

Khảo sát đặc điểm kiểu hình kháng thuốc kháng sinh và một số đặc trưng về gen của các chủng *Klebsiella pneumoniae* gây nhiễm khuẩn tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế và Bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hòa

Trần Thị Tuyết Ngọc¹, Lê Thị Lan Hương², Nguyễn Hoàng Bách¹, Lê Văn An¹

(1) Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế

(2) Trường Cao đẳng Y tế Khánh Hòa

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định đặc điểm kiểu hình kháng thuốc kháng sinh của các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được. Xác định một số gen độc lực và gen đề kháng kháng sinh ở các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được từ mẫu bệnh phẩm máu, dịch màng phổi, dịch màng bụng, dịch não tủy, dịch rửa phế quản, nước tiểu, mủ, đờm của bệnh nhân nhiễm khuẩn tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế và Bệnh viện Đa Khoa tỉnh Khánh Hòa. **Phương pháp:** Nuôi cấy, phân lập và định danh *Klebsiella pneumoniae*. Xác định tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh bằng kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh khuếch tán trong thạch (Kirby-Bauer), xác định sự sản xuất Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) - β -lactamase phổ rộng. Khảo sát tỷ lệ mang các gene *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *magA*, *rmpA* bằng PCR đa mồi. **Kết quả:** *Klebsiella pneumoniae* đề kháng cao với các kháng sinh. 43 chủng *Klebsiella pneumoniae* có ESBL (+) đều đa kháng thuốc kháng sinh và có tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao hơn so với các chủng ESBL (-). Chủng *Klebsiella pneumoniae* có mang gene đề kháng kháng sinh *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} lần lượt 11%, 2%, 2%. Chủng *Klebsiella pneumoniae* mang gene độc lực *magA*, *rmpA* là 24% và 9%. **Kết luận:** *Klebsiella pneumoniae* đề kháng cao với nhiều kháng sinh. Đặc biệt các chủng *Klebsiella pneumoniae* ESBL (+). Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* có mang gene đề kháng kháng sinh *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} là 11%, 2%, 2%. Tỷ lệ mang gene độc lực *magA*, *rmpA* là 24% và 9%.

Từ khóa: *Klebsiella pneumoniae*, kháng kháng sinh, PCR.

Abstract

Investigation on the phenotypic characteristics of antibiotic resistance and some genetic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing infections at Hue university of Medicine and Pharmacy Hospital and Khanh Hoa General Hospital

Tran Thi Tuyet Ngoc¹, Le Thi Lan Huong², Nguyen Hoang Bach¹, Le Van An¹

(1) Department of Microbiology, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

(2) Khanh Hoa Medical College

Objectives: To definite antibiotic-resistant phenotypes of *Klebsiella pneumoniae* isolated; Identifying some virulence genes and antibiotic resistance genes in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples collected in infected patients. **Methods:** We cultured, isolated and identified *Klebsiella pneumoniae*. Then we definitely the sensitivity to antibiotics of bacteria by disk diffusion (Kirby-Bauer) method, defined the production of ESBL. Considering the proportion of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *magA*, *rmpA* genes by multiplex PCR. **Results:** *Klebsiella pneumoniae* isolates were resistant to antibiotics with high proportion. All 43 isolates of *Klebsiella pneumoniae* with ESBL (+) had higher proportion of antibiotic resistance than ESBL (-) isolates. *Klebsiella pneumoniae* carried antibiotic resistance genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} were 11%, 2%, 2%. There were 24% isolates of *Klebsiella pneumoniae* carrying virulence genes *rmpA*, 9% of them carrying *magA* gene. **Conclusions:** *Klebsiella pneumoniae* is highly resistant to many antibiotics. Especially *Klebsiella pneumoniae* isolates ESBL (+). The proportion of *Klebsiella pneumoniae* carrying the antibiotic resistance *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} genes were 11%, 2%, 2%. The proportion of carrying the virulence *magA*, *rmpA* genes is 24% and 9%.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistant, PCR

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Klebsiella pneumoniae là vi khuẩn đứng thứ hai sau *Escherichia coli* gây nhiễm trùng bệnh viện tại Việt Nam cũng như trên thế giới. Vi khuẩn này gây viêm phổi, nhiễm trùng tiết niệu, nhiễm khuẩn vết thương, nhiễm khuẩn huyết đặc biệt ở những bệnh nhân suy giảm miễn dịch [1]. *Klebsiella pneumoniae* cũng là một trong những vi khuẩn Gram âm đa kháng thuốc hàng đầu ở Việt Nam.

Các kháng sinh Carbapenem được khuyến cáo là thuốc được lựa chọn để điều trị các bệnh nhiễm trùng nặng do vi khuẩn Gram âm đề kháng đa kháng sinh sản xuất β -lactamase phổ rộng (ESBL) và *Enterobacteriaceae* sản xuất AmpC-lactamase qua trung gian plasmid (pAmpC) [2]. Tuy nhiên, những năm gần đây, *Enterobacteriaceae* đề kháng carbapenem do sản xuất enzyme carbapenemase đặc biệt là KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase 1), OXA-48 (Oxacillinase) đã được báo động trên nhiều quốc gia [2].

Cơ chế đề kháng của vi khuẩn này liên quan đến khả năng sinh ra các enzyme β lactamase phổ rộng làm phá hủy hầu hết các kháng sinh nhóm β lactam [3]. Đặc biệt một số chủng *Klebsiella pneumoniae* đề kháng với nhiều loại kháng sinh thường do sự hiện diện của plasmid mang gen mã hóa cho enzyme KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) hay NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase 1), OXA-48 (Oxacillinase). Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng các gen đề kháng này có thể lây truyền chéo (horizontal gene transfer) giữa các loài vi khuẩn gram âm thông qua plasmid và transposon [4].

Những chủng *Klebsiella pneumoniae* gây nhiễm khuẩn bệnh viện mang nhiều yếu tố độc lực làm cho chúng có khả năng xâm nhiễm mạnh hơn và gây nhiễm trùng nhiều cơ quan.

Các nghiên cứu gần đây tìm thấy một số chủng *Klebsiella pneumoniae* xâm lấn mạnh gây áp-xe gan và xâm nhiễm thứ phát gây viêm màng não, những chủng *Klebsiella pneumoniae* này được tìm thấy mang trong nó các gene *magA*, *rpmA* quyết định tính độc lực mạnh hơn so với các chủng ít xâm nhiễm [5].

Các nghiên cứu ở Việt Nam về *Klebsiella pneumoniae* đề kháng kháng sinh chủ yếu qua thực hiện các khảo sát tính nhạy của chúng trên kháng sinh đồ, việc sử dụng các kỹ thuật phân tử để xác định gene đề kháng của chúng chưa được thực hiện vì khá tốn kém. Tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế và bệnh viện Đa Khoa tỉnh Khánh Hòa hằng năm số lượng bệnh nhân nhiễm khuẩn phân lập được do *Klebsiella pneumoniae* khá cao. Liệu trong các chủng *K. pneumoniae* kháng

thuốc phân lập được ở bệnh nhân có tồn tại chủng mang gene đề kháng KPC, NDM, OXA-48 hay không? trong các chủng phân lập từ các nguồn gốc khác nhau có sự khác nhau về các yếu tố độc lực quan trọng hay không? Xuất phát từ một số câu hỏi đặt ra như trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: "**Khảo sát tính kháng thuốc kháng sinh và một số đặc trưng về gen của các chủng *Klebsiella pneumoniae* gây nhiễm khuẩn tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế**" với các mục tiêu như sau:

1. Xác định phenotype kháng thuốc kháng sinh của các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được.

2. Xác định một số gen độc lực *magA*, *rpmA* và các gen đề kháng kháng sinh *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} ở các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Nghiên cứu thực hiện trên 100 chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* được phân lập từ từ mẫu bệnh phẩm máu, dịch màng phổi, dịch màng bụng, dịch não tủy, dịch rửa phế quản, nước tiểu, mủ, đờm của bệnh nhân nhiễm khuẩn điều trị tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế và Bệnh viện Đa Khoa tỉnh Khánh Hòa. Trong số đó 70 chủng ở Bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế (BVĐHYD Huế) và 30 chủng ở Bệnh viện đa khoa tỉnh (BVĐKKH) Khánh Hòa.

2.2. Thiết kế nghiên cứu: Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang và phương pháp nghiên cứu thực nghiệm.

2.3. Địa điểm nghiên cứu và thời gian: Khoa Vi sinh, Trường Đại học Y Dược Huế và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Khánh Hòa từ 4/2018 – 04/2019

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương tiện nghiên cứu

2.4.1.1. Sinh phẩm & hóa chất

- Môi trường phân lập xác định *Klebsiella pneumoniae* của hãng Bio-Rad: thạch máu (blood agar), thạch chocolate, thạch Mac-Conkey

- Môi trường định danh (môi trường hóa sinh...), sử dụng thanh định danh API 20E để xác định tính chất sinh vật hóa học xác định các loài vi khuẩn Gram (-) của hãng BioMerieux - Pháp.

- Khoanh giấy kháng sinh để thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ của hãng Liofilchem (Ý), Bioanalyse (Thổ Nhĩ Kỳ), Oxoid (Anh).

- Dream Taq Green PCR Master Mix (dNTP's, MgCl₂, nước khử ion, DNA Taq polymerase) của Thermo Fisher Scientific, Mỹ

- Các hóa chất dùng để điện di sản phẩm DNA: gel agarose dùng trong điện di (Meck, Đức), GelRed (Mỹ), TAE (Tris Acetate EDTA), DNA ladder của

Thermo Fisher Scientific (Mỹ).

- Trình tự primer các vùng gene thực hiện cho nghiên cứu này nêu ở Bảng 1.

2.4.1.2. Trang thiết bị - dụng cụ:

- Tủ ấm, tủ an toàn sinh học cấp 2 và các thiết bị nuôi cấy và thực hiện kháng sinh đồ của vi khuẩn có tại khoa Vi sinh bệnh viện Đại học Y Dược Huế.

- Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Mỹ), máy ly tâm, máy điện di và máy đọc gel dùng cho kỹ thuật sinh học phân tử có tại khoa Vi sinh Đại học Y Dược Huế.

Sinh phẩm, hóa chất:

2.4.2. Tiến hành nghiên cứu

2.4.2.1. Nuôi cấy, phân lập và định danh *Klebsiella pneumoniae*

Các loại bệnh phẩm lâm sàng gồm máu, dịch màng phổi, dịch màng bụng, dịch não tủy, dịch rửa phế quản, nước tiểu, mủ, đàm đưa đến phòng xét nghiệm Khoa Vi sinh được tiến hành nuôi cấy phân lập và định danh *Klebsiella pneumoniae* theo quy trình chuẩn [6]. Xác *Klebsiella pneumoniae* khi có đủ các tính chất dưới đây:

+ Trực khuẩn gram âm

+ Tính chất phát triển đặc thù trên môi trường cấy: khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy ướt.

+ Các tính chất hóa sinh: test API E20 dương tính với *Klebsiella pneumoniae* [glucose (+), mantose (+), lactose (+), urease (+), catalase (+), citrat (+), methyl red (-), phản ứng VP và Indol có thể (+/-), ornithin decarboxylase (-), arginin decarboxylase (-), lysin decarboxylase (+), H₂S (-), di động (+)].

2.4.3. Xác định tính kháng thuốc của *Klebsiella pneumoniae*

Tính nhạy cảm của vi khuẩn với các thuốc kháng

sinh được thực hiện với kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh khuếch tán trong thạch (Kirby-Bauer) trên môi trường Mueller Hinton theo quy trình chuẩn của CLSI 2015. Đánh giá mức độ nhạy cảm/đề kháng của từng loại kháng sinh dựa vào đường kính vùng ức chế (mm) theo hướng dẫn của CLSI 2015.

2.4.4. Phương pháp phát hiện chủng vi khuẩn sản xuất ESBLs đối với *Klebsiella pneumoniae*

Trên kháng sinh đồ, tất cả chủng *K. pneumoniae* có đường kính vòng vô khuẩn với các kháng ceftazidime (30 µg) < 22 mm, cefotaxime (30 µg) < 27 mm, ceftriaxone (30 µg) < 25 mm được chọn để thực hiện tiếp thử nghiệm xác định ESBL [7].

Thử nghiệm xác định ESBL với các chủng *Klebsiella pneumoniae* nghi ngờ bằng phương pháp khoanh giấy phối hợp khuếch tán theo hướng dẫn của quy trình [8]. Sử dụng các đĩa kháng sinh CTX (cefotaxime 30 µg), CTC (cefotaxime-clavulanic acid 30/10 µg), CAZ (ceftazidime 30 µg), CZC (ceftazidime-clavulanic acid 30/10 µg). *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 được sử dụng để làm chứng dương và *E.coli* ATCC 25922 được sử dụng để làm chứng âm.

Xác định ESBLs dương tính khi có sự gia tăng đường kính vùng vô khuẩn >5 mm đối với cefotaxime-clavulanic acid (30/10 µg) và ceftazidime-clavulanic acid (30/10 µg) so với đường kính vùng vô khuẩn của kháng sinh đó khi thử nghiệm một mình [8].

2.4.5. Kỹ thuật Multiplex PCR xác định gene *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *magA*, *rpmA*

Tách chiết DNA của các chủng *Klebsiella pneumoniae* được bằng phương pháp nhiệt. Thực hiện xác định các gene *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *magA*, *rpmA* bằng 2 quy trình khuếch đại đa môi. Quy trình 1 phát hiện gene *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}.

Quy trình 2 phát hiện gene *magA*, *rpmA*

Bảng 1. Trình tự primer của các vùng gene được chọn trong nghiên cứu

Gene	Môi	Trình tự	Chiều dài (bp)	Tài liệu tham khảo
<i>la</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1} -F	3'GGTTTGGCGAT CTGGTTTTC 5'	621	[9]
	<i>bla</i> _{NDM-1} -R	5'CGGAATGGCTCATCACGATC 3'		
<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{KPC} -F	3'CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG 5'	728	[6]
	<i>bla</i> _{KPC} -R	5' CTTGTCATCCTTGTAGGCG 3'		
<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{OXA-48} -F	3'GCGTGGTTAAGGATGAACAC 5'	438	[6]
	<i>bla</i> _{OXA-48} -R	5' CATCAAGTTCAACCCAACCG 3'		
<i>magA</i>	<i>magA</i> -F	3'CGCCGCAAATACGAGAAGTG 5'	540	[10]
	<i>magA</i> -R	5'GCAATCGAAGTGAAGAGTGC3'		

<i>RmpA</i>	<i>rmpA-F</i>	3'CATAAGAGTATTGGTTGACAG5'	461	[5]
	<i>rmpA-R</i>	5'CTTGCATGAGCCATCTTTCA 3'		

Phản ứng khuếch đại được thực hiện với máy luân nhiệt Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems),) với chương trình nhiệt như sau:

Quy trình 1: 94°C/10 phút, 36 chu kỳ ở 94°C/30 giây, 52°C/40 giây, ở 72°C/50 giây và 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR được xác định bằng điện di trong gel agarose 1,5 % với điện thế 100V và đọc với máy đọc gel sau khi nhuộm với chất màu dye.

Quy trình 2: 94°C/10 phút, 35 chu kỳ ở 94°C/30 giây, 56°C/45 giây, ở 72°C/50 giây và 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được xác định bằng điện di trong gel agarose 1,5 % với điện thế 100V và đọc với máy đọc gel sau khi nhuộm với chất màu dye.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm kiểu hình kháng thuốc kháng sinh được phân lập của các chủng *Klebsiella pneumoniae*

Bảng 2. Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* đề kháng các nhóm kháng sinh β lactam và một số kháng sinh

Kháng sinh B LACTAM và một số kháng sinh	Cả hai BV		BV Khánh Hoà		BV Y dược Huế	
	R/n	Tỷ lệ %	R/n	Tỷ lệ %	R/n	Tỷ lệ %
Penicilin	93/100	93	27/30	90,0	66/70	94,3
Cephalosporin II	37/70	52,9	21/30	70,0	16/40	40
Cephalosporin III	51/100	51,0	19/30	63,3	32/70	44,3
Cephalosporin IV	11/28	39,3	11/28	39,3	0/0	0
Carbapenem	19/100	19,0	9/30	30,0	10/70	14,3
Chloramphenicol	21/57	32,3	10/23	43,5	11/34	36,7
Quinolon	44/95	46,3	16/30	53,3	28/65	43,0
Tetracycline	50/83	60,2	20/28	71,4	30/55	54,5
Aminoglycosid	42/98	42,9	18/30	60,0	24/68	35,3
Cotrimoxazol	50/100	50,0	21/30	70,0	29/70	41,4

Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* đề kháng kháng sinh nhóm β lactam như sau: penicillin 93%, cephalosporin thế hệ II 52,9%; cephalosporin thế hệ III 51,0%, cephalosporin thế hệ IV 39,3%, carbapenem 19,0%. (Tổng số mẫu thử nghiệm trên các loại kháng sinh nhau vì tùy từng đợt sử dụng kháng sinh khác nhau)

Ở Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, tỷ lệ đề kháng của *Klebsiella pneumoniae* là tetracycline (54,5%), quinolon (43,0%), cotrimoxazol (41,4%), chloramphenicol (36,7%), aminoglycosid (35,3%). Ở bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hoà tỷ lệ đề kháng của *Klebsiella pneumoniae* cao nhất là tetracycline (71,4%), tiếp đến là cotrimoxazol (70%), aminoglycosid (60%), quinolon (53,3%), chloramphenicol (43,5%).

Bảng 3. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của các chủng *Klebsiella pneumoniae* đề kháng carbapenems (CRKP)

Kháng sinh	Số lượng CRKP đề kháng (R/n)	Tỷ lệ %
Penicilin	19/19	100
Cephalosporin thế hệ II	13/13	100
Cephalosporin thế hệ III	17/19	89,5
Cephalosporin thế hệ IV	4/7	57,1

Imipenem	10/19	52,6
Meropenem	9/19	47,4
Ertapenem	19/19	100
Chloramphenicol	14/16	87,5
Quinolon	19/19	100
Tetracycline	14/17	82,4
Aminoglycosid	15/19	78,9
Cotrimoxazol	18/19	94,7

Các chủng CRKP đề kháng các loại kháng sinh với tỷ lệ cao, đặc biệt với penicillin, cephalosporin thế hệ II, III, ertapenem, chloramphenicol, quinolon, tetracycline, cotrimoxazol tỷ lệ đề kháng trên 80%.

Bảng 4. Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* phân lập được có enzyme ESBL (+)

ESBL	Cả hai BV		BV ĐKKH		BV ĐHYD Huế	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
DƯƠNG	43	43	18	60,0	25	35,7
ÂM	57	57	12	40,0	45	64,3
Tổng cộng	100	100	30	100	70	100

Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* phân lập được có enzyme ESBL (+) ở bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hoà là 60% (18/30 chủng). Ở Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế là 35,7% (25/70 chủng), tỷ lệ chung ở cả hai bệnh viện là 43% (43/100 chủng).

Bảng 5. So sánh tỷ lệ đề kháng kháng sinh giữa các chủng *Klebsiella pneumoniae* có ESBL (+) và ESBL (-)

Kháng sinh	Chủng ESBL (+)			Chủng ESBL (-)			P value
	Số chủng thử nghiệm	Số chủng đề kháng	Tỷ lệ %	Số chủng thử nghiệm	Số chủng đề kháng	Tỷ lệ %	
Penicilin	43	43	100,0	57	46	80,7%	0,002
Cephalosporin II	33	32	97,0	37	5	13,5	0,000
Cephalosporin III	43	41	95,3	54	7	13,0	0,000
Cephalosporin IV	16	11	68,8	12	0	0,0	0,000
Carbapenem	41	17	41,5	57	2	3,5	0,000
Chloramphenicol	33	15	45,5	24	6	25,0	0,114
Quinolon	43	35	81,4	52	9	17,3	0,000
Tetracycline	40	30	75,0	43	20	46,5	0,008

Aminoglycosid	43	34	79,1	55,8	14,5	0,000
Cotrimoxazol	43	42	97,7	57,8	14,0	0,000

Các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được có ESBL (+) có tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao hơn chloramphenicol 45,5%, carbapenem 41,5%. Sự khác biệt về tỷ lệ đề kháng các kháng sinh (trừ Chloramphenicol) của các chủng *Klebsiella pneumoniae* ESBL (+) và ESBL (-) có ý nghĩa thống kê.

3.2. Một số gen đề kháng kháng sinh và gen độc lực ở các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được.

Bảng 6. Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* mang gene bla_{NDM-1} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48} đề kháng các kháng sinh Carbapenem trên kháng sinh đồ ở hai bệnh viện

	Cả hai BV	BV ĐKKH	BV ĐHYD Huế
CRKP có bla_{NDM-1} (+)	11	3	8
CRKP có bla_{KPC} (+)	2	1	1
CRKP có bla_{OXA-48} (+)	2	0	2
CRKP	19	9	10
Tỷ lệ CRKP có bla_{NDM-1} (+) / CRKP (%)	57,9%	33,3%	80,0%
Tỷ lệ CRKP có bla_{KPC} (+) / CRKP (%)	10,5%	11,1%	10,0%
Tỷ lệ CRKP có bla_{OXA-48} (+) / CRKP (%)	10,5%	0%	20%

Ghi chú: CRKP: *Klebsiella pneumoniae* đề kháng các kháng sinh Carbapenem (Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*)

Kỹ thuật khuếch đại đa mồi trên 100 chủng *Klebsiella pneumoniae*, kết quả cho thấy có 11/100 (11%) mang gene bla_{NDM-1} , 2/100 (2%) mang gene bla_{KPC} , 2/100 (2%) mang gene bla_{OXA-48} .

Bảng 7. Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* mang các gene *rmpA*, *magA* ở hai bệnh viện

Chủng <i>Klebsiella pneumoniae</i> có gene	BV ĐKKH		BV ĐHYD Huế		Cả hai BV	
	Số chủng (n) (+)	Tỷ lệ (%)	Số chủng (n) (+)	Tỷ lệ (%)	Số chủng (n) (+)	Tỷ lệ (%)
<i>rmpA</i>	7	23,3	17	24,3	24	24,0
Chỉ có <i>rmpA</i>	5	16,7	10	14,3	15	15,0
<i>magA</i>	2	6,7	7	10,0	9	9,0
Chỉ có <i>magA</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>rmpA</i> và <i>magA</i>	2	6,7	7	10,0	9	9,0

Có 24 chủng *Klebsiella pneumoniae* có gene *rmpA* chiếm tỷ lệ 24% (24/100), 9 chủng gene *magA* chiếm tỷ lệ 9% (9/100). Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* mang các gene *rmpA*, *magA* ở bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hoà là 23,3%, và 6,7%; ở Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế là 24,3% và 10%. Tỷ lệ chung ở cả hai bệnh viện là 24% và 9%. Trong đó tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* mang cả 2 gene *rmpA* và *magA* là 6,7% (2/30) ở bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hoà, 10% (7/70) ở Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế.

ở cả hai bệnh viện là 9% (9/100).

4. BÀN LUẬN

4.1. Xác định đặc điểm kiểu hình kháng thuốc kháng sinh của các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được.

4.1.1. Đề kháng của chủng *Klebsiella pneumoniae* được phân lập với các nhóm kháng sinh

Tỷ lệ các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được đề kháng với Penicilin ở cả hai bệnh viện với tỷ lệ cao (93%), riêng ở Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế là 94,3%, bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hoà tỷ lệ 90%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Phạm Thị Hoài An năm 2014 với tỷ lệ kháng penicillin của các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập tại viện Pasteur TP Hồ Chí Minh là 94,29% [11] và nghiên cứu của Võ Công Đồng về *Klebsiella pneumoniae* gây nhiễm trùng huyết tại bệnh viện Nhi Đồng 2, tỷ lệ kháng ampiciline là 100%, augmentin 28,1% [12].

Tỷ lệ các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được đề kháng với Cephalosporin thế hệ II, III, ở cả hai bệnh viện đề kháng đều >50%, lần lượt là 52,9%; 51,0%. Đề kháng của *Klebsiella pneumoniae* với cephalosporin thế hệ IV (cefepim) cũng khá cao ở bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hòa (39,3%), chỉ có 17/28 (61,7%) chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được nhạy cảm, tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế không khảo sát kháng sinh này.

Tỷ lệ các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được đề kháng với nhóm carbapenem phân lập được trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng là 19%, bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hòa có tỷ lệ 30%, bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế thì tỷ lệ này thấp hơn (14,3%). Kết quả này cao hơn nghiên cứu của Phạm Thị Hoài An về các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập tại viện Pasteur TP Hồ Chí Minh thì tỷ lệ kháng carbapenem của *Klebsiella pneumoniae* là 2,86% (imipenem: 2,86%; meropenem: 2,86%) [11].

Tỷ lệ các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập ở hai bệnh viện đề kháng với các nhóm kháng sinh khác cũng khá cao: Tetracycline (60,2%), Cotrimoxazol (50%), Quinolon (46,3%), Aminoglycosid (42,9%), Chloramphenicol (32,3%).

4.1.2. Đề kháng của các chủng *Klebsiella pneumoniae* đề kháng carbapenem (CRKP)

Klebsiella pneumoniae đề kháng carbapenem đang là mối lo ngại trên toàn cầu, gây khó khăn và hạn chế trong lựa chọn kháng sinh điều trị cho bác sĩ lâm sàng. Thêm vào đó sự đồng tồn tại của nhiều cơ chế kháng thuốc trên cùng một chủng vi khuẩn làm tăng khả năng đa đề kháng của chúng. 19/100 chủng *Klebsiella pneumoniae* đề kháng carbapenem

(CRKP). Trong đó tỷ lệ đề kháng kháng sinh của các chủng CRKP như sau: Imipenem 52,6%, Ertapenem 100%. Số liệu này cũng khá tương tự với một nghiên cứu năm 2018 ở Trung Quốc với tỷ lệ CRKP đề kháng imipenem 99,4%, ertapenem 100% [13].

Cơ chế đề kháng với các carbapenem liên quan đến sự xuất hiện gần đây các plasmid mang gene đề kháng các kháng sinh carbapenem, những chủng *K. pneumoniae* có mang plasmid này có khả năng sản xuất carbapenamase làm bất hoạt các kháng sinh nhóm này và trở nên đề kháng, các chủng vi khuẩn này ngoài ra còn kháng với nhiều kháng sinh trong nhóm β lactam và nhiều kháng sinh khác.

4.1.3. Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* có ESBL dương tính

Ở bảng 4, có 43 chủng *Klebsiella pneumoniae* đề kháng kháng sinh có ESBL (+) ở cả hai bệnh viện (tỷ lệ 43%). Tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* có enzyme ESBL (+) ở bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hòa là 60% (18/30 chủng). Ở Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế là 35,7% (25/70 chủng). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Phạm Thị Hoài An với tỷ lệ *Klebsiella pneumoniae* sinh ESBL là 65,71%,.

Các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được có ESBL (+) có tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao hơn nhiều so với các chủng *Klebsiella pneumoniae* không có ESBL. Đặc biệt 100% chủng ESBL (+) đề kháng penicillin, cephalosporin thế hệ II, cotrimoxazol, tỷ lệ kháng cephalosporin thế hệ III cũng rất cao (94,9%), quinolon 81,3%, aminoglycosid 79,1%, tetracycline 75%, cephalosporin thế hệ IV 68,8%, chloramphenicol 53,5%, carbapenem 46,5%. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu như nghiên cứu của Phạm Thị Hoài An, *Klebsiella pneumoniae* sinh ESBL có khả năng đề kháng nhiều loại kháng sinh với tỷ lệ kháng cao hơn so với *Klebsiella pneumoniae* không sinh ESBL, đặc biệt kháng với penicillins, cephalosporin kể cả cephalosporin thế hệ thứ ba (CAZ: 60,87. Sự khác biệt về tỷ lệ đề kháng các kháng sinh (trừ penicillin, chloramphenicol, tetracycline) của các chủng *Klebsiella pneumoniae* ESBL (+) và ESBL (-) có ý nghĩa thống kê.

4.2. Một số gen độc lực và gen đề kháng kháng sinh ở các chủng *Klebsiella pneumoniae* phân lập được.

4.2.1. *Klebsiella pneumoniae* mang gene bla_{KPC}, bla_{OXA-48} đề kháng kháng sinh

Nhằm khảo sát cơ chế đề kháng liên quan đến sự hiện diện của các gene mã hóa cho một số enzyme đề kháng phổ biến, chúng tôi sử dụng các cặp mồi của Nordmann và cộng sự 4, L. Poirel và cộng sự (2011) [6] để khuếch đại các vùng gene đích blaNDM-1, blaKPC, blaOXA-48 trên 100

chúng *Klebsiella pneumoniae*. Kết quả cho thấy có 11 chủng *Klebsiella pneumoniae* (11%) mang gene bla_{NDM-1} , 2 chủng *Klebsiella pneumoniae* mang gen bla_{KPC} (2%), 2 chủng *Klebsiella pneumoniae* mang gen bla_{OXA-48} (2%).

Sự đề kháng với nhiều loại kháng sinh của nhiều loài vi khuẩn họ đường tiêu hóa, đặc biệt với *Klebsiella pneumoniae* thường do sự hiện diện của plasmid mang gen mã hóa cho enzyme KPC (Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase) hay NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase 1), OXA-48 (Oxacillinase) đề kháng với các cephalosporin, monobactam và carbapenem [13]. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng sự lan truyền các gen đề kháng này chủ yếu thông qua plasmid và transposon. Gen KPC được mang bởi transposon Tn4401a trên plasmid IncFII có kích thước 130 kb, trong khi đó, transposon Tn4401b lại mang các plasmid IncN (40 kb), IncL/M (50 - 60 kb) và hai plasmid chưa rõ có kích thước 20 và 50 kb. Trong số các plasmid mang transposon Tn4401, chỉ các plasmid IncFII là lan truyền được theo cơ chế tiếp hợp. Gen mã hóa cho NDM-1 hiện diện trên intergron nhóm I mang các gen kháng kháng sinh *arr-2* (kháng rifampicin), *ereC* (erythromycin), *aadA1* (gentamicin), *cmlA7* (chloramphenicol) và *qacE Δ* (sulphomamide) và có khả năng lan truyền sang cho các vi khuẩn khác [14].

4.2.2 Các chủng *Klebsiella pneumoniae* mang các gene *magA*, *rmpA* phân lập từ bệnh nhân

Những chủng *Klebsiella pneumoniae* mang các yếu tố độc lực như tạo ra vỏ nhầy, đặc biệt các chủng *Klebsiella pneumoniae* tạo vỏ nhầy ở mức rất cao (hypermucoviscosity) có khả năng xâm nhập cao hơn, gây các nhiễm trùng nặng hơn như áp xe gan, viêm nội mạc nhãn cầu... Gene *rmpA* và *magA* là hai gene đóng vai trò quan trọng trong điều chỉnh và biểu hiện của kiểu hình nhầy hypermucoviscosity và nhiễm trùng sinh mủ, nó ảnh hưởng đáng kể đến sự

hình thành áp xe [15].

Khảo sát đặc điểm gene về các yếu tố này trên các chủng *Klebsiella pneumoniae* có sẵn có 24 chủng *K. pneumoniae* có gene *rmpA* chiếm tỷ lệ 24% (24/100), 9 chủng gene *magA* chiếm tỷ lệ 9% (9/100). Trong đó có 15 chủng chỉ mang gene *rmpA* mà không mang *magA* và 9 chủng có mang cả hai gene *rmpA* và gene *magA*. Những chủng mang gene *rmpA* và *magA* tìm thấy tỷ lệ cao ở bệnh phẩm đàm, dịch phế quản, mủ, máu.

Một số nghiên cứu ở nước ngoài như Wen-Liang Yu và Wen-Chien Ko từ tháng 7 năm 2003 đến tháng 12 năm 2004, trong tổng số 151 chủng *K. pneumoniae* phân lập được từ 151 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết ở 2 trung tâm y tế lớn ở miền nam Đài Loan thì tỷ lệ *rmpA* và *magA* lần lượt là 48% (72/151) và 17% (26/151) [15].

5. KẾT LUẬN

Klebsiella pneumoniae đề kháng cao với các kháng sinh như penicillin 93%, cephalosporin thế hệ II 52,9%; cephalosporin thế hệ III 51%, cephalosporin thế hệ IV 39,3%, carbapenem 19%. 19 chủng *Klebsiella pneumoniae* đề kháng carbapenem CRKP (19%). *Klebsiella pneumoniae* đa kháng kháng sinh chiếm tỉ lệ cao. 43 chủng *Klebsiella pneumoniae* có ESBL (+), tập trung ở bệnh phẩm đàm, mủ, nước tiểu và tất cả các chủng có ESBL (+) đều đa kháng thuốc kháng sinh. Các chủng ESBL (+) có tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao hơn so với các chủng ESBL (-).

Trong 100 chủng *Klebsiella pneumoniae* khảo sát, tỷ lệ chủng có mang gen đề kháng kháng sinh bla_{NDM-1} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48} lần lượt là 11%, 2% và 2%.

Có 24% (24/100) chủng *Klebsiella pneumoniae* mang gene *rmpA*, 9% (9/100) chủng mang gene *magA*. Trong đó *rmpA* +/*magA*- là 15% (15/100), *rmpA*+/*magA*+ là 9% (9/100)), không có chủng nào *rmpA*-/*magA*+. Các *Klebsiella pneumoniae* mang *rmpA* và *magA* tập trung ở bệnh phẩm đường hô

hấp, máu, mủ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629–61.
2. Rimrang B, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Sribenjalux P, et al. Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing enterobacteriaceae in Thailand. J Antimicrob Chemother. 2012;67(11):2626–30.
3. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi

Z. Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. Curr Issues Mol Biol. 2014;17:11–21.

4. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009;9:228–36.

5. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2014;52(12):4377–80.

6. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P.

Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;

7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Doc M100-S16CLSI, Wayne, PA. 2015;35(3).

8. Bộ Y Tế. Hướng dẫn quy trình xét nghiệm Vi sinh lâm sàng. Hà Nội: NXB Y Học; 2017.

9. Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol*. 2011;

10. Zamani A, Mashouf RY, Namvar AME, Alikhani MY. Detection of magA gene in *Klebsiella* spp. isolated from clinical samples. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(2):173–6.

11. Phạm Thị Hoài An. Khảo sát sự kháng kháng sinh của *Klebsiella pneumoniae* trên bệnh phẩm phân lập được tại viện Pasteur, TP Hồ Chí Minh. *Tạp Chí Khoa Học*

ĐHSP TP Hồ Chí Minh. 2014;61:146–55.

12. Võ Công Đồng. Đặc điểm nhiễm trùng huyết do *K.pneumoniae* tại bệnh viện Nhi Đồng 2 năm 2000-2003. *Tạp Chí Y Học TP Hồ Chí Minh*. 2005;9(1):29–32.

13. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):682–707.

14. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046–54.

15. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, et al. Association between rmpA and magA genes and