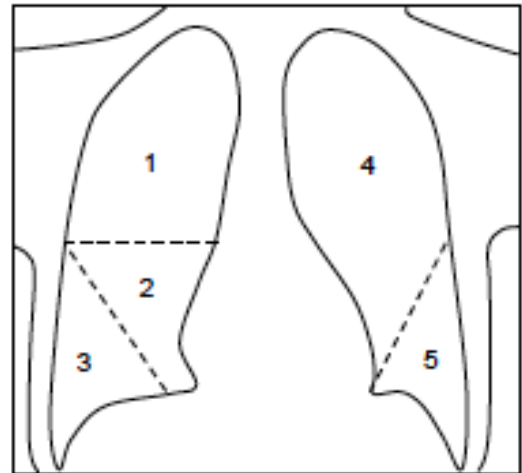
| | | |
|----|----------------------------------|--|
| 31 | Tràn dịch màng phổi nhiều (>1cm) | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| 32 | Tràn dịch ổ bụng | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| 33 | Gan to | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| 34 | Lách to | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--|
| CRF CẬN LÂM SÀNG | LAB |
| Mã số nghiên cứu [] [] - [] [] [] [] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] [] [] [] [] [] |

| | | | |
|----|---------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 35 | Xơ gan | <input type="radio"/> Có | <input type="radio"/> Không |
| 36 | Các bất thường khác | <input type="radio"/> Có | <input type="radio"/> Không |

X-quang ngực

| | |
|----|--|
| 37 | Thâm nhiễm: <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không Nếu Có, vị trí thâm nhiễm <input type="checkbox"/> Vùng 1 <input type="checkbox"/> Vùng 2 <input type="checkbox"/> Vùng 3 <input type="checkbox"/> Vùng 4 <input type="checkbox"/> Vùng 5 |
| 38 | Đông đặc: <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| 39 | Hang: <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| 40 | Tràn dịch màng phổi: <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |



| | |
|--|--|
| Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ | Ngày điền (nn/tt/nn): [] [] / [] [] / [] [] |
|--|--|

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--------------------------------------|
| CRF HÀNG TUẦN | WEEK |
| Mã số nghiên cứu []-[] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] |

Tuần thứ []

| | |
|---|---|
| 1 | Ngày điền phiếu (nn/tt/nn) []/[]/[] |
| 2 | Bệnh nhân hiện đang nằm ở giường số [] |

I – NHIỄM TRÙNG NGHI NGỜ XUẤT HIỆN TRONG 1 TUẦN NÀM VIỆN VỪA QUA

| 3 | Chẩn đoán | Có | Không | Nếu có, ngày xuất hiện (nn/tt/nn) |
|---|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| a | Sốc nhiễm trùng | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| b | Viêm phổi mắc phải tại bệnh viện | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| c | Viêm phổi liên quan tới thở máy | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| d | Nhiễm trùng huyết có liên quan đến catheter | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| e | Nhiễm khuẩn tiết niệu liên quan đến sonde tiểu | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| f | Nhiễm trùng hệ thần kinh trung ương | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| g | Tiêu chảy nhiễm khuẩn | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| h | Nhiễm trùng da, mô mềm | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| i | Nhiễm trùng vết mổ, vết thương, vết loét | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| j | Viêm nội tâm mạc | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |
| k | Khác, ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []/[]/[] |

II – PHÂN LẬP VI SINH TRONG 1 TUẦN VỪA QUA

| | |
|---|---|
| 4 | Số căn nguyên: [] |
| 5 | <p>Căn nguyên thứ nhất</p> <p>a. Bệnh phẩm: <input type="radio"/> Đờm <input type="radio"/> Nước tiểu <input type="radio"/> Phân <input type="radio"/> Máu <input type="radio"/> Vết thương <input type="radio"/> Khác, ghi rõ:</p> <p>b. Mã bệnh phẩm: []</p> <p>c. Ngày lấy mẫu (nn/tt/nn): []/[]/[]</p> <p>d. Căn nguyên: <input type="radio"/> <i>A. baumannii</i> <input type="radio"/> <i>P. aeruginosa</i> <input type="radio"/> <i>K. pneumoniae</i> <input type="radio"/> <i>E. coli</i> <input type="radio"/> Khác:</p> |

| Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|--|--|
| CRF HÀNG TUẦN | WEEK |
| Mã số nghiên cứu [] [] - [] [] [] [] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] [] [] [] [] [] |

III – TRIỆU CHỨNG TRONG 1 TUẦN QUA (ngày 0 là thứ 3 với NHTD và thứ 5 với Bạch Mai; các ngày -1 đến -6 tính lùi về trước đó)

| | Triệu chứng | Ngày -6 | Ngày -5 | Ngày -4 | Ngày -3 | Ngày -2 | Ngày -1 | Ngày 0 |
|----|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 11 | Sốt > 38°C | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 12 | Hạ thân nhiệt < 36°C | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 13 | Shock nhiễm trùng | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 14 | Suy hô hấp | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 15 | Ngưng tuần hoàn | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 16 | Sung nề chân catheter | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 17 | Xuất huyết tiêu hóa | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 18 | Thiếu niệu, vô niệu | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 19 | Tiểu buốt/tiểu rắt/tiểu đục | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 20 | Ý thức xấu đi | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 21 | Tiêu chảy/đi ngoài phân lỏng | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 22 | Vết thương/vết loét/bong có dấu hiệu sung, nóng, đỏ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 23 | Vết thương/vết loét/bong có mũ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

| | |
|--|--|
| Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ | Ngày điền (m/th/n): [] []/[] []/[] [] |
|--|--|

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--|
| CRF KẾT THÚC NGHIÊN CỨU | DISCH |
| Mã số nghiên cứu []-[]-[] | Tên viết tắt của đối tượng NC []-[]-[] |

I – THÔNG TIN VỀ KẾT THÚC NGHIÊN CỨU

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|-----------------------|---|--|---|---|---|--|---|---|---|---|
| 1 | Tình trạng lúc kết thúc nghiên cứu <input type="radio"/> Ổn định, về nhà <input type="radio"/> Chuyển viện do bệnh đỡ <input type="radio"/> Chuyển viện do bệnh nặng hơn <input type="radio"/> Về nhà để tử vong <input type="radio"/> Tử vong tại bệnh viện | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Thời gian kết thúc (nn/tt/nn gg:pp) []/[]/[] []:[] | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Điểm MRS tại thời điểm xuất viện: [] | | | | | | | | | | | | |
| | <table border="1"> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>Không còn triệu chứng</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>Không có triệu chứng nặng, vẫn có thể thực hiện được các công việc và hoạt động thông thường</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Giảm khả năng lao động nhẹ, không thể thực hiện các hoạt động như trước đây nhưng có thể tự chăm sóc bản thân mà không cần có sự trợ giúp</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Giảm khả năng lao động vừa, cần có sự giúp đỡ nhưng có thể tự đi lại được mà không cần giúp đỡ</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Giảm khả năng lao động vừa và nặng, không thể đi lại mà không có sự hỗ trợ của người khác và không thể thực hiện được các nhu cầu của bản thân mà không có sự giúp đỡ</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Bệnh nhân nặng, nằm liệt giường, không tự phục vụ được và cần phải có chăm sóc và theo dõi của nhân viên y tế</td> </tr> </tbody> </table> | 0 | Không còn triệu chứng | 1 | Không có triệu chứng nặng, vẫn có thể thực hiện được các công việc và hoạt động thông thường | 2 | Giảm khả năng lao động nhẹ, không thể thực hiện các hoạt động như trước đây nhưng có thể tự chăm sóc bản thân mà không cần có sự trợ giúp | 3 | Giảm khả năng lao động vừa, cần có sự giúp đỡ nhưng có thể tự đi lại được mà không cần giúp đỡ | 4 | Giảm khả năng lao động vừa và nặng, không thể đi lại mà không có sự hỗ trợ của người khác và không thể thực hiện được các nhu cầu của bản thân mà không có sự giúp đỡ | 5 | Bệnh nhân nặng, nằm liệt giường, không tự phục vụ được và cần phải có chăm sóc và theo dõi của nhân viên y tế |
| 0 | Không còn triệu chứng | | | | | | | | | | | | |
| 1 | Không có triệu chứng nặng, vẫn có thể thực hiện được các công việc và hoạt động thông thường | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Giảm khả năng lao động nhẹ, không thể thực hiện các hoạt động như trước đây nhưng có thể tự chăm sóc bản thân mà không cần có sự trợ giúp | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Giảm khả năng lao động vừa, cần có sự giúp đỡ nhưng có thể tự đi lại được mà không cần giúp đỡ | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Giảm khả năng lao động vừa và nặng, không thể đi lại mà không có sự hỗ trợ của người khác và không thể thực hiện được các nhu cầu của bản thân mà không có sự giúp đỡ | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Bệnh nhân nặng, nằm liệt giường, không tự phục vụ được và cần phải có chăm sóc và theo dõi của nhân viên y tế | | | | | | | | | | | | |

II – CHẨN ĐOÁN TẠI THỜI ĐIỂM KẾT THÚC NGHIÊN CỨU

| 4 | Chẩn đoán | |
|--|--|--|
| a | Sốc nhiễm trùng | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| b | Viêm phổi mắc phải tại bệnh viện | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| c | Viêm phổi liên quan tới thở máy | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| d | Nhiễm trùng huyết có liên quan đến catheter | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| e | Nhiễm khuẩn tiết niệu liên quan đến sonde tiểu | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| f | Nhiễm trùng hệ thần kinh trung ương | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| g | Tiêu chảy nhiễm khuẩn | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| h | Nhiễm trùng đường mật | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| i | Nhiễm trùng da, mô mềm | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| j | Nhiễm trùng vết mổ, vết thương, vết loét | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| k | Viêm nội tâm mạc | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| l | Uốn ván | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| m | Khác | <input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không |
| | 1. 2. 3. | |
| Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ | | Ngày điền (nn/tt/nn): []/[]/[] |

| | | |
|--|---|------------------|
| 24HN - Nghiên cứu Vị khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | | DISCH-INT |
| CRF KẾT THÚC NGHIÊN CỨU | | |
| <i>Mã số nghiên cứu</i> [] [] - [] [] [] | <i>Tên viết tắt của đối tượng NC</i> [] [] [] [] [] [] | |

III – TỔNG KẾT CAN THIỆP/THỬ THUẬT ĐÃ TIẾN HÀNH

| | Loại can thiệp | Có | Không | Ngày bắt đầu (m/th/n) | Ngày kết thúc (m/th/n) | Đang tiếp tục |
|----|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| 1 | Thở máy xâm nhập | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 2 | Đặt nội khí quản | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 3 | Mở khí quản | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 4 | Đặt catheter tĩnh mạch trung tâm | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 5 | Đặt catheter động mạch | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 6 | Đặt sonde tiêu | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 7 | Đặt sonde dạ dày | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 8 | Dẫn lưu não thất | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 9 | Chọc dịch/dẫn lưu dịch các màng | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 10 | Cắt lọc vết thương/vết loét | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 11 | ECMO/lọc máu/lọc huyết tương | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 12 | Khác, ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 13 | Khác, ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 14 | Khác, ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |
| 15 | Khác, ghi rõ: | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | [] []/[] []/[] [] | [] []/[] []/[] [] | <input type="checkbox"/> |

Người điền (Kí tên/ghi tên viết tắt): _____ Ngày điền (m/th/n): [] []/[] []/[] []

| | | |
|--|--|---|
| 24HN - Nghiên cứu Vị khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | | DISCH-ANTIBIO |
| CRF KẾT THÚC NGHIÊN CỨU | | |
| <i>Mã số nghiên cứu</i> []-[]-[]-[] | | <i>Tên viết tắt của đối tượng NC</i> []-[]-[]-[] |

IV – KHÁNG SINH DÃ SỬ DỤNG TẠI BỆNH VIỆN NÀY

| STT | Tên kháng sinh (nên ghi tên được chất, không ghi tên biệt dược) | Đơn vị liều | | | Tổng liều (24h) | Ngày bắt đầu (m/th/n) | Ngày kết thúc (m/th/n) |
|-----|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|
| | | mg | g | MIU | | | |
| 1 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 2 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 3 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 4 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 5 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 6 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 7 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 8 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 9 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 10 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 11 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 12 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 13 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 14 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 15 | | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | []-[]-[]-[] | []/[]/[] | []/[]/[] |

Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ Ngày điền (m/th/n): []/[]/[]

| 24HN - Nghiên cứu Vi khuẩn đa kháng thuốc gây NKBV (MDRO) | |
|---|--------------------------------------|
| CRF KẾT THÚC NGHIÊN CỨU | DISCH-OTH |
| Mã số nghiên cứu [] - [] | Tên viết tắt của đối tượng NC [] |

V – CÁC THUỐC KHÁC

| STT | Thuốc | Ngày bắt đầu (nn/tt/nn) | Ngày kết thúc (nn/tt/nn) |
|-----|---|----------------------------|-----------------------------|
| 1 | Thuốc an thần, chống co giật (vd. benzodiazepine) | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 2 | Thuốc phong bế thần kinh – cơ | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 3 | Thuốc ức chế bơm proton | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 4 | Corticosteroid | []/[]/[] | []/[]/[] |
| 5 | Thuốc vận mạch | []/[]/[] | []/[]/[] |

VI – CHI PHÍ ĐIỀU TRỊ

| | | |
|---|-------------------------------------|-----|
| 6 | Tổng chi phí (VNĐ): | [] |
| 7 | Chi phí do bảo hiểm y tế trả (VNĐ): | [] |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Người điền (kí tên/ghi tên viết tắt): _____ | Ngày điền (nn/tt/nn): []/[]/[] |
|--|--------------------------------------|

PHỤ LỤC 3

CÁC QUI TRÌNH KỸ THUẬT TRONG NGHIÊN CỨU

I. Quy trình định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật MALDI-TOF

Chuẩn bị hoá chất:

1. Lấy 1 tube Eppendorf và cho vào đó 475 μ L nước siêu tinh khiết, 500 μ L Acetonitrile (ACN) 100% và 25 μ L Trifluoroacetic acid 100% (TFA).
2. Trộn đều bằng vortex. Như vậy ta có được 1 mL hỗn hợp, gọi là “stock solution”. Stock solution có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng.

HCCA Matrix

1. Lấy 1 tube HCCA Matrix, cho vào đó 250 μ L stock solution.
2. Vortex ở nhiệt độ phòng cho đến khi thu được dung dịch trong suốt (tất cả tinh thể HCCA đều được hòa tan, nồng độ cuối là 10 mg HCCA/mL).
3. Dung dịch HCCA Matrix đã sẵn sàng để sử dụng: dung dịch HCCA Matrix đã chuẩn bị được bảo quản ở nhiệt độ phòng và tránh ánh sáng trực tiếp. Sử dụng trong vòng 2 tuần kể từ ngày chuẩn bị.

Bruker Test Standard (BTS)

1. Lấy 1 tube BTS, cho vào đó 50 μ L stock solution. Thực hiện pipetting ít nhất 20 lần ở nhiệt độ phòng, tránh tạo bọt.
2. Để ở nhiệt độ phòng 5 phút, sau đó lại pipetting ít nhất 20 lần, tránh tạo bọt.
3. Nếu dung dịch vẫn còn đục, thực hiện quay ly tâm 2 phút với tốc độ 13000 rpm ở nhiệt độ phòng.
4. Dung dịch BTS đã sẵn sàng để sử dụng. Nên chia nhỏ ra làm nhiều tube (chẳng hạn chia làm 10 tube, mỗi tube 5 μ L) và bảo quản ở nhiệt độ dưới -18°C. Nếu thao tác chuẩn bị tốt, dung dịch BTS có thể bền trong 5 tháng ở điều kiện bảo quản đã nêu ở trên.

Quy trình thực hiện:

Mẫu là khuẩn lạc tươi (fresh overnight culture), đối với những loài vi

sinh vật chậm phát triển có thể sử dụng mẫu cấy sau vài ngày. Không nên bảo quản các đĩa chứa khuẩn lạc dưới 4°C vì dẫn đến suy giảm chất lượng phổ rất nhanh chóng. Tuy nhiên, có thể bảo quản các đĩa khuẩn lạc ở nhiệt độ phòng trong vài ngày.

Quy trình chuẩn bị mẫu cho MALDI target như sau:

- Phết mỗi mẫu khuẩn lạc thuận lên một vị trí (spot) của đĩa MALDI target. Lưu ý chỉ phết một lượng nhỏ khuẩn lạc (vừa đủ nhìn thấy), có thể sử dụng tăm tiết trùng (toothpicks) để phết. Để mẫu khô ở nhiệt độ phòng.
- Cho 1 μ L dung dịch HCCA Matrix lên mỗi vị trí mẫu và để khô ở nhiệt độ phòng, sau đó có thể đưa đĩa MALDI Target vào máy MALDI Biotyper để thực hiện định danh.

Phương pháp xử lý mẫu từ chai cấy máu dương tính sử dụng bộ kit MALDI Sepsityper: MALDI Sepsityper là bộ kit chuyên dùng để xử lý mẫu từ chai cấy máu dương tính trước khi mẫu được phân tích bằng hệ thống MALDI Biotyper.

Quy trình chuẩn bị mẫu:

1. Lấy 1 mL dịch từ chai cấy máu dương tính cho vào ống microcentrifuge
2. Cho 200 μ L Lysis Buffer vào ống, vortex trong 10 giây
3. Quay ly tâm 2 phút ở tốc độ 13000 rpm
4. Dùng pipet hút bỏ hết phần dịch nổi (supernatant)
5. Cho 1 mL Washing Buffer vào tube, trộn đều bằng pipet
6. Quay ly tâm 1 phút ở tốc độ 13000 rpm
7. Dùng pipet hút bỏ hết phần dịch nổi (supernatant)
8. Cho 300 μ L nước và 900 μ L Ethanol tuyệt đối vào, trộn đều
9. Quay ly tâm 2 phút ở tốc độ 13000 rpm rồi hút bỏ phần dịch nổi
10. Tiếp tục quay ly tâm phần lắng còn lại (pellet) trong 2 phút ở tốc độ 13000 rpm, rồi dùng pipet hút bỏ hết lượng Ethanol còn sót lại.
11. Để ở nhiệt độ phòng trong vài phút cho khô hết phần lắng

12. Cho từ 2-50 μ L Axit Formic 70% vào tube, trộn đều bằng pipet
13. Cho một lượng tương đương Acetonitrile 100% vào tube, trộn kỹ
14. Quay ly tâm ống tube 2 phút ở tốc độ 13000 rpm. Phần dịch nổi (supernatant) chính là mẫu sinh học được trích ly. Dùng pipet cho 1 μ L dịch mẫu trích ly lên một vị trí (spot) của MALDI target, để khô ở nhiệt độ phòng.
15. Ngay sau khi mẫu khô, cho 1 μ L dung dịch matrix HCCA lên mỗi vị trí mẫu, để khô ở nhiệt độ phòng.
16. Tiến hành định danh với MALDI Biotyper.

Nhận định kết quả:

- Kết quả mức xanh lục ứng với Score ≥ 2 : Độ tin cậy cao, có thể chính xác đến cấp độ loài (species)
- Kết quả mức vàng ứng với $1.7 \leq \text{Score} < 2$: Độ tin cậy trung bình, có kết quả chính xác cấp độ chi (genus).
- Kết quả mức đỏ ứng với Score < 1.7 : Không có kết quả định danh hoặc kết quả không tin cậy.

II. Phương pháp định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ tự động bằng máy VITEK 2 COMPACT

Nguyên lý định danh: dùng phương pháp đo màu để nhận biết các tính chất sinh vật hoá học của vi sinh vật thông qua sự thay đổi màu của các giếng môi trường có sẵn trong card.

Nguyên lý kháng sinh đồ: sử dụng phương pháp xác định MIC- nồng độ ức chế tối thiểu.

Phương pháp tiến hành: tiến hành đối với các chủng vi khuẩn mọc riêng rẽ (chủng thuần) trên đĩa thạch

- Chuẩn bị worksheet cho cassette (điền thông tin của BN như tên, lab ID...).
- Vào “enter cassette manager” chọn “setup test post entry” – chọn Print – chọn “Bank cassette worksheet” – nhấn OK để in.

- Chuẩn bị card: lấy card ra khỏi tủ lạnh và để ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút
- Chuẩn bị ống làm định danh: lấy 3ml nước muối 0,45% từ Dispenser và pha mẫu. Dùng quy cây lấy chủng cần định danh từ khuôn lạc thuần nhất, pha vào ống định danh trên. Kiểm tra độ đục bằng máy đo độ đục, độ đục phải đạt yêu cầu từ 0,55 đến 0,65 McFarland đối với vi khuẩn. Ống này được cắm theo thứ tự vào cassette.
- Chuẩn bị ống làm kháng sinh đồ: lấy 3ml nước muối 0,45% vào ống nghiệm mới và đặt vào cassette. Dùng pipet hút 280ul (đối với vi khuẩn Gram dương) hoặc 145ul (đối với vi khuẩn Gram âm) từ ống nghiệm làm định danh sang ống nghiệm làm kháng sinh đồ.
- Nếu máy đã sẵn sàng (màn hình hiện Start fill and OK) mở cửa buồng hút, cho cassette vào và ấn Start fill.
- Khi đèn báo nhấp nháy (sau khoảng 2 phút), màn hình báo “Transfer” thì mở cửa buồng hút lấy cassette ra và mở cửa buồng vận hành rồi cho cassette vào. Đóng hai cửa và đợi.
- Nhập thông tin cassette, nhập thông tin BN.
- Sử dụng chủng chuẩn *E. coli* ATCC 25922 và *S. aureus* ATCC 25923 để kiểm tra.
- Nếu cần so sánh thì so sánh với phương pháp khoan giấy khuếch tán và MIC bằng Etest để tham chiếu.

Phiên giải kết quả:

- Nếu chỉ làm kháng sinh đồ, hoặc kết quả định danh là một loài vi khuẩn thì máy sẽ in kết quả MIC và mức độ nhạy cảm kháng sinh với vi khuẩn đó
- Nếu định danh và kháng sinh đồ cùng lúc mà kết quả định danh cho nhiều loại vi khuẩn thì sẽ không có kết quả kháng sinh đồ, khi đó phải chọn

phương pháp định danh vi khuẩn nào thì sẽ cho kết quả kháng sinh đồ của vi khuẩn đó.

III. Qui trình kỹ thuật tách chiết DNA

Bao gồm các bước sau:

- Lấy 1 ống khuẩn lạc vi khuẩn đã cấy thuần qua đêm, hòa vào 300 μ l nước muối sinh lý, lắc đều trên máy lắc, chuyển 50 μ l huyền dịch này sang một eppendorf sạch, loại 1,5 ml
- Quy trình tách chiết DNA từ vi khuẩn bằng bộ kit Qiagen:

Hút 200 μ l lysis buffer AL vào ống eppendorf 1,5 ml đã có sẵn 20 μ l carrier RNA và 20 μ l proteinase K.

Cho 200 μ l bệnh phẩm vào ống eppendorf có chứa hỗn hợp Buffer AL - carrier RNA - proteinase K. Trộn đều bằng cách vortex trong 15 giây.

Chú ý: Để đảm bảo cho quá trình ly giải đạt hiệu quả tối đa, quá trình vortex phải được làm cẩn thận.

Ủ ở nhiệt độ 56⁰C trong 10 phút.

Ly tâm nhẹ để đẩy những dung dịch bám ở nắp ống xuống phía dưới.

Bổ sung thêm 200 μ l ethanol (96 – 100%), trộn đều bằng vortex trong 15 giây. Sau khi trộn, ly tâm nhẹ để đẩy lượng dung dịch nhỏ bám ở nắp ống xuống dưới.

Cẩn thận chuyển toàn bộ dung dịch ở bước 5 lên cột lọc (đã có ống hứng loại 2 ml ở dưới). Đóng nắp và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ ống hứng có chứa dịch, chuyển cột lọc sang một ống hứng mới.

Mở nắp cột lọc cẩn thận, rửa bằng 500 μ l Wash buffer AW1. Đóng nắp và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ ống hứng có chứa dịch, chuyển cột lọc sang một ống hứng mới.

Mở nắp cột lọc cẩn thận, rửa lại bằng 500 μ l Wash buffer AW2. Đóng nắp và ly tâm ở 14000 vòng/phút trong 3 phút. Loại bỏ ống hứng có chứa dịch, chuyển cột lọc sang một ống hứng mới.

Đặt cột lọc vào một ống hứng mới, ly tâm ở 14000 vòng/phút trong 1 phút.

Đặt cột lọc vào một ống eppendorf 1,5 ml mới và loại bỏ ống hứng có chứa dịch. Mở nắp cột lọc cẩn thận và cho 50 μ l Elution buffer AE. Đóng nắp và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm ở 8000 vòng/ phút trong 1 phút.

Chú ý: Chứng âm là nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.

IV. Quy trình kỹ thuật giải trình tự bộ gen của vi khuẩn

DNA thu được sẽ được tiến hành theo các bước như sau:

Bước 1: Đo và chuẩn hóa nồng độ DNA

Mục đích: đo nồng độ DNA thu được và pha loãng về nồng độ yêu cầu cho bước chuẩn bị mẫu cho quá trình giải trình tự.

Quy trình:

- Pha hóa chất Qubit Working Solution theo tỷ lệ 1 ul QuBit reagent: 199 ul QuBit Buffer.
- Pha hỗn hợp dung dịch đo nồng độ DNA trong các ống đo chuyên dụng:
 - + Standard : 10 ul standard trong 190 ul Qubit working solution
 - + Mẫu cần đo nồng độ DNA: 2ul mẫu trong 198ul Qubit working solution.
- Đưa standard và mẫu vào máy Qubit và đo nồng độ DNA.
- Hòa trộn các sản phẩm PCR theo nồng độ đồng đều.
- Pha loãng hỗn hợp trên đến nồng độ 0,2 ng/ul.

Bước 2: Chuẩn bị thư viện giải trình tự

Bước 2.1. Cắt DNA thành những đoạn ngắn

Mục đích: Cắt DNA thành những đoạn có kích thước 300-500bp.

Chuẩn bị:

- Bộ kit Nextera XT sample preparation (24 mẫu)
- Bộ kit Nextera XT index (24 index, 96 mẫu)
- Sử dụng protocol chuẩn bị mẫu
- Ống PCR 0.2ml

Quy trình:

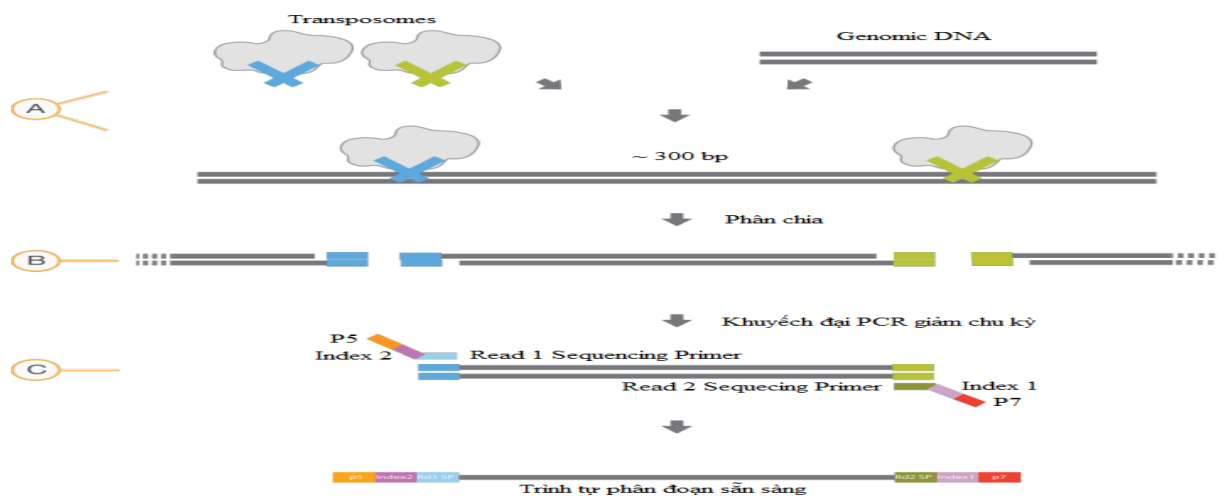
- Rã đông các ống ATM (*Amplicon Tagment Mix*), TD (*Tagment DNA Buffer*), và các mẫu DNA giữ trong khay đá.
- Làm ấm ống NT (*Neutralize Tagment Buffer*) đến nhiệt độ phòng.
- Sau khi rã đông, nhẹ nhàng đảo ngược ống hóa chất 3-5 lần để trộn đều.
- Chuẩn bị NTA (*Nextera XT Tagment Amplicon*) .Mục đích: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

Bước 2.2. PCR gắn Index

Hóa chất:

- NPM: 15 μ l mỗi mẫu.
- Nextera XT Index 1 Primers (N7XX): 5 μ l mỗi mẫu
- Nextera XT Index 2 Primers (S5XX) :5 μ l mỗi mẫu
- 0.2 ml PCR tube

Quy trình:



Hình 2. 1. Qui trình hoạt động của PCR gắn Index [68]

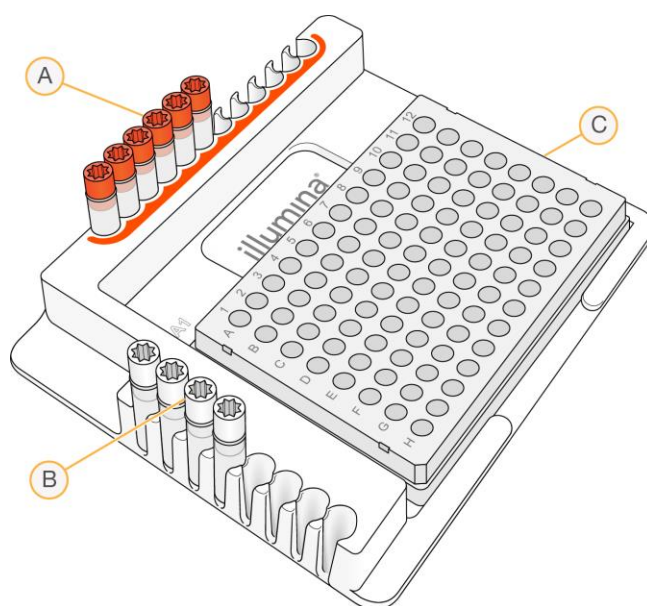
A: Nextera XT transposome với adapter kết hợp với DNA mẫu

B: Phân chia để cắt mảnh và gắn adapter

C: PCR chu kỳ giới hạn để gắn trình tự adapter đầu ấn

Chuẩn bị:

- Rã đông hóa chất NPM (Nextera PCR Master Mix) và các index ở nhiệt độ phòng trong khoảng 20 phút, nhẹ nhàng đảo thuận nghịch các ống 3-5 lần.
- Do index được gắn vào 2 đầu các sợi đơn DNA, Theo bộ kit 96 index, sắp xếp các ống index trên đĩa TruSeq Index Plate Fixture như sau:
 - + Sắp xếp các index 1 (mỗi I7 có nắp màu cam) để theo chiều ngang
 - + Sắp xếp các index 2 (mỗi I5 có nắp trắng) theo thứ tự theo chiều dọc



A: index 1 (I7); B: index 2 (I5), C: Đĩa TruSeq Index Plate Fixture.

- + Thêm 15 μl NPM vào từng ống mẫu, thay đầu côn sau mỗi thao tác.
- + Thêm 5 μl index 2 (nắp trắng) vào từng ống theo cột, thay đầu côn mỗi lần.
- + Thêm 5 μl index 1 (nắp màu cam) vào từng ống theo hàng, hút nhả pipet 5 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Để tránh ô nhiễm chéo, loại bỏ tất cả các nắp đã dùng và thay bằng nắp mới được cung cấp theo bộ kit.
- Đậy nắp các ống và ly tâm ở 1000 xg ở 20°C trong 1 phút, để đảm bảo các hóa chất tập trung dưới đáy ống.
- Thành phần phản ứng như sau:

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

- Tiến hành phản ứng PCR để gắn index theo chu trình nhiệt sau: 72°C: 3 phút, 95°C: 30 giây, 12 vòng (95°C: 10 giây, 55°C: 30 giây, 72°C: 30 giây), 72°C: 5 phút, 10°C: ∞

Bước 2.3. Tinh sạch sản phẩm PCR

Chuẩn bị:

- AMPure XP beads 90 µl/ mẫu (đối với các mẫu có kích thước 300-500bp) đưa về nhiệt độ thường trước khi sử dụng.
- Pha 80% Ethanol (EtOH) (400 µl mỗi mẫu) từ EtOH tuyệt đối.
- 0,2 ml PCR tube

Quy trình:

- Tùy thuộc vào kích thước amplicon mà thể tích AMPure Bead sẽ khác nhau
- Ly tâm PCR amplicon Plate ở 1000 xg trong 1 phút (20°C).
- Điều chỉnh pipet ở mức 50 µl, chuyển sản phẩm PCR sang ống mới. Thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Vortex AMPure XP trong 30 giây, sử dụng pipet, thêm 90 µl AMPure XP vào từng mẫu, hút nhả pipet 10 lần đảm bảo các hạt bead được trộn đều.

| Kích thước amplicon | AMPure XP sử dụng | Thể tích AMPure XP |
|----------------------------|---|--|
| < 300 bp | 1.8x AMPure XP | 90 µl |
| 300 – 500 bp | 1.8x AMPure XP | 90 µl |
| > 500 bp | 0.6x AMPure XP (0.5x AmpureXP for 2x250runs on the MiSeq) | 30 µl (25 µl for 2x250 runs on theMiSeq) |

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để DNA bám vào các hạt bead.
- Đặt ống trên giá từ trong 2 phút, để đảm bảo lực từ giữ chặt hạt bead cùng với DNA bám trên đó.
- Sử dụng pipet hút toàn bộ dịch nổi trong ống, thay đầu côn sau mỗi lần.
- Giữ nguyên plate trên giá từ, tiến hành các bước rửa với ethanol 80%:

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

Bước 2.4. Chuẩn hóa mẫu, định lượng thư viện

Chuẩn bị hóa chất: LNA1 (Library Normalization Additives 1), LNB1 (Library Normalization Beads 1), LNW1 (Library Normalization Wash 1), LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1), 0,1 N NaOH, nghiêng 96 lỗ: 2 nghiêng, Ống tube 15 ml: 1 ống

Đo nồng độ DNA bằng Qubit (hoặc hóa chất tương đương)

- Sử dụng: máy Qubit, các ống đo chuyên dụng và bộ kit: dsDNA HS Assay
- Pha hóa chất Qubit Working Solution theo tỷ lệ 1 μ l QuBit reagent: 199 μ l QuBit Buffer.

- Pha hỗn hợp dung dịch đo nồng độ DNA trong các ống đo chuyên dụng theo các bước như sau:
- Standard : 10 ul standard trong 190 ul Qubit working solution
- Mẫu cần đo nồng độ DNA: 2 ul mẫu trong 198 ul Qubit working solution.
- Đưa standard và mẫu vào máy Qubit và đo nồng độ DNA.
- Tính toán nồng độ của DNA sang nM dựa trên kích thước DNA theo công thức như sau:

$$\frac{(\text{nồng độ ng/}\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{kích thước thư viện trung bình})} \times 10^6 = \text{nồng độ nM}$$

Quy trình chuẩn hóa mẫu:

- Rã đông ống LNA1 (*Library Normalization Additives 1*) đến nhiệt độ phòng, bằng cách ngâm trong bể nước có nhiệt độ 20° đến 25°C.
- Làm ấm ống LNB1 (*Library Normalization Beads 1*) và LNW1 (*Library Normalization Wash 1*) ở nhiệt độ phòng, bằng cách ngâm trong bể nước có nhiệt độ 20° đến 25°C.
- Voltex LNB1 trong ít nhất 1 phút và đảo ngược liên tục khoảng 15-20 lần
- Làm ấm ống LNS1 (*Library Normalization Storage Buffer 1*) về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Đánh dấu một plate 96 sạch.
- Cẩn thận chuyển 20 ul dịch nổi từ sản phẩm PCR tinh sạch, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Hút 1,1 ml LNA1 (hóa chất xúc tác DNA bám vào hạt bead) vào 1 ống Ependorf 1.5 ml.
- Dùng pipet P1000, hút nhả pipet trong ống LNB1 20 lần để trộn đều bead.
- Hút 200 ul LNB1 vào ống Ependorf chứa sẵn LNA1, trộn đều bằng cách đảo ngược ống 20 lần.
- Hút 45 ul hỗn hợp LNA1/LNB1 vào mỗi ống LNP đã chứa sẵn mẫu.

- Đóng chặt nắp các ống LNP và lắc các ống LNP trên tại vận tốc 1.800 rpm trong 30 phút để đảm bảo các sợi DNA bám vào hạt bead với mật độ đều.
- Để các ống trên giá từ trong 2 phút để lực từ hút các hạt bead có gắn DNA xuống đáy ống.
- Giữ nguyên các ống LNP trên giá từ, vặn pipet đến 80ul, loại bỏ dịch nổi.
- Nhấc các ống LNP ra khỏi giá từ và tiến hành bước rửa với LNW1 như sau:
 - + Thêm 45 ul LNW1 mỗi ống.
 - + Đóng chặt nắp các ống.
 - + Lắc với vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút.
 - + Đặt các ống trên giá từ trong 2 phút.
 - + Cẩn thận loại bỏ dịch nổi, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
 - + Nhấc các ống LNP ra khỏi giá từ và tiến hành bước rửa lần 2 với LNW1:
 - + Thêm 45 ul LNW1 mỗi ống.
 - + Đóng chặt nắp các ống.
 - + Lắc với vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút.
 - + Đặt các ống trên giá từ trong 2 phút.
 - + Cẩn thận loại bỏ dịch nổi, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
 - + Nhấc các ống LNP khỏi giá từ, thêm 30ul NaOH 0,1N vào các ống.
 - + Đóng chặt nắp và lắc ống LNP tại vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút để đảm bảo DNA bị thổi hết khỏi hạt bead.
 - + Trong khi lắc, chuẩn bị ống SGP (StoraGe Plate) (là ống PCR)
 - + Cho 30 ul hóa chất bảo quản DNA LNS1 vào mỗi ống SGP.
 - + Sau 5 phút lắc, kiểm tra, đảm bảo tất cả các mẫu trong tám LNP đã trộn đều hoàn toàn. Nếu thấy các mẫu không trộn đều hoàn toàn, nhẹ nhàng hút nhả pipet 3 đến 5 lần, lắc thêm trong 5 phút nữa.

- + Đặt các ống LNP trên giá từ trong 2 phút để hút toàn bộ hạt bead xuống đáy.
- + Thiết lập pipet đến 30 ul, chuyển dịch nổi chứa DNA từ ống LNP sang ống SGP, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- + Đậy chặt nắp ống, ly tâm ở 1.000 xg trong 1 phút.

Bước 2.5. Đưa mẫu vào máy Miseq

Chuẩn bị:

- Điều chỉnh Block nhiệt cho ống 1.5ml ở 96 °C
- Rã đông hóa chất Miseq Reagent để ở nhiệt độ phòng
- Water ice
- HT1
- Resuspension Buffer

Quy trình:

- Nếu ống SGP đã được bảo quản đông lạnh, làm ấm các ống SGP đến nhiệt độ phòng, hút nhả 3-5 lần trong các ống SGP để trộn đều DNA.
- Ly tâm ống SGP tại 1000xg trong vòng 1 phút ở 20°C đảm bảo DNA tập trung ở phần dung dịch đáy ống
- Ký hiệu ống PAL (Pool Amplicon Library)
- Chuyển 12 ul của mỗi mẫu trong ống SGP sang ống PAL
- Ký hiệu ống DAL mới (Diluted Amplicon Library)
- Thêm 588 ul hóa chất hỗ trợ các sợi DNA bám vào flowcell HT1 vào ống DAL
- Chuyển 24 ul hỗn hợp DNA từ Pal sang DAL có chứa HT1. Sử dụng cùng đầu côn mix đều 3-5 lần
- Vortex ống DAL với tốc độ cao nhất
- Đưa ống DAL vào block nhiệt ở 96 °C, ủ trong 2 phút để đảm bảo các sợi đơn DNA biến tính hoàn toàn thành mạch đơn DNA.

- Sau khi ủ, đảo nghịch ống DAL 1-2 lần để pha trộn và đặt vào box nước đã ngay lập tức trong vòng 5 phút.
- Đưa toàn bộ hỗn hợp trong hộp DAL vào khay Miseq Reagent Cartridge theo vị trí load Samples trên khay.
- Thao tác chạy máy theo hướng dẫn của hãng Illumina.

Dữ liệu trình tự bộ gen của các vi khuẩn đa kháng thuốc sẽ được phân tích bằng phần mềm CLC workbench của QIAGEN kết hợp với phần mềm được cung cấp, cài đặt và tích hợp bởi Viện Nghiên cứu Sanger.

Bước 2.6. Các bước cơ bản để xác định trình tự bộ gen của vi khuẩn:

- Sau khi hệ thống Miseq hoàn thành chương trình chạy giải trình tự, các chỉ số của lần chạy cần được lưu ý để có thể đánh giá sự thành công của lần chạy đó. Với bộ hóa chất giải trình tự Miseq reagent kit V3 600cycles, dữ liệu giải trình tự tối đa có thể nhận được vào khoảng 14.5 đến 15 Gb. Mật độ cluster hình thành trên flowcell được khuyến cáo nên nằm trong khoảng từ 800 đến 1200K/mm². Trên 90% phần trăm các đoạn đọc có chất lượng giải trình tự lớn hơn Q30 (Phred quality scores of ≥ 30), nghĩa là 99.9% trình tự của từng nucleotide được đọc một cách chính xác nhất.
- Coverage ≥ 100 lần sẽ được sử dụng để phân tích.
- Quá trình phân tích dữ liệu được thực hiện sử dụng phần mềm Miseq reporter cài đặt sẵn trong hệ thống Miseq và phần mềm CLC genomics Workbench (Qiagen). Đối với chế độ “Resequencing”- giải trình tự lại, các đoạn đọc (sequencing reads) sẽ được phần mềm Miseq reporter tự động căn trình tự so sánh với trình tự tham khảo (reference sequence) đã được nhập trước đó. Các đoạn đọc đã được căn trình tự của mỗi một mẫu sẽ được chứa trong mỗi file đuôi bam (.bam file). Các file đuôi bam này sẽ được tải vào phần mềm CLC Genomics Workbench để phân tích và tạo ra trình tự hoàn chỉnh (consensus sequence). Bên cạnh đó thông tin về các điểm sai

khác (variants) được ghi nhận trong quá trình căn trình tự các đoạn đọc với trình tự tham khác sẽ được chứa trong các file định dạng vcf. Các bước phân tích số liệu sử dụng CLC Genomics Workbench (QIAGEN) như sau:

Bước 1: Làm sạch dữ liệu: loại bỏ phần dữ liệu bị nhiễu, tín hiệu xấu; loại các đoạn gap (đoạn trống)

Bước 2: Xuất ra 2 files (dạng Mers và Not Mers)

Bước 3: Lắp ráp trình tự gen sử dụng phần mềm denovo assembly sequencing hoặc remapping hoặc reference- based mapping tool để lắp ráp trình tự gen.

Denovo sequencing: xác định biến dị (variant calling) để tạo thành file VCF sử dụng GATK hoặc Samtools.

Reference- based mapping tool:

- Ghép các đoạn short read thành contig và so sánh với các reference genome đã được công bố
- Ngưỡng lựa chọn (cut off value) là đoạn đọc phải lắp lại ít nhất hoặc bằng 100 lần hay còn gọi là coverage ≥ 100 lần
- Xuất ra các consensus là trình tự bộ gen hoàn chỉnh của các chủng vi khuẩn đã giải trình tự

Bước 4: Lập file BAM, xây dựng contig, scaffold sử dụng các công cụ như bwa, trinity, bcftools.

Bước 5: Thống kê và đánh giá chất lượng lắp ráp: số lượng và độ dài contig, tổng độ dài contig, độ dài contig lớn nhất, tỉ lệ GC, N50.... bằng phần mềm Quast hoặc phần mềm khác.

Bước 6: Xây dựng trình tự bộ gen hoàn chỉnh của các chủng vi khuẩn đã được giải trình tự.

PHỤ LỤC 4
DANH SÁCH BỆNH NHÂN THAM GIA NGHIÊN CỨU

| STT | MÃ NGHIÊN CỨU | HỌ TÊN | TUỔI | GIỚI | MÃ BỆNH NHÂN | NGÀY VÀO VIỆN |
|-----|---------------|----------------|------|------|--------------|---------------|
| 1 | ND001 | Hoàng Thị M. | 24 | Nữ | 170610754GP | 27/6/2017 |
| 2 | ND002 | Nguyễn Văn V. | 59 | Nam | 170502816GP | 09/5/2017 |
| 3 | ND003 | Phạm Minh Đ. | 30 | Nam | 170600776GP | 02/6/2017 |
| 4 | ND004 | Đình Văn B. | 50 | Nam | 170601529GP | 05/6/2017 |
| 5 | ND005 | Vũ Đắc H. | 67 | Nam | 170606823GP | 18/6/2017 |
| 6 | ND006 | Tạ Thành L. | 21 | Nam | 170510153GP | 29/5/2017 |
| 7 | ND007 | Lê Thị T. | 33 | Nữ | 170605965GP | 15/6/2017 |
| 8 | ND008 | Nguyễn Văn Q. | 36 | Nam | 170600987GP | 07/6/2017 |
| 9 | ND010 | Nguyễn Xuân Đ. | 71 | Nam | 170408990GP | 26/4/2017 |
| 10 | ND011 | Bùi Hạnh C. | 75 | Nữ | 170604650GP | 23/6/2017 |
| 11 | ND012 | Cao Thị Đ. | 55 | Nữ | 170609902GP | 23/6/2017 |
| 12 | ND013 | Vũ Văn L. | 61 | Nam | 170611054GP | 27/6/2017 |
| 13 | ND014 | Lê Xuân T. | 72 | Nam | 170604750GP | 13/6/2017 |
| 14 | ND015 | Ngô Văn M. | 49 | Nam | 170601455GP | 05/6/2017 |
| 15 | ND016 | Trần Văn T. | 87 | Nam | 170611094GP | 27/6/2017 |
| 16 | ND017 | Bùi Thị L. | 61 | Nữ | 170611671GP | 28/6/2017 |
| 17 | ND018 | Dương Chí L. | 40 | Nam | 170611636GP | 28/6/2017 |
| 18 | ND019 | Lương Văn T. | 86 | Nam | 170610707GP | 29/6/2017 |
| 19 | ND020 | Nguyễn Văn Kh. | 65 | Nam | 170612223GP | 30/6/2017 |
| 20 | ND021 | Trần Ngọc H. | 54 | Nam | 170611686GP | 30/6/2017 |



| | | | | | | |
|----|-------|-------------------|----|-----|-------------|-----------|
| 21 | ND022 | Bùi Văn Ph. | 62 | Nam | 170612171GP | 01/7/2017 |
| 22 | ND024 | Hoàng Xuân M. | 47 | Nam | 170700234GP | 02/7/2017 |
| 23 | ND025 | Phạm Văn M. | 47 | Nam | 170700916GP | 03/7/2017 |
| 24 | ND026 | Trịnh Ngọc H. | 58 | Nam | 170700134GP | 01/7/2017 |
| 25 | ND027 | Đông Thị Lan C. | 33 | Nữ | 170701625GP | 04/7/2017 |
| 26 | ND029 | Đỗ Thị M. | 55 | Nữ | 170611549GP | 07/7/2017 |
| 27 | ND030 | Nguyễn Tiến Th. | 34 | Nam | 170702182GP | 05/7/2017 |
| 28 | ND031 | Dương Thị T. | 78 | Nữ | 170703934GP | 08/7/2017 |
| 29 | ND032 | Trương Thị Vân Đ. | 67 | Nữ | 170704092GP | 09/7/2017 |
| 30 | ND033 | Trương Văn Ch. | 51 | Nam | 170705746GP | 12/7/2017 |
| 31 | ND035 | Nguyễn Văn Qu. | 54 | Nam | 170706363GP | 12/7/2017 |
| 32 | ND036 | Nguyễn Thị H. | 69 | Nữ | 170706283GP | 12/7/2017 |
| 33 | ND037 | Nguyễn Thị Tr. | 53 | Nữ | 170707200GP | 13/7/2017 |
| 34 | ND038 | Nguyễn Thị Ng. | 64 | Nữ | 170707744GP | 14/7/2017 |
| 35 | ND039 | Lê Tiên D. | 58 | Nam | 170706384GP | 14/7/2017 |
| 36 | ND040 | Phạm Thị Qu. | 76 | Nữ | 170707800GP | 14/7/2017 |
| 37 | ND041 | Đào Văn L. | 79 | Nam | 170707805GP | 14/7/2017 |
| 38 | ND042 | Trần Đình T. | 63 | Nam | 170708359GP | 15/7/2017 |
| 39 | ND044 | Nguyễn Đăng Kh. | 50 | Nam | 170709351GP | 17/7/2017 |
| 40 | ND045 | Vũ Thị Đ. | 59 | Nữ | 170710052GP | 18/7/2017 |
| 41 | ND046 | Phùng Văn B. | 70 | Nam | 170710022GP | 18/7/2017 |
| 42 | ND047 | Nguyễn Thị A. | 67 | Nữ | 170711822GP | 20/7/2017 |
| 43 | ND050 | Phạm Ngọc A. | 43 | Nữ | 170710106GP | 18/7/2017 |
| 44 | ND051 | Phạm Thị S. | 74 | Nữ | 170709123GP | 17/7/2017 |

| | | | | | | |
|----|-------|----------------|----|-----|-------------|-----------|
| 45 | ND052 | Đình Hoàng V. | 45 | Nam | 170715726GP | 25/7/2017 |
| 46 | ND053 | Nguyễn Thị Nh. | 36 | Nữ | 170713023GP | 22/7/2017 |
| 47 | ND054 | Vi Văn N. | 49 | Nam | 170715195GP | 29/7/2017 |
| 48 | ND055 | Phạm Thành Đ. | 83 | Nam | 170716901GP | 26/7/2017 |
| 49 | ND056 | Trần Thị X. | 90 | Nữ | 170716900GP | 26/7/2017 |
| 50 | ND057 | Đỗ Mạnh H. | 57 | Nam | 170802196GP | 23/8/2017 |
| 51 | ND058 | Phí Ngọc M. | 27 | Nữ | 170804150GP | 04/8/2017 |
| 52 | ND059 | Nguyễn Thị Qu. | 51 | Nữ | 170720852GP | 30/7/2017 |
| 53 | ND060 | Đình Thị Ch. | 65 | Nữ | 170806976GP | 07/8/2017 |
| 54 | ND061 | Ngô Thị H. | 40 | Nữ | 170802889GP | 03/8/2017 |
| 55 | ND062 | Đỗ Hữu Gi. | 59 | Nam | 170810191GP | 09/8/2017 |
| 56 | ND063 | Nguyễn Văn H. | 61 | Nam | 170809037GP | 11/8/2017 |
| 57 | ND064 | Hoàng Văn T. | 79 | Nam | 170814958GP | 13/8/2017 |
| 58 | ND065 | Nguyễn Ngọc Đ. | 21 | Nam | 170813862GP | 12/8/2017 |
| 59 | ND066 | Trần Trọng Đ. | 72 | Nam | 170813105GP | 12/8/2017 |
| 60 | ND067 | Phạm Thị Ng. | 63 | Nữ | 170817559GP | 15/8/2017 |
| 61 | ND068 | Cán Đình C. | 64 | Nam | 170816230GP | 16/8/2017 |
| 62 | ND069 | Trần Khắc L. | 49 | Nam | 170814967GP | 16/8/2017 |
| 63 | ND070 | Vũ Thị L. | 81 | Nữ | 170820302GP | 17/8/2017 |
| 64 | ND071 | Nguyễn Đức T. | 63 | Nam | 170821052GP | 18/8/2017 |
| 65 | ND072 | Phuong Bảo L. | 73 | Nữ | 170813800GP | 18/8/2017 |
| 66 | ND073 | Văn Đức M. | 18 | Nam | 170819069GP | 17/8/2017 |
| 67 | ND074 | Lương Văn X. | 71 | Nam | 170821666GP | 19/8/2017 |
| 68 | ND075 | Moong Phò B. | 48 | Nam | 170827638GP | 24/8/2017 |
| 69 | ND076 | Đỗ Văn T. | 33 | Nam | 170828941GP | 25/8/2017 |
| 70 | ND077 | Dương Quý T. | 54 | Nam | 170823151GP | 27/8/2017 |

| | | | | | | |
|----|-------|----------------------|----|-----|-------------|-----------|
| 71 | ND078 | Phạm Trọng Th. | 52 | Nam | 170821436GP | 18/8/2017 |
| 72 | ND079 | Đỗ Văn V. | 51 | Nam | 170825723GP | 22/8/2017 |
| 73 | ND080 | Nguyễn Quang L. | 87 | Nam | 170827506GP | 24/8/2017 |
| 74 | ND081 | Trần Đức N. | 27 | Nam | 170825713GP | 22/8/2017 |
| 75 | ND082 | Phí Thị Th. | 22 | Nữ | 170833505GP | 30/8/2017 |
| 76 | ND083 | Bùi Thị Lan H. | 22 | Nữ | 170833265GP | 30/8/2017 |
| 77 | ND084 | Tạ Văn L. | 68 | Nam | 170833160GP | 30/8/2017 |
| 78 | ND085 | Lê Đức L. | 53 | Nam | 170902309GP | 04/9/2017 |
| 79 | ND086 | Trịnh Quốc Ph. | 27 | Nam | 170902558GP | 07/9/2017 |
| 80 | ND087 | Lê Đức Th. | 35 | Nam | 170905804GP | 07/9/2017 |
| 81 | ND088 | Nguyễn Văn Qu. | 51 | Nam | 170905812GP | 07/9/2017 |
| 82 | ND089 | Bùi Văn Th. | 69 | Nam | 170906829GP | 10/9/2017 |
| 83 | ND090 | Phạm Thị Th. | 38 | Nữ | 170905633GP | 07/9/2017 |
| 84 | ND091 | Phạm Quốc Ph. | 67 | Nam | 170902709GP | 04/9/2017 |
| 85 | ND092 | Nguyễn Tiến B. | 27 | Nam | 170908873GP | 12/9/2017 |
| 86 | ND093 | Trần Phúc Đ. | 81 | Nam | 170904832GP | 12/9/2017 |
| 87 | ND094 | Lê Văn D. | 45 | Nam | 170909825GP | 12/9/2017 |
| 88 | ND096 | Lê Văn D. | 60 | Nam | 170911608GP | 14/9/2017 |
| 89 | ND098 | Hoàng Gia C. | 75 | Nam | 170910694GP | 13/9/2017 |
| 90 | ND099 | Hàn Thị Tuyết Nh. | 75 | Nữ | 170914337GP | 18/9/2017 |
| 91 | ND100 | Trần Hữu M. | 72 | Nam | 170917758GP | 23/9/2017 |
| 92 | ND101 | Nguyễn Địch Th. | 78 | Nam | 170918776GP | 25/9/2017 |
| 93 | ND102 | Bùi Văn C. | 61 | Nam | 170917591GP | 26/9/2017 |

| | | | | | | |
|-----|-------|--------------------|----|-----|-------------|------------|
| 94 | ND103 | Nguyễn Thị B. | 84 | Nữ | 170919278GP | 26/9/2017 |
| 95 | ND104 | Nguyễn Văn C. | 85 | Nam | 170919994GP | 27/9/2017 |
| 96 | ND105 | Nguyễn Văn Th. | 39 | Nam | 170911728GP | 14/9/2017 |
| 97 | ND106 | Phạm Thị T. | 60 | Nữ | 170916593GP | 28/9/2017 |
| 98 | ND107 | Nguyễn Văn M. | 48 | Nam | 170920658GP | 29/9/2017 |
| 99 | ND108 | Đỗ Thế L. | 57 | Nam | 170916373GP | 21/9/2017 |
| 100 | ND109 | Nguyễn Văn M. | 61 | Nam | 171000146GP | 01/10/2017 |
| 101 | ND110 | Nguyễn Văn Ph. | 47 | Nam | 171000938GP | 03/10/2017 |
| 102 | ND111 | Hoàng Thị T. | 57 | Nữ | 171002189GP | 06/10/2017 |
| 103 | ND112 | Nguyễn Thị T. | 54 | Nữ | 171002116GP | 04/10/2017 |
| 104 | ND114 | Vũ Đình Th. | 93 | Nam | 171001689GP | 08/10/2017 |
| 105 | ND115 | Nguyễn Hưng Ph. | 53 | Nam | 170921379GP | 10/10/2017 |
| 106 | ND116 | Lê Thị M. | 65 | Nữ | 171005474GP | 10/10/2017 |
| 107 | ND117 | Vũ Văn D. | 52 | Nam | 171000937GP | 12/10/2017 |
| 108 | ND118 | Nguyễn Đức Đ. | 70 | Nam | 171004633GP | 15/10/2017 |
| 109 | ND119 | Nguyễn Văn T. | 53 | Nam | 171005595GP | 17/10/2017 |
| 110 | ND120 | Vũ Thành L. | 39 | Nam | 171009753GP | 17/10/2017 |
| 111 | ND121 | Trương Hữu V. | 51 | Nam | 171007614GP | 18/10/2017 |
| 112 | ND122 | Vũ Thị L. | 39 | Nữ | 171010274GP | 19/10/2017 |
| 113 | ND123 | Nguyễn Văn B. | 33 | Nam | 171011779GP | 22/10/2017 |
| 114 | ND125 | Ngô Văn D. | 20 | Nam | 171013385GP | 24/10/2017 |
| 115 | ND126 | Phạm Văn Đ. | 77 | Nam | 171011009GP | 27/10/2017 |
| 116 | ND127 | Nguyễn Xuân V. | 50 | Nam | 171013925GP | 27/10/2017 |
| 117 | ND128 | Hoàng Thị Th. | 60 | Nữ | 171015311GP | 30/10/2017 |
| 118 | ND129 | Nguyễn Thị L. | 21 | Nữ | 171016197GP | 31/10/2017 |

| | | | | | | |
|-----|-------|----------------------|----|-----|-------------|------------|
| 119 | ND130 | Vũ Thị L. | 39 | Nữ | 171016210GP | 31/10/2017 |
| 120 | ND132 | Trần Quang Nh. | 57 | Nam | 171000005GP | 31/10/2017 |
| 121 | ND133 | Trần Ngọc Th. | 53 | Nam | 171100437GP | 01/11/2017 |
| 122 | ND134 | Ngô Văn Th. | 35 | Nam | 171016121GP | 01/11/2017 |
| 123 | ND135 | Đông Minh Đ. | 74 | Nam | 171015999GP | 02/11/2017 |
| 124 | ND136 | Nguyễn Văn N. | 36 | Nam | 171016253GP | 04/11/2017 |
| 125 | ND137 | Vương Văn T. | 57 | Nam | 171101810GP | 05/11/2017 |
| 126 | ND138 | Ngô Thị Ng. | 79 | Nữ | 171102372GP | 06/11/2017 |
| 127 | ND139 | Vũ Xuân Th. | 70 | Nam | 171102394GP | 07/11/2017 |
| 128 | ND140 | Đào Văn Nh. | 59 | Nam | 171102356GP | 07/11/2017 |
| 129 | ND141 | Trần Thị Ch. | 59 | Nữ | 171102751GP | 07/11/2017 |
| 130 | ND142 | Mai Văn N. | 46 | Nam | 171101612GP | 08/11/2017 |
| 131 | ND143 | Phạm Ngọc Mỹ L. | 23 | Nữ | 171103335GP | 08/11/2017 |
| 132 | ND144 | Trần Ngọc A. | 70 | Nữ | 171103252GP | 08/11/2017 |
| 133 | ND145 | Trần Khắc L. | 54 | Nam | 171006980GP | 10/11/2017 |
| 134 | ND146 | Vũ Tiên Th. | 49 | Nam | 171104394GP | 11/11/2017 |
| 135 | ND147 | Lương Việt C. | 38 | Nam | 171102757GP | 10/11/2017 |
| 136 | ND149 | Trịnh Thị V. | 72 | Nữ | 171103776GP | 12/11/2017 |
| 137 | ND150 | Đông Thị Thanh Th | 25 | Nữ | 171105164GP | 13/11/2017 |
| 138 | ND152 | Nguyễn Thị T. | 76 | Nữ | 171104449GP | 16/11/2017 |
| 139 | ND153 | Lưu Văn V. | 87 | Nam | 171106690GP | 16/11/2017 |
| 140 | ND154 | Phạm Văn M. | 53 | Nam | 171106567GP | 17/11/2017 |
| 141 | ND155 | Bùi Văn H. | 49 | Nam | 171106213GP | 17/11/2017 |
| 142 | ND156 | Phan Văn M. | 63 | Nam | 171107466GP | 17/11/2017 |

| | | | | | | |
|-----|-------|--------------------|----|-----|-------------|------------|
| 143 | ND157 | Nguyễn Văn K. | 57 | Nam | 171106658GP | 16/11/2017 |
| 144 | ND158 | Đào Đình H. | 46 | Nam | 171107464GP | 17/11/2017 |
| 145 | ND159 | Chu Văn Đ. | 25 | Nam | 171107748GP | 19/11/2017 |
| 146 | ND161 | Bùi Văn Ng. | 28 | Nam | 171105630GP | 14/11/2017 |
| 147 | ND162 | Bùi Văn Th. | 65 | Nam | 170906829GP | 21/11/2017 |
| 148 | ND163 | Trần Thị M. | 86 | Nữ | 171106229GP | 15/11/2017 |
| 149 | ND164 | Nguyễn Thị T. | 76 | Nữ | 171108631GP | 21/11/2017 |
| 150 | ND166 | Nguyễn Kh. | 54 | Nam | 171108709GP | 22/11/2017 |
| 151 | ND167 | Nguyễn Đức Gi. | 40 | Nam | 171108343GP | 24/11/2017 |
| 152 | ND168 | Đình Ngọc L. | 32 | Nữ | 171109675GP | 24/11/2017 |
| 153 | ND169 | Trịnh Thị V. | 76 | Nữ | 171110231GP | 26/11/2017 |
| 154 | ND170 | Lê Trung Qu. | 67 | Nam | 171109672GP | 27/11/2017 |
| 155 | ND171 | Nguyễn Quý H. | 84 | Nữ | 171109648GP | 28/11/2017 |
| 156 | ND172 | Vũ Xuân Th. | 70 | Nam | 171110814GP | 29/11/2017 |
| 157 | ND173 | Trần Thị Ph. | 39 | Nữ | 171111289GP | 29/11/2017 |
| 158 | ND174 | Phùng Thị Hồng Ph. | 52 | Nữ | 171109940GP | 03/12/2017 |
| 159 | ND175 | Vương Đình H. | 23 | Nam | 171200372GP | 01/12/2017 |
| 160 | ND176 | Nguyễn Thị B. | 53 | Nữ | 171200491GP | 03/12/2017 |
| 161 | ND177 | Đàm Khắc T. | 77 | Nam | 171200565GP | 04/12/2017 |
| 162 | ND178 | Phạm Văn D. | 38 | Nam | 171110042GP | 01/12/2017 |
| 163 | ND179 | Đoàn Thị Th. | 85 | Nữ | 171104721KC | 05/12/2017 |
| 164 | ND180 | Nguyễn Sách L. | 45 | Nam | 171201804GP | 06/12/2017 |
| 165 | ND181 | Nguyễn Văn S. | 50 | Nam | 171202968GP | 07/12/2017 |
| 166 | ND182 | Trần Văn Ch. | 55 | Nam | 171203007GP | 08/12/2017 |
| 167 | ND183 | Trần Văn S. | 61 | Nam | 171203148GP | 11/12/2017 |

| | | | | | | |
|----------------|------------------|-----------------------------|---------------|-----|------------------------|-----------------------|
| 168 | ND184 | Trịnh Xuân V. | 69 | Nam | 171203670GP | |
| 169 | ND185 | Đoàn Bá K. | 80 | Nam | 171203655GP | |
| 170 | ND186 | Lê Nguyên H. | 75 | Nam | 171203048GP | |
| | ND187 | Trần Ngọc T. | 45 | Nam | 171204350GP | |
| | | | 57 | Nam | | 12/12/2017 |
| | | Bùi Văn Th. | 34 | Nam | | 12/12/2017 |
| 171 | ND190 | Đỗ Văn S. | 39 | Nam | 171205093GP | 13/12/2017 |
| 172 | ND188 | Trần Quốc V. | 58 | Nam | 171204690GP | 13/12/2017 |
| 176 | ND182 | Hà Quang V. | 44 | Nam | 171205986GP | 14/12/2017 |
| 174 | ND193 | Vi Văn L. | 34 | Nam | 171205128GP | 15/12/2017 |
| 175 | ND194 | Nguyễn Ngọc Đ.L. | 67 | Nam | 171205654GP | 17/12/2017 |
| | | Nguyễn Xuân | | | | 18/12/2017 |
| 179 | ND195 | Kh. | 61 | Nam | | 18/12/2017 |
| 178 | | Nguyễn Thị Ch. | 64 | Nữ | 171205554GP | 18/12/2017 |
| 181 | ND198 | Phạm Đình O. | 60 | Nam | 171205669GP | |
| 182 | ND199 | Sái Văn H. | 56 | Nam | 171207256GP | 27/12/2017 |
| 186 | ND200 | Lê Quang Th. | 65 | Nam | 171206840GP | 25/12/2017 |
| 184 | ND201 | Lưu Văn L. | 47 | Nam | 171207115GP | 22/12/2017 |
| | | Lê Quang T. | 60 | Nam | | 22/12/2017 |
| | | | 61 | Nam | | |
| | | Nguyễn Thị M. | 64 | Nữ | 171209037GP | 25/12/2017 |
| 188 | ND203 | Nguyễn Thủy S. | 76 | Nam | 171208288GP | 25/12/2017 |
| 189 | ND206 | Nguyễn Thị Kim | 59 | Nữ | 171207886GP | 27/12/2017 |
| 187 | ND204 | O. | | | | 30/12/2017 |
| 190 | ND207 | Nguyễn Hải H. | 43 | Nam | 171207311GP | 29/12/2018 |
| | ND208 | Nguyễn Thị N. | 67 | Nữ | | 30/12/2017 |

| | | | | | | |
|-----|-------|--------------------|----|-----|-------------|-----------|
| 192 | ND209 | Nguyễn Thị B. | 69 | Nữ | 180100433GP | 05/1/2018 |
| 193 | ND210 | Nguyễn Quang H. | 48 | Nam | 180100534GP | 04/1/2018 |
| 194 | ND211 | Vũ Xuân C. | 52 | Nam | 180101870GP | 08/1/2018 |
| 195 | ND212 | Nguyễn Ngọc Th. | 64 | Nam | 180102788GP | 09/1/2018 |
| 196 | ND213 | Nguyễn Anh D. | 50 | Nam | 180100725GP | 10/1/2018 |

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN



GS.TS. Nguyễn Văn Kính

NGHIÊN CỨU SINH



Trần Thị Hải Ninh

Xác nhận của đơn vị nơi thu tuyển bệnh nhân
TRƯỞNG PHÒNG KẾ HOẠCH TỔNG HỢP
BỆNH VIỆN BỆNH NHIỆT ĐỚI TRUNG ƯƠNG



PHÓ TRƯỞNG PHÒNG KHTH

ThS. Nguyễn Thanh Bình