

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

TRẦN MINH GIANG

**NGHIÊN CỨU TÁC NHÂN
VI KHUẨN GÂY VIÊM PHỔI THỞ MÁY
VÀ GENE KHÁNG THUỐC
BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ**

NGÀNH: HỒI SỨC CẤP CỨU VÀ CHỐNG ĐỘC

MÃ SỐ: 62720122

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS.TS. TRẦN VĂN NGỌC

THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH - NĂM 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được công bố ở bất kỳ nơi nào.

Tác giả luận án

Trần Minh Giang

MỤC LỤC

Trang

Trang phụ bìa	
Lời cam đoan	
Bảng từ viết tắt và đối chiếu thuật ngữ Anh – Việt	
Danh mục các bảng	
Danh mục các biểu đồ, sơ đồ	
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Định nghĩa.....	3
1.2. Tỷ lệ mới mắc của viêm phổi thở máy	5
1.3. Tỷ lệ tử vong.....	6
1.4. Bệnh nguyên.....	8
1.5. Các yếu tố nguy cơ.....	25
1.6. Chẩn đoán.....	28
1.7. Thực hiện kháng sinh đồ trên vi khuẩn phân lập được từ VPTM.....	29
1.8. Ứng dụng sinh học phân tử trong phát hiện gene kháng thuốc.....	30
Chương 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	32
2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	32
2.2. Địa điểm nghiên cứu	32
2.3. Thời gian nghiên cứu	32
2.4. Đối tượng nghiên cứu.....	32
2.5. Cỡ mẫu và công thức tính cỡ mẫu	32
2.6. Tiêu chuẩn chọn mẫu	33
2.7. Phương pháp tiến hành.....	34
2.8. Phương pháp phát hiện gene kháng thuốc.....	45
2.9. Thu thập số liệu và phân tích dữ liệu	45
2.10. Đạo đức trong nghiên cứu.....	46
2.11. Liệt kê và định nghĩa các biến số (phụ lục 11)	46

2.12. Sơ đồ nghiên cứu.....	47
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	48
3.1. Đặc điểm chung.....	48
3.2. Định danh vi khuẩn dựa trên vi sinh kính hiển.....	50
3.3. Định danh vi khuẩn dựa trên giải trình tự gene 16S-rRNA.....	51
3.4. Tổng số loài vi khuẩn phát hiện được trên từng mẫu dịch rửa phế quản phế nang.....	55
3.5. So sánh giữa giải trình tự gene 16S-rRNA và vi sinh kính hiển trong định danh vi khuẩn.....	56
3.6. Tính độ nhạy và độ đặc hiệu của PGM.....	58
3.7. Thời gian nằm ICU và tác nhân vi khuẩn gây viêm phổi thở máy.....	59
3.8. Kết quả kháng sinh đồ.....	60
3.9. Kết quả kháng sinh đồ MIC dựa trên E-test.....	66
3.10. Kết quả PCR tìm gene kháng thuốc.....	73
3.11. Kết quả điều trị.....	75
Chương 4: BÀN LUẬN	76
4.1. Định danh vi khuẩn.....	77
4.2. Kết quả kháng sinh đồ.....	91
4.3. Xác định gene kháng thuốc và mối liên quan với đề kháng kháng sinh.....	98
KẾT LUẬN	105
KIẾN NGHỊ	108
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

BẢNG VIẾT TẮT VÀ ĐỐI CHIẾU THUẬT NGỮ ANH - VIỆT

Từ viết tắt	Thuật ngữ tiếng Anh	Thuật ngữ tiếng Việt
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation	Thang điểm lượng giá bệnh lý cấp tính và mạn tính
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	Hội chứng nguy ngập hô hấp cấp
ATS	American Thoracic Society	Hội Lồng Ngực Hoa Kỳ
BA	Blood agar	Đĩa thạch máu
BAL	Bronchial-alveolar lavage	Rửa phế quản phế nang
BN		Bệnh nhân
Bp	Base pair	Cặp base
BVCR		Bệnh viện Chợ Rẫy
BVNDGD		Bệnh viện Nhân Dân Gia Định
CAHI	Chocolate agar <i>Haemophilus influenzae</i>	Thạch chocolate cho <i>Haemophilus influenzae</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ
CFU	Colony-Forming Unit	Đơn vị tạo khuẩn lạc
CMV	Cytomegalovirus	Virus cytomegalovirus
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính
CPIS	Clinical pulmonary infection score	Thang điểm viêm phổi lâm sàng
CRP	C - reactive protein	Protein C phản ứng
DRPQPN		Dịch rửa phế quản phế nang
EBM	Eosin methylene blue agar	Thạch eosin methylene blue
EPIC	The European Prevalence of Infection in Intensive Care	Tỉ lệ hiện mắc của nhiễm khuẩn ICU trên bệnh nhân Châu Âu
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamase	Men β -lactamase phổ rộng

Từ viết tắt	Thuật ngữ tiếng Anh	Thuật ngữ tiếng Việt
FiO2	Fraction of inspired oxygene	Phân suất oxy khí thở vào
HIV	Human immunodeficiency virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
ICU	Intensive care unit	Khoa săn sóc đặc biệt
IDSA	Infectious Diseases Society of America	Hội bệnh lý truyền nhiễm Hoa Kỳ
IQR	Interquartile range	Khoảng tứ phân vị
IVAC	Infection-related ventilator - associated complication	Biến chứng liên quan nhiễm khuẩn trên bệnh nhân thở máy
KIA	Kligler iron agar	Thạch kligler iron
KSD		Kháng sinh đồ
KTC	Confidence interval	Khoảng tin cậy
MA	MacKonkey agar	Thạch MacKonkey
MH	Mueller Hinton agar	Thạch Mueller Hinton
MIC	Minimal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MICU	Medical intensive care unit	Khoa ICU nội
MRSA	Methycillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Tụ cầu vàng kháng methycillin
MSSA	Methycillin-Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>	Tụ cầu vàng nhạy methycillin
NC		Nghiên cứu
NCBI	National center for biotechnology information	Trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học Hoa Kỳ
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
NKQ		Nội khí quản
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance System	Hệ thống khảo sát nhiễm khuẩn bệnh viện quốc gia Hoa Kỳ
NSPQ		Nội soi phế quản
NTNT		Ngưng tim ngưng thở

Từ viết tắt	Thuật ngữ tiếng Anh	Thuật ngữ tiếng Việt
OR	Odds ratio	Tỷ số số chênh
PCT	Procalcitonin	Procalcitonin
PEEP	Positive end-expiratory pressure	Áp lực dương cuối thì thở ra
PGM	Personal genome machine	Máy bộ gene cá thể
PK/PD	pharmacokinetic/pharmacodynamic	Dược động/dược lực
Possible	possible ventilator - associated	Có thể viêm phổi thở máy
VAP	pneumonia	
PPI	Proton pump inhibitors	Ức chế bơm proton
Probable	Probable ventilator - associated	Có thể có khả năng viêm
VAP	pneumonia	phổi thở máy
PSB	Protected Specimen Brush	Chải phế quản có nòng bảo vệ
RR	Risk ratio	Tỷ số nguy cơ
SaO ₂	Arterial oxygene Saturation	Độ bão hòa oxy động mạch
SICU	Surgical intensive care unit	Khoa hồi sức ngoại
SpO ₂	Pulse oximetric saturation	Độ bão hòa oxy theo mạch đập
SSDB		Săn sóc đặc biệt
TBMMN		Tai biến mạch máu não
THA		Tăng huyết áp
T ⁰		Nhiệt độ
VAC	Ventilator - associated condition	Biến chứng liên quan thở máy
VAE	Ventilator-associated event	Biến cố liên quan thở máy
VK		Vi khuẩn
VP		Viêm phổi
VPTM		Viêm phổi thở máy

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Tử suất thô theo điều trị kháng sinh ban đầu:.....	7
Bảng 1.2. Bệnh nguyên của viêm phổi thở máy:.....	8
Bảng 1.3. Tần suất vi khuẩn phân lập được từ ICU bệnh viện Fatmawati:.....	11
Bảng 1.4. Tần suất vi khuẩn phân lập được từ các bệnh nhân viêm phổi tại các khoa ICU ở Việt Nam:.....	12
Bảng 1.5.1. Tác nhân vi khuẩn phân lập được từ các bệnh nhân thở máy tại ICU bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh:.....	13
Bảng 1.5.2. Tác nhân vi khuẩn phân lập được từ các bệnh nhân thở máy tại ICU bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh (tiếp theo):.....	14
Bảng 1.6. Tính đa dạng của vi khuẩn phát hiện được bằng giải trình tự gene:.....	25
Bảng 1.7. Các yếu tố nguy cơ của VPTM:.....	26
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng tạo các amplicon - phản ứng tạo “bản sao” các vùng V3, V6, V7 và V9 trong gen 16S-rRNA:.....	38
Bảng 2.2. Thành phần hóa chất thêm vào dung dịch rửa trong việc tinh sạch phản ứng PCR khuếch đại các vùng V3, V6, V7 và V9 trong gene 16S-rRNA:.....	39
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng tạo amplicon hoàn chỉnh - tạo “đầu bằng” cho các bản sao của vùng V3, V6, V7 và V9 trong gene 16S-rRNA:.....	40
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng tạo “thư viện” - phản ứng gắn Adapter và trP1 vào 2 đầu các bản sao “đầu bằng” của vùng V3, V6, V7 và V9 trong gene 16S-rRNA:.....	40
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng tạo “bản sao” của các thư viện:.....	41
Bảng 2.6. Thành phần dung dịch sử dụng cho việc gắn “thư viện” gene vào hạt ISP:.....	42
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng chuẩn bị gắn “thư viện” gene vào hạt ISP:.....	43
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng tách mạch “thư viện” gene khỏi bản sao đã gắn trên hạt SP:.....	43
Bảng 3.1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân nghiên cứu:.....	49

Bảng 3.2. Phân bố vi khuẩn phân lập được bằng định danh truyền thống:.....	51
Bảng 3.3. So sánh hai phương pháp định danh vi khuẩn dựa vào nuôi cấy và giải trình tự trên hệ thống PGM:.....	57
Bảng 3.4. Độ nhạy và độ đặc hiệu của PGM:.....	58
Bảng 3.5. Kết quả kháng sinh đồ khuếch tán chung:.....	60
Bảng 3.6. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với <i>Acinetobacter</i> spp:.....	61
Bảng 3.7. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với <i>Klebsiella</i> spp:.....	62
Bảng 3.8. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với <i>Pseudomonas</i> spp:.....	63
Bảng 3.9. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với <i>Acinetobacter baumannii</i> :.....	66
Bảng 3.10. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với <i>K. Pneumoniae</i> :.....	67
Bảng 3.11. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :.....	68
Bảng 3.12. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với <i>Escherichia coli</i> :.....	69
Bảng 3.13. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với <i>Burkholderia cepacia</i> :.....	70
Bảng 3.14. Phân bố gene kháng thuốc phát hiện được:.....	73
Bảng 3.15. Mối liên quan giữa gene kháng thuốc và đề kháng kháng sinh:.....	74
Bảng 3.16. Kết quả người bệnh ra khỏi khoa chung:.....	75
Bảng 3.17. Kết quả điều trị:.....	75

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ, SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ tạo thư viện cho kỹ thuật NGS:.....	38
Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu:.....	47
Biểu đồ 3.1. Phân tích cụm trên 99 loài vi khuẩn định danh bằng giải trình tự 16S-rRNA:.....	53
Biểu đồ 3.2. Số loài vi khuẩn phát hiện được trên từng mẫu DRPQPN:	55
Biểu đồ 3.3. Mối liên quan giữa vi khuẩn phân lập được và số ngày nằm ICU:.....	59
Biểu đồ 3.4. Mạng lưới của đa kháng kháng sinh đối với <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> và <i>P. aeruginosa</i> :.....	65
Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ số kháng sinh bị đề kháng:.....	72

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm phổi thở máy (VPTM) là một vấn đề lâm sàng quan trọng không chỉ ở Việt Nam mà còn trên thế giới vì tần suất mắc bệnh và tử vong tăng cao. Nghiên cứu (NC) ở các nước Âu – Mỹ cho thấy tỉ lệ VPTM là 10% [61], [105]. Tại Canada, VPTM là 18 ca trên 1000 ngày thở máy [75]. Các quốc gia Á Châu VPTM là 18% [43]. Tại Việt Nam, VPTM dao động từ 20% - 52%, [2], [5], [7], [8], [11], [16], [17]. VPTM là nguyên nhân hàng đầu gây tăng tỉ lệ tử vong (26% - 72%), kéo dài thời gian nằm viện (41 so với 23 ngày ở nhóm có và không VPTM) và tăng chi phí điều trị (5 – 10 lần) [5], [41].

VPTM được định nghĩa là viêm nhu mô phổi xảy ra sau 48 giờ thở máy qua nội khí quản hoặc qua khai khí quản [42], [61]. Chẩn đoán VPTM được thiết lập dựa trên chứng cứ lâm sàng và vi sinh. Việc xác định vi khuẩn (VK) gây bệnh thông qua cấy định lượng hoặc bán định lượng đàm hút qua nội khí quản đơn thuần hoặc qua nội soi phế quản [34], [41], [50].

Việc định danh VK bằng nhuộm Gram, nuôi cấy, đặc tính mọc và các phản ứng sinh hóa là chuẩn mực. Tuy nhiên phương pháp vi sinh kinh điển này không thể áp dụng trong các trường hợp sau: VK Gram âm khó mọc, mọc chậm; VK hiếm hoặc chỉ biểu hiện một vài đặc tính về sinh hóa. Cũng như các VK yếm khí, VK không cấy được và bệnh lý nhiễm khuẩn có kết quả cấy âm tính, nhất là trên bệnh nhân (BN) sử dụng kháng sinh trước đó [50], [57], [73], [74], [83], [97], [114].

Chẩn đoán phân tử, ngày nay, đã trở thành phương pháp tham chiếu để chẩn đoán vi sinh học của nhiều bệnh lý hô hấp [73]. Vai trò của giải trình tự gene 16S - rRNA trong định danh VK càng được chứng tỏ và được áp dụng rộng rãi trên lâm sàng [57], [58], [80], [116], [117]. Phương pháp giải trình tự gene 16S - rRNA có thể phát hiện được hệ vi sinh trên đường hô hấp của người khỏe và BN [29], [44], [88]. Tại Việt Nam số liệu từ các NC về định danh VK dựa trên sinh học phân tử ở các BN VPTM chưa nhiều và chưa được hệ thống đầy đủ.

Ngày nay, VK đa kháng kháng sinh là một thách thức toàn cầu [58]. Đặc biệt là các quốc gia Á Châu, kể cả Việt Nam [12], [20], [59], [74], [78], [101]. Tỷ lệ *A. baumannii* kháng Carbapenem tăng lên nhanh chóng 6,7% (2001) [8]; 8% (2004) [17]; 80% (2010) [11]; 90% (2012) [5]. Tuy nhiên, kháng sinh đồ định lượng MIC bằng que E-test chưa được áp dụng rộng rãi và số liệu chưa được hệ thống đầy đủ.

Các VK mang gene SHV, TEM, IMP, OXA, NDM thủy phân phổ rộng các cephalosporin là thường gặp [81]. Trong nước, việc tiếp cận có hệ thống gene kháng thuốc của VK chính yếu gây VPTM chưa được ghi nhận và hệ thống hóa đầy đủ.

Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào áp dụng giải trình tự thế hệ mới trong việc xác định VK gây VPTM trên các mẫu dịch rửa phế quản phế nang. Chúng tôi đặt ra 3 câu hỏi nghiên cứu: (a) Có sự khác biệt nào trong định danh VK gây VPTM giữa hai phương pháp định danh VK dựa vào kiểu hình và giải trình tự gene 16S-rRNA; (b) Giá trị MIC và tỉ lệ đề kháng kháng sinh ở các nhóm VK gây VPTM phân bố như thế nào?; (c) Tỷ lệ VK chính yếu gây VPTM mang gene kháng thuốc là bao nhiêu và có mối liên quan giữa các VK mang gene kháng thuốc với MIC hay không? Trả lời những câu hỏi nghiên cứu trên sẽ cung cấp những kiến thức quan trọng về qui mô đề kháng kháng sinh và xác lập được những tác nhân liên quan đến VPTM, giúp cho việc điều trị BN tốt hơn.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Mục tiêu:

1. Xác định đặc điểm vi khuẩn gây viêm phổi thở máy bằng kỹ thuật giải trình tự gene 16S - rRNA, có so sánh với phương pháp định danh vi khuẩn dựa vào nhuộm Gram, nuôi cấy và các phản ứng sinh hóa.

2. Đánh giá MIC và tỉ lệ đề kháng kháng sinh ở các nhóm vi khuẩn gây viêm phổi thở máy.

3. Xác định gene kháng thuốc của vi khuẩn gây viêm phổi thở máy bằng kỹ thuật PCR và mối liên quan với MIC.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Định nghĩa

Viêm phổi thở máy (VPTM) được định nghĩa là viêm nhu mô phổi xảy ra sau 48 giờ thở máy qua nội khí quản hoặc qua khai khí quản [42], [61]. Ngay từ những thập niên đầu áp dụng thở máy xâm nhập đã có nhiều định nghĩa về VPTM. Từ những thập niên 70, Johanson đã áp dụng tiêu chuẩn chẩn đoán cho VPTM bao gồm thâm nhiễm mới hoặc tiến triển trên X-quang ngực; sốt; bạch cầu máu tăng và tăng tiết đàm mủ khí phế quản. Ngoài ra tác giả này còn đưa ra định nghĩa có thể có khả năng VPTM bao gồm sốt, tăng bạch cầu máu kèm theo hoặc thâm nhiễm mới hay tiến triển trên X-quang ngực hoặc hiện diện đàm mủ. Kết quả cấy vi sinh không được áp dụng trong bộ tiêu chí này [60]. Tiêu chuẩn chẩn đoán VPTM dựa vào mô học cũng được giới thiệu trong giai đoạn này. Các tiêu chí bao gồm tích tụ bạch cầu đa nhân trong màng phế nang mao mạch và số lượng VK $\geq 10^3$ cfu/g nhu mô phổi ở ít nhất một mẫu sinh thiết [47].

Từ khi giáo sư Shigeto Ekeda giới thiệu nội soi phế quản ống mềm, các nghiên cứu (NC) về VPTM dựa vào đó để tiếp cận chất tiết đường hô hấp dưới. Winberley áp dụng nội soi phế quản ống mềm và đề xuất tiêu chuẩn cho nội soi phế quản có nồng độ bảo vệ với ngưỡng 10^3 cfu/ml được gọi là dương tính [55], [108]. Đối với dịch rửa phế quản phế nang cần $\geq 10^4$ cfu/ml và dịch hút qua nội khí quản cần $\geq 10^5$ cfu/ml được gọi là dương tính [42]. Năm 1988, CDC đưa ra định nghĩa cho VP. Bộ tiêu chí được xây dựng dựa trên hệ thống khảo sát nhiễm khuẩn bệnh viện quốc gia Hoa Kỳ (NNIS1). Các tiêu chí bao gồm ran hoặc gõ đục ở phổi kèm theo các dấu chứng sau: (a) đàm mủ mới xuất hiện; (b) phân lập được vi sinh vật từ máu; (c) phân lập được tác nhân gây bệnh từ dịch hút khí quản, chải phế quản hoặc sinh thiết. Ngoài ra, CDC còn giới thiệu NNIS2 bao gồm thâm nhiễm mới hoặc tiến triển, đông đặc, tạo hang hoặc tràn dịch màng phổi trên X-quang ngực kèm theo ít nhất một trong ba tiêu chí (a), (b), (c) của NNIS1 ở trên [51].

Vào thập niên 90, Pugin giới thiệu thang điểm VP trên lâm sàng (CPIS) từ 0 đến 12 điểm bao gồm nhiệt độ; bạch cầu máu kể cả dạng non; đặc tính dịch tiết khí phế quản; nhuộm Gram và cấy đàm; PaO₂/FiO₂; X-quang ngực [84]. Năm 2005 ATS và IDSA đưa ra định nghĩa VPTM trên lâm sàng bao gồm: thâm nhiễm mới hoặc tiến triển trên X-quang ngực kèm theo hai trong ba tiêu chí sau: T⁰ > 38⁰C, bạch cầu tăng hoặc giảm và tăng tiết đàm mủ. Xác định tác nhân gây bệnh bằng cấy định lượng hoặc bán định lượng đàm hút qua nội khí quản hoặc nội soi phế quản. Tiêu chuẩn CPIS và CPIS hiệu chỉnh được khuyến áp dụng cho chẩn đoán VPTM [24]. Năm 2011 Craven đã đưa ra tiêu chuẩn chẩn đoán nhiễm khuẩn hô hấp liên quan thở máy (ventilator – associated respiratory infections: VARI), bao gồm các tiêu chí chẩn đoán VPTM như trên và viêm khí phế quản liên quan thở máy (ventilator – associated tracheobronchitis: VAT). Các tiêu chí viêm khí phế quản liên quan thở máy bao gồm các triệu chứng cơ năng, thực thể và thời gian thở máy giống như VPTM. Nhưng không có thâm nhiễm lan tỏa hay tiến triển ở hai phổi khi dựa vào hình ảnh X-quang hoặc CT ngực và bằng chứng vi sinh khi dựa vào tiêu chí chẩn đoán xâm lấn bằng nội soi phế quản tại giường [40], [86].

CDC 2014 đưa ra khái niệm biến cố liên quan thở máy (VAE) gồm *biến chứng liên quan thở máy, biến chứng liên quan nhiễm khuẩn trên BN thở máy, có thể VPTM, có thể có khả năng VPTM*. Trong đó, *biến chứng liên quan thở máy* (VAC) bao gồm sau hai ngày thở máy, BN có ít nhất một trong hai tiêu chí sau: (1) Tăng tiêu thụ oxy: tăng FiO₂ ≥ 20% mỗi ngày, liên tục trong hai ngày liên tiếp. (2) Tăng nhu cầu PEEP: tăng PEEP ≥ 3 cmH₂O mỗi ngày, liên tục trong hai ngày liên. *Biến chứng liên quan nhiễm khuẩn trên BN thở máy* (IVAC) bao gồm sau 3 – 4 ngày thở máy, BN có VAC kèm hai tiêu chí sau: (1) T⁰ > 38⁰C hoặc < 36⁰C, hoặc bạch cầu máu > 12.000/mm³ hoặc < 4.000/mm³. (2) Sử dụng kháng sinh ≥ 4 ngày liên. *Có thể VPTM* bao gồm sau 3 – 4 ngày thở máy, BN có VAC và IVAC kèm một trong các tiêu chí sau: (1) tăng tiết đàm mủ, (2) cấy đàm dương tính. *Có thể có khả năng VPTM* gồm sau 3 – 4 ngày thở máy, BN có VAC và IVAC kèm một trong các tiêu chí sau: (1) tăng tiết đàm mủ kèm cấy định lượng dương tính. Tiêu chí cho

cây định lượng bao gồm nếu đàm hút qua nội khí quản cần $\geq 10^5$ cfu/ml, đối với dịch rửa phế quản phế nang và mô phổi cần $\geq 10^4$ cfu/ml, còn tiêu chí chải phế quản có nồng độ bảo vệ chỉ cần $\geq 10^3$ cfu/ml. (2) Hoặc một trong các tiêu chí sau: (i) cây dương tính dịch màng phổi, (ii) cây dương tính mô bệnh học phổi, (iii) xét nghiệm dương tính với *Legionella* spp, xét nghiệm dương tính với virus từ dịch tiết phổi. Gần đây nhất, năm 2016 IDSA đưa ra hướng dẫn về VP như sau: thâm nhiễm mới trên phổi cùng với các bằng chứng lâm sàng chứng tỏ thâm nhiễm này có nguồn gốc từ nhiễm khuẩn. Các bằng chứng lâm sàng bao gồm: mới khởi phát sốt, mới tiết đàm mủ, mới tăng bạch cầu và mới giảm oxy hóa máu. VPTM được định nghĩa như là VP trên BN thở máy > 48 giờ sau đặt nội khí quản [61].

Nói tóm lại VPTM có thể được định nghĩa là viêm nhu mô phổi xảy ra sau 48 giờ thở máy qua nội khí quản hoặc qua khai khí quản [42], [61]. Mặc dù khái niệm rõ ràng như vậy, nhưng hơn năm thập niên qua liên tiếp có rất nhiều định nghĩa VPTM được ra đời như định nghĩa của CDC 2014, nhưng không có định nghĩa nào được chấp nhận rộng rãi toàn cầu. Thậm chí định nghĩa VPTM dựa vào các dấu hiệu mô học từ tử thiết cũng không được chắc chắn đồng thuận hoặc tán thành. VP thùy có thể bỏ sót, xét nghiệm VK học có thể cho kết quả âm tính mặc dù có sự hiện diện của VP, các nhà bệnh học có thể không đồng tình về các tiêu chuẩn đã được đưa ra [41]. Chính vì vậy, cho tới hôm nay tiêu chuẩn vàng cho chẩn đoán VPTM vẫn chưa có, sẽ có rất nhiều những NC mới đầy thuyết phục về lĩnh vực này ra đời trong tương lai [42], [61].

1.2. Tỷ lệ mới mắc của viêm phổi thở máy

Có rất nhiều NC trong và ngoài nước đã được thực hiện nhằm đánh giá tỷ lệ mới mắc của VPTM. Một NC cắt ngang tiến cứu đã thực hiện tại 1.417 trung tâm của 17 quốc gia Tây Âu (EPIC) nhằm đánh giá tỷ lệ lưu hành của VPTM ở các ICU [106]. Có 10.038 BN được đưa vào NC, trong đó 2.064 BN (21%) có nhiễm khuẩn mắc phải tại ICU, bao gồm VP chiếm 967 BN (47%), tỷ lệ bệnh lưu hành VP bệnh viện là 10%. NC này được lặp lại với qui mô toàn thế giới với tên gọi Extended

Prevalence of Infection in Intensive Care II (EPIC II), trên 13.769 BN, ở 1.265 ICU của 75 quốc gia [105]. Kết quả cho thấy 7.087 BN (51%) bị nhiễm khuẩn, trong đó VP chiếm 64%. Một NC khác thực hiện trên 576 BN thở máy, dùng ống soi mềm có nòng bảo vệ kèm cây đũa định lượng, kết quả cho thấy tỉ lệ VPTM là 9%. Tùy thuộc vào thời gian thở máy, nguy cơ cộng dồn của VPTM lần lượt là 7% và 19% tương ứng cho ngày thở máy thứ 10 và 20. Hơn nữa, trong NC này cho thấy nguy cơ VPTM tăng lên 1% cho mỗi ngày thở máy [41]. Ngược lại, theo Cook và cộng sự đã tiến hành NC trên 1.014 BN thở máy, nguy cơ cộng dồn cho VPTM tăng lên theo thời gian thở máy. Nguy cơ VP giảm đi từ ngày thứ 5 thở máy trở đi. Nguy cơ VP cho mỗi ngày thở máy như sau: trung bình 3%/ngày trong 5 ngày đầu thở máy, 2%/ngày vào ngày 10, và 1%/ngày vào ngày 15. Phân tích các yếu tố nguy cơ độc lập của VPTM dựa vào chẩn đoán ban đầu lúc nhập viện, bằng phân tích đa biến cho thấy kết quả sau đây. Nguy cơ tương đối và khoảng tin cậy 95% của VPTM do từng bệnh lý cho kết quả khác nhau. Như do bỏng, chấn thương và bệnh lý thần kinh trung ương lần lượt là (5,1; 5 – 17); (5; 1,9 – 13,1) và (3,4; 1,3 – 8,8). Do bệnh lý hô hấp và tim mạch là (2,8; 1,1 – 7,5) và (2,7; 1,1 – 7). Tương tự do dùng thuốc dẫn cơ và kháng sinh trước thở máy là (1,6; 1,1 – 2,4) và (0,4; 0,3 – 0,5). Tuy nhiên dùng kháng sinh càng lâu thì hiệu quả ngược lại [38]. Một NC được thực hiện bởi Chawla và cộng sự ở mười quốc gia Châu Á, kết quả cho thấy VPTM là 18% [43]. Các NC trong nước cho thấy VPTM dao động từ 20 đến 52% [7], [8], [11], [16].

1.3. Tỉ lệ tử vong

VPTM là nguyên nhân hàng đầu gây tăng tỉ lệ tử vong, kéo dài thời gian nằm viện. Mặc dù không ngừng cải thiện trong chăm sóc BN, áp dụng thật hiệu quả các phương pháp phòng ngừa VPTM. Nhưng tỉ lệ tử vong vì VPTM tăng cao gấp 10 lần hơn so với nhóm BN nằm ICU không có VPTM [103]. Thật khó có thể qui kết nguyên nhân nào là thủ phạm. Tuy nhiên một cách lý giải tương đối hợp lý là có phải phần lớn BN nằm ICU là những BN lớn tuổi, có nhiều bệnh nền kèm theo [41]. Tỉ lệ tử vong thô ở các ICU thay đổi từ 24 – 76% của BN VPTM (**Bảng 1.1**).

Bảng 1.1. Tử suất thô theo điều trị kháng sinh ban đầu

“Nguồn: Chastre (2006)” [41].

Tác giả	TLTK	ĐTKS K đầy đủ	ĐTKS đầy đủ	Giá trị P
Luna	[72]	92,2% (n=36)	37,5% (n=15)	< 0,00
Alvarez-Lerma	[23]	34,9% (n=146)	32,5% (n=284)	NS
Rello	[90]	63,0% (n=27)	41,5% (n=58)	0,06
Kollef	[63]	60,8% (n=51)	26,6% (n=79)	0,00
Sanchez-Nieto	[94]	42,9% (n=14)	25,0% (n=24)	NS
Ruiz	[93]	50,0% (n=18)	39,3% (n=28)	NS
Dupont	[46]	60,7% (n=56)	47,3% (n=55)	NS

Chú thích: TLTK: tài liệu tham khảo; ĐTKS: điều trị kháng sinh, NS: không xác định; K đầy đủ: không đầy đủ.

BN thở máy tại ICU bị VPTM có tỉ lệ tử vong tăng gấp từ 2 – 10 lần so với BN không có VP. Tỉ lệ tử vong chung ở các BN có VPTM và không có VPTM lần lượt là 55% so với 25% và 44% so với 19% [41]. Tầm quan trọng của điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm được phân tích ở một vài NC được tóm tắt ở (**Bảng 1.1**).

VP do *Pseudomonas* hoặc *Acinetobacter* có nguy cơ tử vong là 87% so với 55% do các VK khác [41]. Một NC thực hiện trên 1978 BN ở ICU, trong đó có 1118 BN thở máy. Các yếu tố được đưa vào phân tích như suy đa cơ quan, phân tầng nguy cơ theo tiêu chuẩn McCabe và Jackson về bệnh nền gây tử vong, ước lượng tử vong hoặc không tử vong, nhiễm khuẩn huyết và VP bệnh viện. Tất cả các yếu tố này là các yếu tố độc lập góp phần gây ra tử vong của BN thở máy [41]. Do đó, VPTM dường như liên quan với nguy cơ tử vong cao hơn 20 – 30% so với bệnh nền. Điều này biện minh cho việc tiếp cận mới nhằm cải thiện quản lý BN thở máy bao gồm các biện pháp phòng ngừa hiệu quả hơn, chẩn đoán sớm hơn, và điều trị tích cực hơn [41].

1.4. Bệnh nguyên

1.4.1. Định danh vi khuẩn dựa vào kiểu hình

Có nhiều yếu tố khác nhau ảnh hưởng đến các tác nhân gây VPTM. Tùy thuộc vào dân số NC ở từng ICU khác nhau, thời gian nằm viện cũng như thời gian nằm tại ICU và các phương pháp chẩn đoán chuyên biệt được sử dụng mà có kết quả vi sinh gây VPTM khác nhau. Ở nhiều NC cho thấy nhiễm khuẩn hô hấp là do VK Gram âm (**Bảng 1.2**).

Bảng 1.2. Bệnh nguyên của viêm phổi thở máy

“Nguồn: Chastre (2013)” [42].

Tác nhân gây VPTM	Tần suất (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,4
<i>Acinetobacter</i> spp.	7,9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,7
<i>Enterobacteriaceae</i>	14,1
<i>Haemophilus</i> spp.	9,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,4
<i>Streptococcus</i> spp.	8,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4,1
<i>Coagulase-negative staphylococci</i>	1,4
<i>Neisseria</i> spp.	2,6
VK yếm khí	0,9
Nấm	0,9
Khác (<1% cho mỗi nhóm)	3,8

Các NC nước ngoài cho thấy hơn 60% VPTM là do VK Gram âm hiếu khí. Gần đây, VK Gram dương gây ra VPTM có chiều hướng gia tăng đặc biệt là tụ cầu vàng. Trong NC EPIC có tới 31% nhiễm khuẩn bệnh viện do tụ cầu vàng [106]. Theo số liệu từ 24 NC cho thấy VPTM do VK Gram âm chiếm 58% [41]. VPTM gây ra do cùng nhiễm nhiều loại VK khác nhau cũng được ghi nhận như trong một NC trên 172 trường hợp nhiễm khuẩn bệnh viện, có tới 13% VP gây ra do đa VK [32]. Những bệnh nền mạn tính cũng có mối liên hệ dễ bị nhiễm một số loại VK đặc hiệu. Những BN COPD có nguy cơ cao nhiễm *H. influenzae*, *Moraxella* hoặc phế cầu; những BN xơ nang phổi tăng nguy cơ nhiễm *P. aeruginosa* và hoặc *S. aureus*.

Ngược lại ở những BN chấn thương, đặc biệt là chấn thương sọ não gia tăng nguy cơ nhiễm *S. aureus*. Còn ở những BN trải qua cuộc mổ thần kinh, chấn thương sọ não, VP do hít sặc có nguy cơ VPTM do *A. baumannii*. Ở những BN ARDS dễ bị VPTM do VK Gram âm và tụ cầu vàng kháng Methycilline (MRSA) [41].

Một số NC còn cho thấy tác nhân VK gây VPTM còn tùy thuộc vào thời gian thở máy tại ICU. Mặc dù có nhiều định nghĩa khác nhau về VPTM khởi phát sớm thay đổi từ 3-7 ngày, tỉ lệ cao nhiễm khuẩn do *H. influenzae*; *S. pneumoniae*; MSSA và *Enterobacteriaceae*. Ngược lại VPTM khởi phát trễ thường nhiễm VK có độc lực cao và đa kháng thuốc như *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, MRSA, và VK Gram âm đa kháng [41]. Sự phân bố các tác nhân khác nhau gây VPTM khởi phát sớm và muộn có mối liên quan đến việc sử dụng kháng sinh trước đó. Bằng phân tích hồi qui logistic stepwise cho thấy sự gia tăng tỉ lệ tử vong ở nhóm có dùng kháng sinh trước đó với OR = 9,2, $p < 0,0001$ [91]. Kết quả tương tự khi đưa ra một phân tích đa biến để xác định yếu tố nguy cơ VPTM do VK đa kháng như MRSA, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* và *S. maltophilia* trên 135 trường hợp VPTM. Kết cuộc chỉ có ba biến là có sự khác biệt như thời gian thở máy ≥ 7 ngày trước khi VPTM xuất hiện (OR = 60), trong khi sử dụng kháng sinh trước đó có OR = 13,5, đặc biệt sử dụng kháng sinh phổ rộng trước đó như cephalosporin thế hệ thứ ba, fluoroquinolones và/hoặc imipenem có OR = 4,1 [41], [42]. Tuy nhiên không phải tất cả các NC đều có kết quả tương tự như trên. Như trong một NC cho thấy VPTM

khởi phát sớm do *P. aeruginosa* (25%), MRSA (18%), và *Enterobacter* spp (10%), tương tự như VPTM khởi phát trễ [54].

Ngoài ra, tỉ lệ mới mắc của các VK đa kháng có mối liên hệ chặt chẽ với các yếu tố tại chỗ ở từng ICU, thay đổi từng ICU ở từng bệnh viện khác nhau. Chính vì vậy, mỗi ICU nên thu thập một cách cẩn thận, đầy đủ và liên tục số liệu dịch tễ nền về tình hình nhiễm khuẩn và đề kháng kháng sinh, đặc biệt là VPTM. Với những mục đích này, có sự thay đổi về bệnh nguyên VPTM trong ba trung tâm ICU ở Tây Ban Nha được phân tích và so sánh với số liệu tại Paris [104]. Các chủng *Legionella*, VK yếm khí, nấm và thậm chí *Pneumocystis carinii* cũng nên được xem xét đến khả năng gây ra VPTM. Tuy nhiên một vài tác nhân này cũng rất thường gặp nhưng thường ít để ý đến, phần vì khó khăn về mặt kỹ thuật trong định danh chính xác tác nhân này như VK yếm khí và vi rút [91].

Hơn nữa, tùy thuộc vào điều kiện của từng khoa vi sinh và mục tiêu của từng NC khác nhau, việc xác định chính xác tác nhân VK gây VPTM cho kết quả cũng khác nhau. Theo NC của Pierre Dore và cộng sự trên 415 BN từ ICU nội và ngoại [45]. Dịch tiết đường hô hấp dưới được chuyên chở cũng như nuôi cấy VK trong điều kiện đặc hiệu. Kết quả cấy có 39% (n = 191) dương tính với ít nhất một loại VK. Trong số 191 mẫu cấy dương, có 130 mẫu chẩn phế quản có nồng độ bảo vệ, trong đó có 100 BN (77%) chỉ phân lập được VK hiếu khí và 30 BN (23%) cấy dương với VK yếm khí. Có 42 loài VK yếm khí khác nhau và tỉ lệ nhiễm một, hai và ba loài cùng lúc lần lượt là 63%, 33% và 4%. Ngoài ra còn có 26 trường hợp đồng nhiễm VK yếm khí và hiếu khí và định danh được 13 loài VK yếm khí khác nhau. Bao gồm *Prevotella melaninogenica* 36%, *Fusobacterium nucleatum* 17%, *Veillonella parvula* 12%, *Prevotella oralis* và *Prevotella bivia* đều chiếm 7%. VPTM do VK yếm khí đặc biệt cao ở những BN thở máy sau 5 ngày [45].

Một NC cắt ngang khác dựa trên 385 BN ICU tại bệnh viện Fatmawati, Jakarta, Indonesia. Kết quả cho thấy phân lập được 249 VK chia thành 20 loài khác nhau (**Bảng 1.3**) [89].

Bảng 1.3. Tần suất vi khuẩn phân lập được từ ICU bệnh viện Fatmawati
 “Nguồn: Maksun Radji, 2011” [89].

Vi khuẩn	N (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66 (26,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38 (15,3)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	37 (14,9)
<i>Enterobacter aerogeneses</i>	32 (13,3)
<i>Klebsiella ozaenae</i>	21 (8,4)
<i>Escherichia coli</i>	13 (5,2)
<i>Staphylococcus liquifaciens</i>	10 (4,0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (3,2)
<i>Klebsiella spp</i>	5 (2,0)
<i>Serratia marcessens</i>	4 (1,6)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3 (2,1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (0,8)
<i>Enterobacter spp.</i>	2 (0,8)
<i>Streptococcus group A</i>	1 (0,4)
<i>Pseudomonas putida</i>	1 (0,4)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (0,4)
<i>Klebsiella terrigena</i>	1 (0,4)
<i>Proteous mirabilis</i>	1 (0,4)
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	1 (0,4)
<i>Burkholderia cepacia</i>	1 (0,4)

Các NC trong nước cho thấy hầu hết tác nhân VK phân lập được là các trực khuẩn Gram âm. Một NC trên 15 ICU người lớn trên toàn quốc, cho thấy tỉ lệ hiện mắc của nhiễm khuẩn là 29,5%, trong đó VP chiếm 79,4%. Trên tổng số 587 vi sinh vật gây VP tại ICU phân lập được có 575 là VK (10 là vi nấm) (**Bảng 1.4**) [87]. Ba tác nhân VK phổ biến nhất là *Acinetobacter*, *Pseudomonas* và *Klebsiella* chiếm 63,5%. Với ba VK này đề kháng carbapenem lần lượt là 89,2%, 55,7% và 14,9%.

Bảng 1.4. Tần suất vi khuẩn phân lập được từ các bệnh nhân viêm phổi tại các khoa ICU ở Việt Nam. “Nguồn: Vũ Đình Phú, 2016” [87]

Vi khuẩn Gram âm	N (%)
<i>Acinetobacter</i> spp	197 (33,5)
<i>Klebsiella</i> spp	112 (19,1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92 (15,7)
<i>Enterobacteriaceae</i>	26 (4,4)
<i>Providencia</i> spp	25 (4,3)
<i>Escherichia coli</i>	20 (3,4)
<i>Achromobacter</i> spp	17 (2,9)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6 (1,0)
Các trực khuẩn Gram âm khác	17 (2,9)
Các cầu khuẩn Gram âm khác	4 (0,7)
Các VK Gram dương	5 (2,0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	28 (4,8)
<i>Staphylococcus</i> spp	11 (1,9)
<i>Streptococcus</i> spp	9 (1,5)
<i>Enterococcus</i> spp.	9 (1,5)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (0,3)
Các trực khuẩn Gram dương khác	6 (1,0)

Một NC dựa trên 374 BN của bốn ICU có 37/374 (9,9%) BN thỏa VPTM và 55/375 (14,7%) BN thỏa viêm khí phế quản liên quan thở máy [86]. Như vậy tổng số có 92/374 (24,6%) các trường hợp thỏa tiêu chuẩn chẩn đoán nhiễm khuẩn hô hấp liên quan thở máy. Ba tác nhân VK phân lập được phổ biến nhất là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* chiếm 82/108 (76%) . Cũng với ba VK này có tỉ lệ đề kháng với carbapenem lần lượt là 84,4%, 23,1% và 45,8%.

Các NC trong nước khác cho thấy các VK phân lập được từ các BN nghi ngờ VPTM trên lâm sàng hầu hết là VK Gram âm. Nhưng có một điều chung là có sự thay đổi về trật tự các tác nhân VK phân lập được. Qua tổng kết 11 năm tại bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh, ba tác nhân VK gây VPTM thường gặp là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* (bảng 1.5.1 và 1.5.2) [79].

Bảng 1.5.1. Tác nhân vi khuẩn phân lập được từ các bệnh nhân thở máy tại ICU bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh
“Nguồn: Nguyen Thi Khanh Nhu (2014)” [79].

Vi khuẩn	2000	2001	2002	2003	2004	2005
	N (%)					
<i>Acinetobacter</i> spp	6 (35,3)	17 (27,9)	19 (23,2)	20 (25,3)	32 (27,1)	14 (38,9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 (29,4)	13 (21,3)	24 (29,3)	18 (22,8)	19 (16,1)	3 (8,3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 (23,5)	20 (32,8)	22 (26,8)	26 (32,9)	36 (30,5)	11 (30,6)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0 (0,0)	5 (8,2)	8 (9,8)	1 (1,3)	3 (2,5)	1 (2,8)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (11,8)	3 (4,9)	3 (3,6)	2 (2,5)	8 (6,8)	2 (5,6)
Khác	0 (0,0)	3 (4,9)	6 (7,2)	10 (12)	20 (17)	5 (13,9)

Bảng 1.5.2. Tác nhân vi khuẩn phân lập được từ các BN thở máy tại ICU bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh (tiếp theo).

“Nguồn: Nguyen Thi Khanh Nhu (2014)” [79].

Vi khuẩn	2006	2007	2008	2009	2010
	N (%)				
<i>Acinetobacter</i> spp	16 (27,1)	16 (27,1)	12 (23,1)	19 (34,6)	35 (45,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6 (10,0)	11 (18,6)	4 (7,7)	7 (12,7)	8 (10,4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21 (35,0)	13 (22,0)	12 (23,1)	12 (21,8)	9 (11,7)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0 (0,0)	2 (3,4)	2 (3,9)	0 (0,0)	2 (2,6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (15,0)	4 (6,8)	5 (9,6)	9 (16,6)	7 (7,8)
Khác	8 (13,3)	13 (22,1)	17 (32,9)	8 (14,5)	17 (22,1)

Một NC khác thực hiện tại ICU bệnh viện Thống Nhất thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả cho thấy phân lập được năm loại VK là *P. aeruginosa* (38,1%), *Klebsiella* spp (22,8%) và *A. baumannii* (18,5%), *S. aureus* (13,2%), *E. Coli* và *Enterobacter* spp đều chiếm (3,7%) [7].

NC gần đây tại ICU và Hồi Súc Ngoại Thần Kinh bệnh viện Chợ Rẫy trên 159 BN. Kết quả cho thấy phân lập được 57 chủng VK bao gồm *A. baumannii* (61,7%), *S. aureus* (27,7%), *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* và *E. coli* [16].

Một NC thực hiện tại ICU nội bệnh viện Nhân Dân Gia Định từ tháng 1 đến tháng 9 năm 2011, trên 87 BN thỏa tiêu chuẩn VPTM trên lâm sàng. Tất cả BN được nội soi phế quản tại giường và cấy đàm định lượng. Với ngưỡng $\geq 10^4$ cfu/ml được áp dụng để phân định VK gây bệnh và VK thường trú. Kết quả cho thấy phân

lập được 26 VK chia thành bốn loại, trong đó *A. baumannii* thường gặp nhất chiếm tỉ lệ 69,3% (n = 18), *K. pneumoniae* 11,5% (n = 3), *Enterobacter* spp 11,5% (n = 3) và *P. aeruginosa* 7,7% (n = 2) [5].

Như vậy dựa vào định danh VK theo phương pháp kinh điển bằng nhuộm Gram, nuôi cấy, đặc tính mọc của quần thể VK và các phản ứng sinh hóa. Các tác nhân VK phân lập được phần lớn là các VK hiếu khí, dễ mọc. Trong đó các VK Gram âm chiếm phần lớn các tác nhân VK gây VPTM trong nhiều thập niên qua. Nhất là các NC trong nước, kể cả các NC đa trung tâm trên toàn quốc cho thấy ba tác nhân VK phổ biến nhất là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*.

1.4.2. Định danh vi khuẩn dựa trên sinh học phân tử

Chẩn đoán vi sinh là một việc làm hết sức quan trọng trong điều trị VPTM. Nhiều NC đã chứng minh điều trị kháng sinh trúng đích, sớm, hợp lý cải thiện được tử vong. Tác nhân VK gây VPTM tùy thuộc vào đặc tính VK hiện hành và tính đề kháng kháng sinh tại chỗ. Do đó đòi hỏi có một chẩn đoán nhanh, chính xác để giúp thiết lập điều trị hợp lý nhất.

Nhìn chung hiện nay, có hai phương pháp chính yếu để thiết lập chẩn đoán vi sinh cho VPTM. Các phương pháp đã được kiểm chứng cho chẩn đoán VPTM là cấy định lượng hoặc bán định lượng. Gần đây, các phương pháp mới dựa trên phân tử để định danh tác nhân VK đường hô hấp đã được sử dụng và thương mại hóa [73], [76]. Mục đích cuối cùng của các phương pháp này là cung cấp một chẩn đoán chính xác, nhanh và đáng tin cậy ở mức tối đa. Phát hiện được nhiều tác nhân gây bệnh mà không làm giảm độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp xét nghiệm. Theo kinh điển, định danh VK tại các khoa vi sinh lâm sàng chủ yếu dựa vào kiểu hình cơ bản bao gồm: nhuộm Gram, nuôi cấy, đặc tính mọc, và các xét nghiệm sinh hóa. Các xét nghiệm này tương đối rẻ tiền và phát hiện chính xác hầu hết tác nhân VK thông thường trên lâm sàng [97].

Tuy nhiên trong một số trường hợp sau, vi sinh kinh điển không thể đáp ứng được cho lâm sàng. Các VK Gram âm khó mọc, VK mọc chậm (hàng tuần), VK

yếm khí, các VK hiếm hoặc các VK chỉ biểu hiện một vài đặc tính về sinh hóa, các VK không cấy được và bệnh lý nhiễm khuẩn có kết quả cấy âm tính, nhất là trên BN đã sử dụng kháng sinh trước đó.

Các phương pháp chẩn đoán dựa trên phân tử cho kết quả nhanh, phát hiện một lượng rất nhỏ trình tự đích, thực hiện độc lập từng vi sinh vật mục tiêu, ít ảnh hưởng lên kết quả do sử dụng kháng sinh trước đó. Hơn nữa sinh học phân tử còn phát hiện đột biến gene kháng thuốc, và có khả năng phát hiện các VK khó mà các phương pháp vi sinh kinh điển không thể định danh được (97). Nhờ những ưu điểm này, các phương pháp định danh VK dựa trên a-xít nucleic có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn vi sinh kinh điển. Tuy nhiên việc phân định giữa VK thường trú ở đường hô hấp dưới với VK gây bệnh không phải dễ dàng. Do đó vai trò của các phương pháp chẩn đoán dựa trên phân tử cũng không ngừng phát triển [71], [97].

Lý do và mục đích của sinh học phân tử: đặc điểm vi sinh của VK gây VPTM rõ ràng khác với VK gây VP mắc phải ngoài cộng đồng. Những năm gần đây, chưa ghi nhận thay đổi đáng kể nào về tác nhân VK gây VPTM. Các tác nhân điển hình thường gặp như: VK Gram dương: *S. aureus*, MRSA; trực khuẩn Gram âm không lên men: *P. aeruginosa* và *Acinetobacter* spp; nhóm VK đường ruột: *E. coli*, *Klebsiella* spp và *Enterobacter* spp. *S. pneumoniae* và *H. influenzae* gây VPBV chiếm tỉ lệ thấp (<5%) [65], [80].

Các phương pháp chẩn đoán phân tử: các phương pháp áp dụng dựa trên a-xít nucleic đang và tiếp tục được sử dụng phổ biến nhất trong chẩn đoán các bệnh lý nhiễm khuẩn. Chúng đã trở thành phương pháp tham chiếu để chẩn đoán vi sinh học của nhiều bệnh lý hô hấp. Các phương pháp này vượt trội hơn các phương pháp vi sinh kinh điển [62], [73], [80]. Các kỹ thuật phân tử trong chẩn đoán nhiễm khuẩn hô hấp được tập trung vào hệ thống phát hiện đa môi. PCR khuếch đại các a-xít nucleic thường được áp dụng. Nhưng real-time PCR đa môi và dán nhãn các đầu dò, đặc biệt gần đây hơn là phổ khối (Mass Spectrometry: MS) như: MALDI-TOF MS và ESI MS (electrospray ionization) thường được áp dụng [17], [116].

Từ kết quả PCR và khuếch đại giải trình tự gene thông dụng là một kỹ thuật cao được áp dụng hơn hai thập kỷ qua. Về mặt lý thuyết là cung cấp cách giải quyết vấn đề định danh VK đem đến kết quả nhanh chóng, có tính lặp lại và độ tin cậy cao, ngay cả VK hiếm hoặc mọc chậm [62]. Trong số các NC về gene mục tiêu, thì gene 16S-rRNA được dùng rộng rãi nhất. Gene này đóng vai trò quan trọng cho việc định danh VK cho vi sinh lâm sàng. PCR và giải trình tự gene 16S-rRNA cho thấy tính hữu dụng chuyên biệt trong định danh VK thường gặp, VK hiếm, VK mọc chậm, VK không thể cấy được và các bệnh lý nhiễm khuẩn cho kết quả cấy âm tính. Áp dụng kỹ thuật cao này trong chẩn đoán VK học không chỉ cung cấp chẩn đoán bệnh nguyên về bệnh truyền nhiễm mà còn hỗ trợ chọn lựa cũng như thời gian dùng kháng sinh và công tác kiểm soát nhiễm khuẩn thật hiệu quả. Hơn nữa, sinh học phân tử giúp sự hiểu biết tốt hơn về dịch tễ và bệnh học của VK hiếm hoặc VK không thể định danh được bằng các xét nghiệm kiểu hình cơ bản [62].

Ngoài định danh VK, giải trình tự gene 16S-rRNA khám phá nhiều loài VK mới. Mặc dù đã thấy được các tiện ích rõ ràng của giải trình tự gene 16S-rRNA trong định danh VK, nhưng vẫn còn một số các hạn chế trong việc phân tích giải trình tự gene 16S-rRNA để định danh một số nhóm VK. Trong những tình huống này cần có các xét nghiệm về kiểu gene và kiểu hình thêm nữa để xác định loài chính xác hơn. Hơn nữa, các nhà vi sinh học cũng có thể áp dụng gene mục tiêu thay thế khác ngoài gene 16S rRNA. Các kỹ thuật giải trình tự tốc độ cao mới và giải trình tự toàn bộ gene của một VK có thể cho phép khám phá ra các phương pháp định danh VK trong vi sinh học chẩn đoán [62]. Các đặc tính này hoàn toàn có thể thực hiện được trên hệ thống Ion Torrent PGM cũng như các hệ thống khác.

1.4.2.1. Giải trình tự gene 16S-rRNA cho định danh vi khuẩn

Carl Woese và các tác giả khác khám phá trình tự gene rRNA nhỏ được bảo tồn vào những năm 1970. Từ đó mở ra một kỷ nguyên mới cho NC của tiến hóa và phân loại vi sinh vật sống [99]. Nói chung các trình tự gene rRNA này được bảo tồn cao trong các sinh vật sống cùng giống và loài. Các NC phát sinh loài sử dụng các trình tự gene rRNA này đã tái khám phá ba vùng của sự sống sinh vật đơn bào, VK

và sinh vật có nhân hoàn chỉnh. Trái với phân loại sinh vật sống cổ điển chỉ có hai loại: sinh vật đơn bào và sinh vật có nhân hoàn chỉnh [99].

Với phát minh ra PCR và giải trình tự DNA tự động từ những năm 1990, giải trình tự gene 16S-rRNA áp dụng rộng rãi cho khảo sát phát sinh loài và được coi là một tiêu chuẩn mới trong định danh và phân loại VK. Từ đó các nhà khoa học đã tạo ra một dữ liệu lớn về giải trình tự gene 16S rRNA. Và cũng từ đây đã phát hiện ra các loài mới, tái phân loại và tên gọi của các giống và loài không chính xác trước đây. Hơn nữa, phân loại VK không thể cậy được là điều có thể làm được. Trong thập kỷ qua, các dự án giải trình tự bộ gene VK đã hoàn tất cho phép các NC về phát sinh loài VK bằng cách sử dụng nhiều gene khác nhau và toàn bộ bộ gene [96]. PCR và giải trình tự đã phát triển nhanh chóng, nhờ vậy giải trình tự gene 16S-rRNA đã tạo đột phá trong khâu định danh VK trực tiếp từ các mẫu bệnh phẩm sinh học cũng như các VK đã phân lập từ khoa vi sinh lâm sàng [100].

1.4.2.2. Định danh vi khuẩn thường quy tại các khoa vi sinh lâm sàng

Thông thường các xét nghiệm kiểu hình cơ bản có khả năng định danh chính xác một số VK. Áp dụng thường quy giải trình tự gene 16S-rRNA tại các khoa vi sinh lâm sàng đã khu trú trong các tình huống mà vi sinh kinh điển không thể định danh bằng kiểu hình thông thường. Tuy nhiên nhiều NC đã được tiến hành nhằm mục đích đánh giá tính hữu dụng của giải trình tự gene 16S-rRNA trong định danh các VK quan trọng trên lâm sàng. Từ đó cho phép so sánh với các phương pháp vi sinh kinh điển. Tùy thuộc vào nhóm VK NC và tiêu chuẩn xác định loài, tỉ lệ thành công của định danh VK bằng giải trình tự 16S-rRNA từ 62 – 92 % [31], [99].

Giải trình tự gene 16S-rRNA đã cho thấy tính hữu dụng đặc biệt trong định danh một số nhóm VK. Một trong những điển hình là trực khuẩn Gram dương yếm khí. Đây là nhóm VK rất khó để định danh bằng phương pháp thông thường thậm chí ở mức giống, đặc biệt ở những BN nhiễm khuẩn huyết [68]. Do đó tỉ lệ lưu hành và đặc tính sinh bệnh học của VK yếm khí thường bị bỏ qua. Nhưng phương pháp giải trình tự lại phát hiện tốt các tác nhân này. Hai loài *Eggerthella* mới, được phân

loại mới dưới giống *Paraeggerthella*, đã được khám phá và có thể chiếm 50% các trường hợp nhiễm khuẩn huyết [69].

Một nhóm VK khác cũng dễ dàng định danh bằng giải trình tự gene 16S-rRNA là cầu khuẩn Gram dương có catalase âm tính [66]. Dùng giải trình tự 16S-rRNA, tất cả 6 trường hợp viêm nội tâm mạc do nhiễm *S. milleri* trong một NC đã tìm thấy được tác nhân *S. anginosus* [112]. Sử dụng giải trình tự gene 16S-rRNA ở các VK không xác định trên lâm sàng có ý nghĩa tiên lượng và ảnh hưởng tác động đến điều trị cho BN trên thực tế lâm sàng [115].

Giải trình tự gene 16S-rRNA có thể định danh chính xác nhiều chủng *Haemophilus* từ các bệnh phẩm lâm sàng. Các loài VK Gram âm như: *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* và *Campylobacter* đôi khi không thể định danh chính xác bằng phương pháp kiểu hình thông thường, nhưng giải trình tự gene 16S-rRNA có thể rất có ích trong việc định danh các loài VK này [65].

1.4.2.3. Định danh vi khuẩn hiếm và vi khuẩn có kiểu hình bất thường

Ngoài việc phân lập các VK gây bệnh thường gặp, các nhà vi sinh lâm sàng đối mặt ngày càng nhiều VK hiếm và các VK có kiểu hình bất thường. Giải trình tự gene 16S-rRNA cho thấy định danh > 90% và 65% - 83% ở mức độ giống và loài VK [77]. Hệ thống MicroSeq chứa 500 bp có thể định danh ở mức độ loài tới 81% các trường hợp thất bại trong định danh dựa trên phản ứng sinh hóa. Đối với các trực khuẩn Gram âm có kiểu hình bất thường, hệ thống này định danh ở mức độ loài lên tới 89,2% [114]. Giải trình tự gene 16S-rRNA trên các VK hiếm và có kiểu hình bất thường như các trường hợp nhiễm khuẩn do xâm nhập bởi *Streptococcus iniae* ở các nước Á Châu được chẩn đoán tốt bằng giải trình tự gene 16S-rRNA [98].

1.4.2.4. Định danh vi khuẩn mọc chậm và vi khuẩn không thể cấy

Giải trình tự gene 16S-rRNA định danh chính xác loài *Mycobacterium* nhanh chóng [82]. Tuy nhiên định danh *mycobacteria* bằng giải trình tự 16S-rRNA có thể bị hạn chế vì các loài có trình tự giống nhau. Khi đó gene mục tiêu để định danh có thể được chỉ định bằng một gene khác [113]. Một trường hợp điển hình là nhiễm

Mycobacterium leprae, tác nhân gây bệnh phong rất khó chẩn đoán. Áp dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự gene 16S-rRNA từ mẫu sinh thiết da của BN mắc bệnh phong cũng là phương tiện để chẩn đoán [85]. Bệnh Wipple được mô tả lần đầu tiên vào năm 1907, nhờ vào kỹ thuật PCR và giải trình tự 16S-rRNA đã xác định được tác nhân gây bệnh là *Tropheryma whippeli* [107].

1.4.2.5. Các hướng dẫn để diễn giải kết quả giải trình tự gene 16S-rRNA

Mặc dù việc sử dụng giải trình tự gene 16S-rRNA để định danh VK tại các khoa vi sinh lâm sàng ngày càng tăng, nhưng chưa có một hướng dẫn nào được chấp nhận rộng rãi cho chỉ định và lý giải số liệu của giải trình tự. Ngoài ra, còn một vài hạn chế trong định danh một số loài VK, mức độ hạn chế này cao hơn khi gặp phải sự phân loại các loài phức tạp. Một số lượng lớn trình tự gene 16S-rRNA trong cơ sở dữ liệu chưa được kiểm chứng. Giải trình tự gene 16S-rRNA có thể định danh được hầu hết các loài VK. Tuy nhiên một số loài VK khó có thể không định danh được bằng trình tự gene 16S-rRNA, cũng nên tìm gene mục tiêu khác. Theo như phân tích trình tự được đề cập thì độ dài và chất lượng của trình tự là quan trọng nhất. Việc chọn lựa chương trình và dữ liệu phù hợp để phân tích cộng thêm lý giải hợp lý thì kết quả sẽ đáng tin cậy [57].

Theo như các NC trước đây cho thấy độ dài tối thiểu của gene 16S-rRNA chứa 500 – 525 bp là tương đối đủ bao phủ được nhiều vùng 5'. Tuy nhiên cũng có các khuyến cáo là giải trình tự toàn bộ gene 16S-rRNA, nhất là đối với các VK khó định danh như các loài *Campylobacter* [57]. Một khó khăn lớn và vẫn còn tranh cãi trong việc lý giải dữ liệu trình tự gene 16S-rRNA là thiếu giá trị ngưỡng hay điểm cắt để phân định giữa các loài. Khi đó mức độ đa dạng về trình tự khác nhau đã được tìm thấy trong các loài khác nhau tùy thuộc vào tốc độ tiến hóa của từng loài. Tại ngưỡng tương đồng > 97% được cho là sự tiến hóa của loài. Trong khi đó dấu hiệu để xác định một loài mới khi có > 0,5% trình tự khác biệt. Do đó, có nên chăng cần các ngưỡng khác nhau áp dụng cho từng nhóm VK khác nhau? Một đề xuất đã

được đưa ra là ở ngưỡng tương đồng $> 99\%$ là để phân loại được loài. Còn phân biệt giống chỉ cần $> 97\%$ là chấp nhận được [57], [99].

Một vấn đề thường gặp khác là khi hai loài VK chia sẻ nhau trình tự gene 16S-rRNA giống nhau cực cao, chỉ khác nhau $< 0,5 - 1\%$. Đây là chuyện không phải dễ để đi đến quyết định loài mới (first hit) hay cùng loài (closest match). Nếu các nhà vi sinh không để ý tới điều này thì dễ dàng đưa ra kết luận không chính xác trong định danh loài. Để giải quyết mối quan ngại này, có rất nhiều NC đã thực hiện để đánh giá một cách có hệ thống. Các NC này thực hiện giải trình tự 527 - bp và toàn bộ đoạn gene 16S-rRNA. Dữ liệu này có sẵn trong MicroSeq để định danh tất cả VK quan trọng trên lâm sàng đã liệt kê trong cuốn sổ tay vi sinh lâm sàng[102], [109]. Theo hướng dẫn này mỗi loài VK quan trọng trên lâm sàng được phân loại theo từng ngưỡng khác nhau. Nếu như trình tự gene 16S-rRNA khác nhau $> 3\%$ coi như là loài VK khác. Nếu như khác nhau $< 2\%$ coi như xác định được VK cùng loài. Còn nếu như trình tự khác nhau $2 - 3\%$, xác định loài VK trong phạm vi nghi ngờ, cần xét nghiệm khác như giải trình tự 1.500 -bp hay gene mục tiêu khác.

Phân tích dựa trên MicroSeq, lý do thất bại xác định loài VK cũng được đặt ra [109]. Theo các tiêu chuẩn liệt kê trên, giải trình tự 527 - bp và toàn bộ đoạn gene 16S-rRNA có thể xác định được: 52- 63% trong 130 trường hợp trực khuẩn Gram dương yếm khí. Đối với các trực khuẩn Gram âm yếm khí phương pháp này xác định được 72 - 73% trong 86 trường hợp và 78% trong 23 trường hợp cầu khuẩn yếm khí. Thật ngạc nhiên khi MicroSeq chỉ có khả năng định danh được 19 - 25% trong 130 trường hợp trực khuẩn Gram dương yếm khí, 38% trong 86 trường hợp trực khuẩn Gram âm yếm khí, 39% trong 23 trường hợp cầu khuẩn Gram dương yếm khí. Đối với các VK Gram dương hiếu khí quan trọng trên lâm sàng, giải trình tự 527 bp và toàn bộ đoạn gene 16S-rRNA có thể định danh được 24 - 40 % cầu khuẩn Gram dương; 21 - 34 % trực khuẩn Gram dương. Ngược lại phân tích dựa trên MicroSeq có thể định danh được 15 - 34 % cầu khuẩn Gram dương và 14 - 25 % trực khuẩn Gram dương tới mức độ loài [110].

Các phương pháp và nguồn dữ liệu này không mang lại lợi ích nhiều cho định danh *Staphylococcus* và *Norcadia*. Ngược lại chúng rất có lợi trong định danh *Bacillus* và các loài liên quan. Giải trình tự 527 bp và toàn bộ đoạn gene 16S-rRNA trên các VK Gram âm hiếu khí quan trọng trên lâm sàng có thể định danh được 26,1% và 32,6% các VK này. Ngược lại phân tích dựa trên Microseq có thể định danh được 15,2% và 26,1% các VK Gram âm hiếu khí này [102]. Ngoài ra các phương pháp và dữ liệu này cũng không mang lại lợi ích nhiều cho định danh các chủng *Aeromonas*, *Bordetella* và *Bartonella*. Nhưng chúng rất có ích cho định danh các loài *Pasteurellaceae*, *Legionellaceae* và *Campylobacter*. Giải trình tự 527 bp và toàn bộ đoạn gene 16S-rRNA có độ tin cậy cao hơn đáng kể trong định danh các VK Gram âm và Gram dương yếm khí so với hiếu khí.

Tất cả ba NC trên cho thấy khả năng định danh kém của MicroSeq là do dữ liệu không được cập nhật trình tự các loài mới. Tuy nhiên, các hướng dẫn và NC tương đồng giúp lý giải dễ hơn về dữ liệu trình tự cho các kỹ thuật viên không có nhiều kinh nghiệm trong các khoa vi sinh lâm sàng. Đây là nền tảng ứng dụng giải trình tự gene 16S-rRNA cho phân lập VK trước khi chúng được chọn để phân tích [99].

1.4.2.6. Giải trình tự gene 16S-rRNA tự động

Một trong những trở ngại để đưa giải trình tự gene 16S-rRNA sử dụng thường qui tại các khoa vi sinh lâm sàng là do thiếu kỹ thuật tự động. Ngày nay các xét nghiệm kiểu hình cơ bản vẫn được áp dụng thường qui. Các xét nghiệm này trở nên thân thiện với các kỹ thuật viên để định danh VK tại các khoa vi sinh lâm sàng. Hơn nữa sự hiện diện của hệ thống định danh tự động dựa trên các giếng phản ứng sinh hóa đã được thương mại hóa và có sẵn. Mặt khác, các bước li trích DNA, PCR và giải trình tự đều tách rời nhau và thao tác bằng tay. Do đó mà giải trình tự gene 16S-rRNA chưa được áp dụng một cách thường qui tại các khoa vi sinh lâm sàng. Với kỹ thuật thông lượng cao áp dụng ngày càng nhiều, các bước của sinh học phân

tử có thể tích hợp trong một robot. Kỹ thuật này tạo nên một bộ phóng mới cho việc giải trình tự gene 16S-rRNA hoàn toàn tự động trong tương lai [99].

Ngoài ra còn phải kể đến một điểm khó khăn nữa đối với người chạy giải trình tự gene 16S-rRNA là lý giải kết quả giải trình tự. Công việc này không đơn giản cho người không quen thuộc với phân tích trình tự và thông tin sinh học (sequence and bioinformatics analysis). Từ đó có nhiều nhóm nhà khoa học không ngừng nỗ lực để phát triển các gói phần mềm và cơ sở dữ liệu để giải trình tự gene 16S-rRNA tự động. Các gói phần mềm này chứa đựng một dữ liệu trình tự gene 16S-rRNA của các loài VK đã chọn lọc. Dựa vào đó mà kết quả trình tự gene 16S-rRNA đầu vào được tích hợp với trình tự của phần mềm. Đầu ra được tạo ra là kết quả định danh loài VK. Các phần mềm và cơ sở dữ liệu tốt nhất được biết đến là BLASTn cạnh tranh với GeneBank, Ribosomal Database Project (RDP-II), MicroSeq, Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) [36], [52]. Các gói phần mềm và cơ sở dữ liệu mới phát triển trong những năm gần đây bao gồm: SmartGenee Integrated Database Network System (SmartGenee IDNS™), SILVA ribosomal RNA database, and 16Spath DB database [111].

Trong những cơ sở dữ liệu hiện có thì GeneBank chứa đựng dữ liệu lớn nhất. Với hơn 3.180.020 các trình tự gene 16S-rRNA có sẵn. Từ khóa tìm kiếm bao gồm: 16S-rRNA và 16S-rDNA. Mặc dù các cơ sở dữ liệu này cực kì bổ ích cho các nhà NC về lĩnh vực sinh học phân tử nhưng cũng cần thận trọng là cơ sở dữ liệu này cũng chứa các trình tự chưa được kiểm chứng, không chính xác và dư thừa. Do đó, thường không dễ cho kỹ thuật viên vi sinh lâm sàng chưa có kinh nghiệm để lý giải kết quả từ dữ liệu của BLASTn từ GeneBank [99].

1.4.2.7. Ứng dụng giải trình tự gene 16S-rRNA trên lâm sàng

Thuật ngữ “Microbiota” và “Microbiome” do Joshua Lederberg đề xuất vào năm 2001. “Microbiota” nhằm để chỉ cộng đồng sinh thái của các vi sinh gây bệnh, cộng sinh và hội sinh trong từng khoang của cơ thể, “Microbiome” là hệ gene của các vi sinh vật đó [44]. Ngày nay, niềm tin cho rằng đường hô hấp dưới là vô khuẩn

không còn nữa từ khi sinh học phân tử phát triển mạnh. Có nhiều NC thực hiện định danh VK gây bệnh mà không qua cấy được áp dụng trên lâm sàng.

Trong thập kỷ đầu của thế kỷ 21, từ khi sự xuất hiện của kỹ thuật định danh VK độc lập với cấy làm tăng mối quan tâm về hệ vi sinh của người. Từ khi Viện Y Tế Quốc Gia Mỹ đưa ra dự án về hệ vi sinh của người năm 2008, phổi không được đưa vào trong 18 vị trí lấy mẫu khác nhau trên cơ thể. Các ứng dụng đầu tiên của kỹ thuật này cho các mẫu bệnh phẩm đường hô hấp được thực hiện ở các BN xơ nang phổi, trong đó sự vô khuẩn của phổi vẫn còn giữ như trước đây. Các NC ban đầu cho thấy sự đa dạng của VK trong các mẫu đàm chưa bao giờ được phát hiện dựa trên kỹ thuật cấy vi sinh kinh điển [48].

Một trong các NC đầu tiên được thực hiện từ 12/2005 đến 1/2006 tại hai trung tâm điều trị xơ nang phổi (bệnh viện nhi Timone và bệnh viện Ste. Marguerite) Marseille, Pháp. Mục tiêu chính của NC là nhằm so sánh hai phương pháp định danh VK dựa vào kiểu hình và giải trình tự trên 25 BN (16 trẻ em, 9 người lớn). Trên 16 mẫu đàm trẻ em, 14 mẫu đàm đạt chuẩn, cho kết quả định danh được 20 tác nhân gây bệnh, chia làm 8 loài bằng vi sinh kinh điển. Bao gồm: *S. aureus* (7), *S. maltophilia* (2), *S. pneumoniae* (1), *E. coli* (1), *A. xylosoxidans* (1), *C. indologens* (1), *M. catarrhalis* (1), *M. avium* (1). Ngoài ra có 5 (25%) trường hợp phân lập được nhưng không định danh được chính xác loài. Trong 9 mẫu đàm người lớn, theo vi sinh kinh điển, định danh được 13 loài VK khác nhau. Bao gồm *S. aureus* (5), *P. aeruginosa* (4), *K. pneumoniae* (1) và 3 (23%) không định danh được chính xác loài. Trong 8 loài có biểu hiện kiểu hình không điển hình được giải trình tự 16S-rRNA thì định danh chính xác được cả 8 loài. Bao gồm *S. pneumoniae*, *limosus*, *A. xylosoxidans*, *S. marcescens*, *S. aureus*, *B. multivorans* và *P. aeruginosa* và hai *Inquilinus* [48].

Cũng trên 25 mẫu đàm này, được li trích DNA, khuếch đại, tạo dòng và giải trình tự trên hệ thống ABI PRISM 3130. Kết quả định danh được 53 loài VK khác nhau (**Bảng 1.6**).

Bảng 1.6. Tính đa dạng của vi khuẩn phát hiện được bằng giải trình tự gene

“Nguồn: Fadi Bittar và cộng sự 2008” [48].

Các loài gây bệnh	Số chủng	Các loài khác	Số chủng
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9	<i>Abiotrophia defectiva</i>	1
<i>Burkholderia multivorans</i>	11	<i>Actinomyces</i> spp	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	7	<i>Bergeyella</i> spp	1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	20	<i>Capnocytophaga</i> spp	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	<i>Carnobacterium</i> spp	4
<i>Serratia marcescens</i>	3	<i>Dolosigranulum pigrum</i>	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	129	<i>Eikenella corrodens</i>	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	41	<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25	<i>Gemella haemolysans</i>	20
Tổng số n (%)	344(36,7)	<i>Gemella sanguinis</i>	2
		<i>Granulicatella adiacens</i>	5
Các loài yếm khí		<i>Granulicatella paradiacens</i>	17
<i>Dialister pneumosintes</i>	1	<i>Kingella denitrificans</i>	1
<i>Gemella morbillorum</i>	4	<i>Kingella oralis</i>	2
<i>Lachnospiraceae geneomosp</i>	2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	1
<i>Peptostreptococcus</i> spp	1	<i>Neisseria</i> spp	33
<i>Porphyromonas</i> spp	20	<i>Rothia mucilaginosa</i>	4
<i>Prevotella denticola</i>	6	<i>Streptococcus anginosus</i>	5
<i>Prevotella melaninogeneica</i>	12	<i>Streptococcus constellatus</i>	3
<i>Prevotella oris</i>	2	<i>Streptococcus cristatus</i>	1
<i>Prevotella salivae</i>	1	<i>Streptococcus geneomosp</i>	24
<i>Prevotella</i> spp	37	<i>Streptococcus gordonii</i>	4
<i>Selenomonas infelix</i>	2	<i>Streptococcus iniae</i>	2
<i>Selenomonas noxia</i>	1	<i>Streptococcus mitis</i>	13
<i>Selenomonas</i> spp	4	<i>Streptococcus parasanguis</i>	10
<i>Tannerella forsythensis</i>	2	<i>Streptococcus salivarius</i>	20
<i>Veillonella atypica</i>	1	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2
<i>Veillonella</i> spp	23	<i>Streptococcus</i> spp	83
Tổng số n (%)	119(16,2)	Tổng số n (%)	273(37,1)

1.5. Các yếu tố nguy cơ

Các yếu tố nguy cơ cung cấp những thông tin về các yếu tố có thể phát triển VP cho từng BN và cộng đồng, chúng có thể góp phần lớn đưa ra chiến lược phòng ngừa VPTM. Bằng phân tích đa biến xác định các yếu tố nguy cơ độc lập gây

VPTM được liệt kê ở **Bảng 1.7**. Trong một NC cho thấy VP ở BN nằm hồi sức ngoại cao hơn ICU nội với RR = 2,2. Sử dụng kháng sinh trong bệnh viện liên quan với gia tăng nguy cơ VP bệnh viện [41], [42].

Bảng 1.7. Các yếu tố nguy cơ của VPTM

"Nguồn: Chastre, 2013" [42].

Các yếu tố nguy cơ độc lập của VPTM	
Các yếu tố từ người bệnh	Các yếu tố do can thiệp
Albumin huyết tương < 22g/L	Ưc chế H ₂ , kháng axit
Tuổi ≥ 60 tuổi	Thuốc dẫn cơ, dùng an thần liên tục
ARDS	Truyền > 4 đơn vị máu
COPD, bệnh phổi	Theo dõi liên tục áp lực nội sọ
Hôn mê, rối loạn tri giác	Thở máy > 2 ngày
Bỏng và chấn thương	Cài PEEP
Suy tạng	Thay dây thở máy thường xuyên
Bệnh nặng	Đặt lại nội khí quản
Hít sặc	Nuôi ăn qua ống mũi dạ dày
pH dịch dạ dày	Nằm ngửa
Hiện diện VK hô hấp trên	Di chuyển BN
Viêm xoang	Sử dụng kháng sinh trước đó
	Mùa thu hoặc mùa đông

Để thiết lập các yếu tố nguy cơ, các nhà lâm sàng đã thực hiện nhiều NC có thiết kế phù hợp ở nhiều quốc gia khác nhau. Như một NC trên 320 BN kết quả cho thấy dùng kháng sinh trước đó là một trong bốn yếu tố nguy cơ độc lập gây VPTM, cùng với suy tạng, tuổi > 60, nằm đầu thấp (< 30°) [70]. Kết quả tương tự khi quan sát trên 250 BN xảy ra VPTM rất sớm (≤ 48 giờ thở máy) cũng xác định được các yếu tố nguy cơ VPTM như hồi sức tim phổi, dùng an thần liên tục và dùng kháng sinh trước đó có OR lần lượt là 5,13, 4,4 và 0,29.

Việc sử dụng kháng sinh trước đó cũng cho kết quả tương tự và có thể gây ra chọn lọc một số tác nhân gây VPTM. Như NC đa trung tâm ở Canada cho thấy điều

trị kháng sinh trước đó là yếu tố bảo vệ chống lại VPTM [38]. Tuy nhiên hiện tượng này không còn hiệu quả nữa nếu tiếp tục dùng kháng sinh kéo dài tới tuần thứ 2 và 3. Theo NC Fagon và cộng sự trên 567 BN thở máy, kết quả cho thấy có tới 65% BN bị VPTM do *Pseudomonas* và *Acinetobacter* spp, so với 19% ở nhóm không có dùng kháng sinh trước đó [41], [42].

Độ pH dịch vị cũng được xem là yếu tố nguy cơ cho VPTM. Một phân tích dựa trên 153 BN ICU dùng kháng axit hoặc cimetidine, đếm tổng số khuẩn lạc trong dạ dày tăng cao với VK Gram âm hiếu khí ($p < 0,001$). Khi dịch vị có pH < 2 , dịch vị vô khuẩn tới 65%, nhưng pH tăng lên 4 dịch vị vô khuẩn còn 60% [41], [42]. Một NC đa trung tâm, mù đôi, ngẫu nhiên có nhóm chứng khi so sánh sucralfate (1000mg mỗi 6 giờ), ranitidine (50mg mỗi 8 giờ) để phòng ngừa chảy máu đường tiêu hóa trên và giả dược, trên 1.200 BN thở máy. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt về xuất huyết tiêu hóa và VPTM [39], [42].

Đặt nội khí quản, đặt lại nội khí quản và khai khí quản cũng được cho là yếu tố nguy cơ của VPTM. Chính ống nội khí quản làm mất cơ chế bảo vệ, gây chấn thương và viêm tại chỗ, tăng nguy cơ hít VK hầu họng quanh bóng chèn. Khi quan sát bằng kính hiển vi điện tử ở 25 ống nội khí quản cho thấy 96% phát triển khuẩn lạc, 84% VK được bao phủ bởi màng sinh học hoặc glycat hóa (biofilm or glycalyt) [41]. Hút liên tục hoặc ngắt quãng dịch tiết vùng hầu họng và giữ đủ áp lực bóng chèn có thể phòng ngừa được VPTM [42]. Trong NC 145 BN thở máy, ở nhóm BN được hút trên bóng chèn và dưới hai dây thanh mỗi giờ có tỉ lệ VPTM dưới 13% so với 29% ở nhóm chứng ($p < 0,05$), và ngày khởi phát VPTM 16,2 so với 8,3 ngày. Sự hiện diện ống nội khí quản, đặt lại nội khí quản là một yếu tố nguy cơ cho VPTM [41].

Tư thế nằm của BN cũng ảnh hưởng đến tỉ lệ gây VPTM. Trong NC ngẫu nhiên có nhóm chứng trên 86 BN thở máy được chia làm hai nhóm: nằm đầu bằng và tư thế đầu cao $> 30^\circ$. Kết thúc NC sớm hơn dự kiến khi phân tích thấy tỉ lệ VPTM giảm đáng kể ở nhóm nằm đầu cao [41].

Chính dụng cụ hô hấp là nguồn lây đáng kể cho VPTM. Hút đàm kín và hở, tỉ lệ VPTM lần lượt là 7,3% so với 15,9%, $p = 0,007$ [37]. Máy thở, dây máy thở, bình làm ẩm và bộ lọc khí cũng là nguồn lây nhiễm gây ra VPTM. Kết quả các NC trên BN dùng bộ lọc có chức năng làm ẩm khí hít vào cho thấy giảm đáng kể VPTM so với hệ thống làm ẩm cổ điển [42]. Di chuyển BN ra khỏi khoa ICU là yếu tố nguy cơ độc lập của VPTM (OR = 3,8, $p < 0,001$) [64].

1.6. Chẩn đoán

Theo khuyến cáo của hiệp hội các bệnh lý truyền nhiễm Hoa Kỳ và Hội Lồng Ngực Hoa Kỳ 2016. Việc chẩn đoán VPTM trên lâm sàng vẫn tiếp tục như là theo hướng dẫn năm 2005 của hiệp hội này. Tức là chẩn đoán BN nghi ngờ VPTM chỉ dựa vào bệnh cảnh lâm sàng là chính. Các tiêu chuẩn bao gồm thâm nhiễm phổi mới xuất hiện kèm theo bằng chứng lâm sàng. Thâm nhiễm phổi này là có nguồn gốc từ phổi gồm có mới khởi phát sốt, mới khởi phát tiết đàm mủ, mới khởi phát tăng bạch cầu máu và mới khởi phát giảm oxy hóa máu trên BN thở máy sau 48 giờ. Chẩn đoán BN nghi ngờ VPTM chỉ dựa vào lâm sàng không kết hợp với CRP, PCT và sTREM-1 dạng hòa tan [61]. Một cách điển hình, nghi ngờ VPTM khi BN có thâm nhiễm mới, tiến triển trên X-quang ngực kèm các dấu hiệu gợi ý nhiễm khuẩn như sốt, đàm mủ, tăng bạch cầu máu, tăng thông khí và/hoặc giảm oxy hóa máu động mạch [42].

Khi áp dụng nội soi ống mềm có nòng bảo vệ (PSB) với cây đàm định lượng làm tiêu chuẩn vàng để so sánh. Một NC trên 84 BN được chẩn đoán VPTM dựa vào lâm sàng, X-quang ngực và các xét nghiệm sinh hóa khác. Chỉ có 27 BN có VPTM thật sự và giá trị tiên đoán chính xác là 62%. Giá trị trung bình của nhiệt độ, tăng bạch cầu máu, PaO_2/FiO_2 và thang điểm X-quang ngực không có sự khác biệt giữa hai nhóm [49]. Một NC sau đó dựa trên mô hình tương tự, chẩn đoán VPTM dựa vào thâm nhiễm phổi mới hoặc tồn tại kéo dài kèm theo hai trong ba tiêu chuẩn sau: $T^{\circ} > 38,3^{\circ} C$, bạch cầu $> 12.000/mm^3$, tăng tiết đàm mủ. Kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu là 69% và 75%. Chỉ dựa vào lâm sàng, chẩn đoán VPTM có âm tính giả 30

- 35%, dương tính giả 20 - 25%. Thậm chí chẩn đoán VPTM dựa vào lâm sàng, nhuộm Gram và cấy đàm qua hút khí quản cho kết quả không chính xác, dẫn đến lạm dụng kháng sinh [41].

Để hạn chế việc sử dụng kháng sinh mạnh, phổ rộng không cần thiết, các bác sĩ lâm sàng thường phải dựa vào kết quả nuôi cấy vi sinh và kháng sinh đồ.

1.7. Thực hiện kháng sinh đồ trên vi khuẩn phân lập được từ VPTM

1.7.1. Kháng sinh đồ khuếch tán trên các đĩa giấy có tấm kháng sinh

Hiện nay, phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên các đĩa giấy có tấm kháng sinh ở một nồng độ nhất định được áp dụng rộng rãi. Phương pháp này dễ thực hiện, rẻ tiền. Đây là phương pháp định tính, không cho biết chính xác VK phân lập được kháng với kháng sinh dự định điều trị ở nồng độ bao nhiêu. Đồng thời không cho biết liều lượng và cách dùng kháng sinh thực sự có hiệu quả trên BN hay không [21].

1.7.2. Thực hiện kháng sinh đồ xác định MIC

Kỹ thuật định lượng đo nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của từng VK một, cho một nồng độ nhất định của từng kháng sinh. Kết quả cho biết chính xác độ nhạy cảm của kháng sinh đối với VK. Phương pháp MIC này có thể giúp điều chỉnh liều kháng sinh dự định điều trị ở nồng độ bao nhiêu, cũng như cách sử dụng kháng sinh cho BN [21]. Thông qua MIC, các nhà vi sinh lâm sàng xác định được FIC. Từ đó, giúp cho các bác sĩ lâm sàng chọn lựa sự phối hợp kháng sinh sao cho thích hợp và hiệu quả nhất trong việc điều trị VPTM. Với kết quả MIC, bác sĩ điều trị có thể tiên đoán được hiệu quả của kháng sinh mà mình điều trị trên BN. Theo khuyến cáo bằng cách so sánh nồng độ hữu dụng của kháng sinh đạt được trong dịch cơ thể của BN (được gọi là điểm gãy PK/PD) với MIC của kháng sinh đối với VK. Nếu điểm gãy PK/PD bằng hay cao hơn MIC thì VK nhạy với kháng sinh và điều trị kháng sinh sẽ hiệu quả. Nếu điểm gãy PK/PD thấp hơn MIC thì VK đề kháng với kháng sinh và sẽ thất bại trong điều trị.

Ngoài ra, dựa vào kết quả MIC bác sĩ có thể điều chỉnh liều và cách cho kháng sinh cho BN nhằm đưa điểm gãy PK/PD của kháng sinh lên bằng hay cao hơn MIC của kháng sinh đối với VK để đạt được hiệu quả điều trị [21]. Hiện nay việc thực hiện thí nghiệm kháng sinh đồ theo phương pháp tìm MIC đã trở nên rất dễ dàng nếu phòng thí nghiệm được cung cấp các que thử E-test hay là phương tiện làm MIC bằng phương pháp vi pha loãng [21]. Que thử E-test là loại giá cứng có tấm kháng sinh ở các nồng độ từ cao đến thấp và trên que có ghi các số cho phép đọc kết quả MIC dựa vào điểm dừng của vòng vô khuẩn ở vị trí nào trên que.

Thử nghiệm kháng sinh đồ ở từng loại kháng sinh cụ thể trên lâm sàng là một kỹ thuật cần thiết giúp cho các bác sĩ lâm sàng thực hành hàng ngày. Tuy nhiên, ngày nay, sinh học phân tử được áp dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, trong đó có vi sinh lâm sàng. Ngoài việc định danh VK, sinh học phân tử có khả năng phát hiện được các gene kháng thuốc mà VK mang theo.

1.8. Ứng dụng sinh học phân tử trong phát hiện gene kháng thuốc

Men β – lactamase do VK Gram âm tiết ra, thủy phân các thế hệ kháng sinh β – lactam là cơ chế thường gặp nhất tạo ra đề kháng kháng sinh trên lâm sàng. Sự hiện diện và các đặc tính của các men này đóng một vai trò quan trọng trong việc lựa chọn điều trị kháng sinh thích hợp. Ngày nay, khi đối mặt với một VK Gram âm lúc nào cũng đặt vấn đề VK này có sinh men β – lactamase gây đề kháng kháng sinh β – lactam cho đến khi có bằng chứng ngược lại. Do trước đây việc tiếp cận cấu trúc phân tử của các men β – lactamase quá phức tạp, gây khó khăn rất lớn trong việc xếp loại các men β – lactamase, thậm chí bị trùng lặp giữa các nhóm. Ngày nay, với sự phát triển của công nghệ sinh học phân tử, việc tiếp cận dễ dàng hơn đến các trình tự axit amin, xác định được các gene mã hóa các men này trên lâm sàng [33].

Do đó, các ấn phẩm gần đây ghi nhận các yếu tố quyết định phát hiện đề kháng kháng sinh dựa trên phân tử chính là xác định gene β - lactamase [73]. Các kỹ thuật dựa trên vi đa giếng (microarrays) như: Check KPC/ extended-spectrum β -

lactamase (ESBL) (Check-Points) dùng để phát hiện ra các gene β -lactamase (bla) từ VK phân lập được. Các xét nghiệm này không cung cấp thông tin để định danh VK mà cho biết các cơ chế kháng thuốc. Kỹ thuật này sử dụng khuếch đại và lai PCR trong thực nghiệm vi đa giếng DNA mật độ thấp (low-density DNA microarray). Một vài tài liệu nhấn mạnh khả năng của các xét nghiệm này là để phát hiện ra các gene bla tương ứng như: TEM, SHV, CTX-M và KPC β -lactamases. Các sản phẩm này có độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương nhau, lên tới 100% [73]. Một sản phẩm khác thực hiện một số lượng lớn hơn chất đánh dấu chuyên biệt để xác định các gene bla của ESBL (TEM, SHV và CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinase (pAmpC) và carbapemenases (KPC, OXA-48, VIM, IMP và NDM). Các NC khác phát hiện trình tự kháng kháng sinh sử dụng multiplex real-time PCR và các hạt phát huỳnh quang xen vào (intercalating fluorophores) (như: SYBR Green) hoặc các đầu dò lai (or hybridization probes) (các đèn phân tử: molecular beacons) để xác định nhiều biến thể gene carbapenemase (blaKPC) [73].

Phương pháp MS cũng được thực nghiệm phát hiện kháng thuốc. Gần đây, xét nghiệm phát hiện các men β – lactamase dựa trên MALDI-TOF MS được mô tả như là một xét nghiệm mới. Xét nghiệm này giúp phát hiện ra gene kháng thuốc kháng với nhiều kháng sinh β - lactam khác nhau, bao gồm các carbapenem [73]. Khi đánh giá các kết quả liên quan tới đề kháng kháng sinh, điều đáng chú ý là phương pháp phân tử cung cấp độ nhạy của thí nghiệm cho từng kháng sinh đặc hiệu. Khi đó kết quả bao gồm các gene kháng thuốc này hoặc các trình tự có liên quan. Còn thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh chuẩn mực vẫn tiếp tục thực hiện trên các chủng phân lập từ cấy [73].

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu tiến cứu mô tả cắt ngang.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

Khoa Hồi Sức Tích Cực Chống Độc (ICU nội), khoa Phẫu Thuật Gây Mê Hồi Sức (ICU ngoại) và phòng Đột quỵ khoa Nội Thần Kinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định.

2.3. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 11/2014 đến 9/2015.

2.4. Đối tượng nghiên cứu

Dân số mục tiêu: Bệnh nhân nằm ở khoa bệnh nặng có thở máy.

Dân số chọn mẫu: Bệnh nhân nằm điều trị tại các khoa Hồi Sức Tích Cực Chống Độc, khoa Phẫu Thuật Gây Mê Hồi Sức và phòng Đột quỵ khoa Nội Thần Kinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định.

2.5. Cỡ mẫu và công thức tính cỡ mẫu

Công thức tính cỡ mẫu:

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

Cỡ mẫu nghiên cứu: Z: trị số từ phân phối chuẩn ($Z = 1,96$); $\alpha = 0,05$; p: tỉ lệ VK gây VPTM từ nghiên cứu trước $p = 0,69$ [5]; d: sai số ước lượng ($d = 0,07$). Với tỉ lệ VPTM do *Acinetobacter* là 69% [5], sau khi tính toán và được làm tròn là $n = 168$ mẫu cấy dương. Do đó số bệnh nhân cần được tuyển chọn là 244 (168:0,69).

Tuy nhiên tỉ lệ VPTM do đồng nhiễm hai VK cùng lúc ước tính khoảng 10% [32]. Như vậy số bệnh nhân cần được tuyển chọn tối thiểu là 219,17 và làm tròn là 220.

Kỹ thuật chọn mẫu: Chọn mẫu thuận tiện, chọn tất cả các bệnh nhân nhập vào khoa ICU nội, ICU ngoại và phòng Đột quỵ khoa Nội Thần Kinh từ tháng 11 năm 2014 đến 30 tháng 9 năm 2015, có thở máy qua ống nội khí quản (NKQ) hoặc qua ống khai khí quản (KKQ) thỏa tiêu chuẩn chọn vào nghiên cứu.

2.6. Tiêu chuẩn chọn mẫu

2.6.1. Tiêu chuẩn chọn vào nghiên cứu

Bệnh nhân thở máy qua NKQ hoặc qua KKQ ≥ 48 giờ tại khoa ICU nội, ICU ngoại và Nội Thần Kinh BV NDGD. Bệnh nhân có VP trên lâm sàng: thâm nhiễm mới, lan tỏa hoặc tiến triển trên X-quang ngực kèm ≥ 2 tiêu chuẩn:

+ $T^0 \geq 38^\circ\text{C}$, hoặc $\leq 36^\circ\text{C}$

+ Tăng tiết đàm hoặc đàm đổi màu

+ Tăng tiêu thụ oxy: tăng $\text{FiO}_2 \geq 20\%$ /ngày trong ≥ 2 ngày liền, hoặc tăng PEEP $\geq 3 \text{ cmH}_2\text{O}$ /ngày, ≥ 2 ngày liền

+ BC máu $\geq 12.000/\text{mm}^3$ hay $\leq 4.000/\text{mm}^3$

2.6.2. Tiêu chuẩn loại ra:

+ Bệnh nhân < 18 tuổi

+ Đã có VP xảy ra trước 48 giờ

+ Bệnh nhân bị nhồi máu cơ tim trong 24 giờ đầu, rối loạn nhịp thất nguy hiểm chưa kiểm soát được

+ Tiểu cầu dưới $60.000/\text{mm}^3$

+ Phụ nữ có thai, bệnh nhân ghép tạng và bệnh nhân nhiễm HIV

+ Thân nhân không đồng ý tiếp tục tham gia NC

2.7. Phương pháp tiến hành

2.7.1. Thỏa thuận với người thân bệnh nhân

Giải thích về lợi ích của NC cho thân nhân người bệnh và kí vào bản đồng ý tham gia NC (**phụ lục 2, 3**).

2.7.2. Cách thức tiến hành

Đánh giá và theo dõi bệnh nhân: tất cả bệnh nhân nhập vào khoa tham gia thực hiện NC đều được ghi nhận tên, tuổi, giới, ngày giờ nhập vào khoa, địa chỉ, lý do chính nhập viện, tiền căn bệnh lý. Dấu hiệu sinh tồn: mạch (lần/phút), huyết áp (mmHg), nhiệt độ (°C), độ bão hòa oxy theo mạch đập (SpO₂), thang điểm hôn mê Glasgow cũng được ghi nhận ngay lúc nhập khoa. Bệnh nhân được khám chi tiết từng cơ quan và làm các xét nghiệm thường qui. Các xét nghiệm bao gồm CTM, ure máu, creatinin máu, đường huyết, điện giải đồ máu, điện tâm đồ, X-quang ngực thẳng, khí máu động mạch và các xét nghiệm chuyên biệt theo từng bệnh lý và bệnh nguyên. Những bệnh nhân có thở máy được cài đặt máy thở ban đầu: thể tích khí lưu thông 10ml/kg, tần số thở 14 lần/phút, phân suất oxy khí thở vào 100%, thời gian hít vào 1,2 giây, chế độ thở kiểm soát có hỗ trợ [6]. Đánh giá lại tình trạng của bệnh nhân sau 30 phút. Tất cả các bệnh nhân thở máy đều được đặt ống hút đàm kín. Sau 48 giờ thở máy, đánh giá lại tình trạng bệnh nhân. Các thông số cần đánh giá bao gồm lâm sàng như nhiệt độ, tiêu thụ oxy, tăng tiết đàm và màu sắc đàm qua nội khí quản hoặc qua khai khí quản. Cận lâm sàng bao gồm CTM, X-quang ngực thẳng. Ghi nhận loại kháng sinh sử dụng và số ngày sử dụng kháng sinh trước khi nội soi phế quản.

2.7.3. Nội soi phế quản tại giường (Phụ lục 4)

Dịch rửa phế quản phế nang được chia làm hai mẫu: một mẫu được gửi tới phòng vi sinh trong vòng 30 phút. Mẫu còn lại được giữ trong môi trường đông lạnh < 4°C và gửi tới phòng sinh học phân tử của Trung Tâm Pháp Y thành phố Hồ Chí Minh trong vòng một giờ.

2.7.4. Tại khoa vi sinh

Dịch rửa phế quản phế nang được xử lý, nuôi cấy và định danh theo qui trình nuôi cấy và định danh của khoa Vi Sinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định.

2.7.4.1. Cấy định lượng dịch rửa phế quản phế nang (phụ lục 5)

2.7.4.2. Định danh vi khuẩn: theo qui trình định danh vi khuẩn tại khoa vi sinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định (phụ lục 6)

Các hộp môi trường phân lập sau khi ủ sẽ được lấy ra, tiến hành: (1). Quan sát khuẩn lạc; (2). Nhuộm Gram và định danh từng loại khuẩn lạc bằng các phản ứng sinh hóa chuyên biệt cho từng loại VK: (a). Tụ cầu khuẩn: tiến hành các phản ứng catalase, coagulase, chapman, ure, polymycin và novobiocin. (b). Liên cầu khuẩn: tiến hành các phản ứng sinh hóa như: taxo A, taxo P, natrichlorua 6,5%, bile esculin, CAMP test. (c). Trực khuẩn Gram (-): thử oxidase. Oxidase (-): VK đường ruột: thực hiện các phản ứng khảo sát tính lên men đường glucose, lactose, sinh hơi, sinh H₂S trên môi trường KIA, di động, Indol trên môi trường SIM, Citrate, Urease, Methyl red (MR). Oxidase (+): VK thuộc họ không phải VK đường ruột, thực hiện các phản ứng sinh hóa tương tự VK đường ruột kết hợp với bộ định danh API 20NE.

2.7.4.3. Kỹ thuật khuếch tán kháng sinh đồ trong thạch từ đĩa kháng sinh theo phương pháp Kirby – Bauer (kháng sinh đồ khuếch tán)

Thử nghiệm tính nhạy cảm của kháng sinh đối với các VK theo phương pháp Kirby – Bauer. Các đĩa kháng sinh đồ được sử dụng có chứa hàm lượng kháng sinh như sau: amikacin 30 µg, genetamycin 10 µg, ceftriaxone 30 µg, ceftazidime 30 µg, cefepime 30 µg, cefoperazone 75 µg, cefoperazone/sulbactam 75/30 µg, piperacillin /tazobactam 100/10 µg, ertapenem 10 µg, imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, ciprofloxacin 5 µg, levofloxacin 5 µg, doxycyclin 30 µg, vancomycin 30 µg and colistin 10 µg được cung cấp bởi Oxoid (Oxoid ltd. Basingstoke Hampshire, England). Các chủng chứng bao gồm: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603,

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Liofilchem, Italia). Biện luận kết quả kháng sinh đồ theo CLSI (2014) [35]. Tiến hành lưu chủng trong môi trường thích hợp.

2.7.4.4. Kháng sinh đồ xác định MIC bằng que E-test

Que E-test là que giấy bằng Nitrocellulose, trên đó có tấm kháng sinh thành một dãy có hàm lượng giảm dần. Khi đặt que E-test lên mặt môi trường đã trải VK, kháng sinh từ que E-test sẽ khuếch tán ra môi trường cũng theo nồng độ giảm dần. Nhờ đó mà sự phát triển của VK chung quanh que E-test sẽ bị ức chế hình thành một vùng vô khuẩn có hình elip. Điểm cắt của vùng vô khuẩn khi tiếp xúc với que E-test cho biết giá trị MIC của kháng sinh và được đọc bằng chính con số ghi trên que tại điểm dừng này. Mỗi đĩa thạch với đường kính 90mm có thể đặt tối đa hai que E-test ngược chiều nhau. Đối với đĩa thạch đường kính 150mm có thể đặt tối đa sáu que E-test hướng tâm với đầu kí hiệu kháng sinh quay ra ngoài. Việc chuẩn bị môi trường, trải huyền dịch, nuôi ủ cũng giống như kỹ thuật khuếch tán kháng sinh đồ trong thạch [22]. Biện luận kết quả xem tại phần 2.7.4.5.

2.7.4.5. Biện luận kết quả kháng sinh đồ theo CLSI 2014 [35] (phụ lục 7)

2.7.5. Tại phòng sinh học phân tử

Một trong các công việc chính yếu của chúng tôi để thực hiện đề tài NC này là định danh VK trên các mẫu dịch rửa phế quản phế nang bằng giải trình tự gene trên hệ thống NGS.

2.7.5.1. Ly trích DNA VK bằng phương pháp sốc nhiệt (ngay khi tiếp nhận mẫu)

Nguyên tắc: sử dụng hóa chất Dithiothreitol (DTT) làm gãy các liên kết disulphide, giúp tan đám và đồng hóa mẫu DRPQPN. Sau đó, dùng phương pháp sốc nhiệt để ly trích DNA vi khuẩn. Dùng nhiệt độ cao để thay đổi cấu trúc màng và vách tế bào vi khuẩn. Sau đó, quá trình làm lạnh nhanh hình thành các tinh thể nước trong tế bào dẫn đến việc phá vỡ tế bào chất, giúp giải phóng DNA vi khuẩn. Bước tiếp theo là ly tâm cho các mảnh vỡ tế bào lắng xuống đáy, thu phần dịch nổi chứa

DNA. Các bước thực hiện: Bơm 200 μ l TE 1X vào tube 1,5 ml vô khuẩn, ghi rõ tên mẫu lên nắp và thân tube. Dùng đầu tip nhựa vô trùng hút 200 μ l DRPQP đã đồng nhất cho vào tube với tên mẫu tương ứng, hút nhả nhiều lần để hòa trộn dung dịch, đóng nắp, vortex 10 giây. Gắn vào phao và thả vào nước đang sôi sao cho phần huyền dịch ngập trong nước. Để sôi 10 phút. Nhanh chóng lấy tube ra khỏi phao, ngâm vào khay đá vụn và để trong ngăn lạnh -20°C trong 10 phút. Lấy tube khỏi khay đá và ly tâm 13.000 rpm trong 10 phút. Hút 100 μ l dịch nổi bên trên chuyển sang tube mới (có ghi tên mẫu tương ứng) tránh làm khuấy động lớp cặn dưới đáy tube. Dịch DNA thu được đem giữ -30°C cho đến khi cho vào mix PCR.

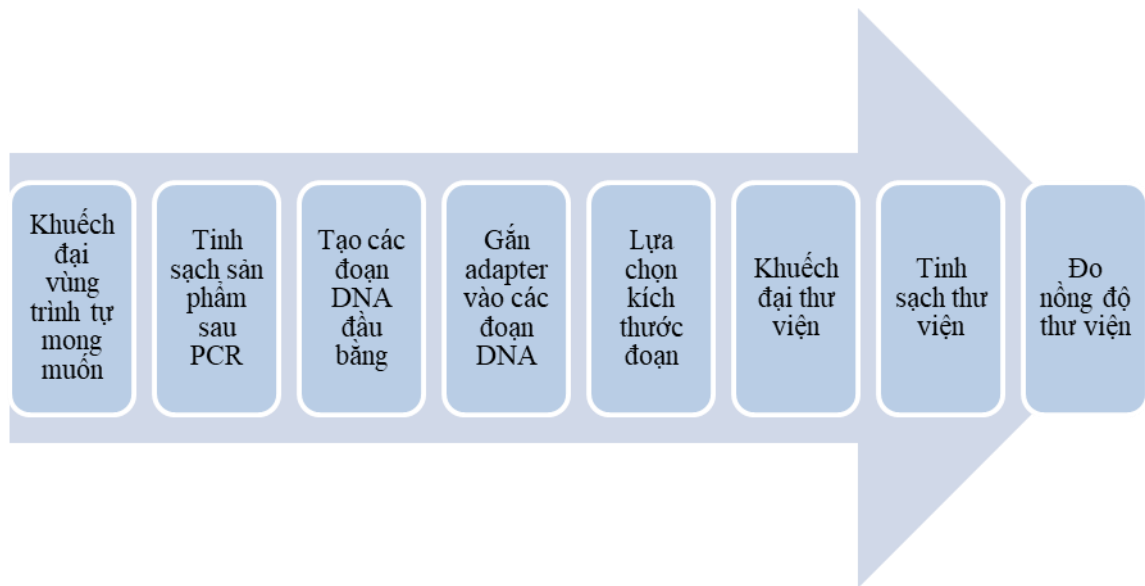
2.7.5.2. Đo nồng độ DNA

Dùng máy đo Qubit[®] 2.0 Fluorometer và bộ hóa chất Qubit[™] dsDNA HS Assay Kits (hãng Thermo Scientific). Nguyên tắc: Thuốc nhuộm trong bộ hóa chất Qubit[™] dsDNA HS Assay Kits có khả năng phát huỳnh quang cực thấp, nhưng khi tạo liên kết với DNA sẽ phát huỳnh quang mạnh. Tín hiệu huỳnh quang này tỷ lệ thuận với nồng độ DNA trong mẫu và được ghi nhận bằng máy đọc huỳnh quang. Hai tube dung dịch DNA với nồng độ khác nhau đã biết được dùng để dựng đường chuẩn thể hiện sự tương quan giữa nồng độ DNA và mức tín hiệu huỳnh quang ghi nhận được. Do đó, máy Qubit[®] 2.0 Fluorometer có thể đọc tín hiệu huỳnh quang từ mẫu cần đo và tự động chuyển đổi thành nồng độ DNA. Quy trình thực hiện: Chuẩn bị tube 0,5ml, ghi chú tên mẫu và S1, S2 lên nắp tube. (S1 và S2 là hai dung dịch để dựng đường chuẩn). Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng (A) bằng cách pha loãng dung dịch Qubit[®] dsDNA HS Reagent trong dung dịch Qubit[®] dsDNA HS Buffer với tỉ lệ 1:200. Vortex trộn đều hỗn hợp, sau đó ly tâm nhẹ. Thêm 190 μ l hỗn hợp A vào mỗi tube 0,5ml đã chuẩn bị. Lần lượt cho 10 μ l dung dịch S1, S2 mẫu vào các tube tương ứng, vortex trộn đều và ly tâm nhẹ. Ủ ở nhiệt độ phòng 2 phút. Thực hiện dựng đường chuẩn với S1, S2. Sau đó, đo và ghi nhận nồng độ DNA của mẫu.

2.7.5.3. Phương pháp giải trình tự gene 16S-rDNA bằng kỹ thuật NGS

(a) Chuẩn bị thư viện

Các bước chuẩn bị thư viện trong kỹ thuật NGS có thể tóm tắt theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ tạo thư viện cho kỹ thuật NGS

(i) Thực hiện phản ứng PCR để khuếch đại vùng trình tự 16S rDNA: mục đích: tạo ra số lượng lớn bản sao các trình tự của vùng biến đổi V3, V6 -7 và V9 thuộc gene 16S-rRNA nhờ vào hoạt động của enzyme DNA polymerase và các môi đặc hiệu cho 3 vùng trình tự trên.

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng tạo các amplicon - phản ứng tạo “bản sao” các vùng V3, V6, V7 và V9 trong gen 16S-rRNA

	Nồng độ cuối	Phản ứng 30 µl
Water	-	thành 30 µl
2X Enviromental Master Mix	1x	15 µl
16S Primer Set	1x	3 µl
Template DNA	10 – 100 ng	-

Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR: 1 chu kỳ: 95°C 10 phút; 25 chu kỳ gồm: 95°C 30 giây, 58°C 30 giây, 72°C 30 giây; 1 chu kỳ: 72°C 7 phút; 1 chu kỳ: 4°C giữ cho đến khi dùng.

(ii) Tinh sạch sản phẩm sau PCR:

Sử dụng bộ hóa chất PCR GeneJET NGS Cleanup Kit để tinh sạch sản phẩm khuếch đại. Nguyên tắc: bộ hóa chất này kết hợp kỹ thuật ly tâm cột và đặc điểm bám có chọn lọc vào màng silica để thu nhận DNA, đồng thời loại bỏ được những tạp chất còn sót lại sau phản ứng PCR như môi, enzym, dNTP. Đầu tiên, trộn hỗn hợp sau phản ứng PCR với dung dịch có nồng độ muối cao và rửa DNA bằng ethanol. DNA dạng rửa sẽ bám vào màng silica, còn những tạp chất khác sẽ đi qua cột sau ly tâm. Qua 2-3 bước rửa, tạp chất được loại bỏ một cách hiệu quả và DNA tinh sạch được thu nhận bằng dung dịch thoi (elution buffer – EB) hoặc nước cất. Quy trình thực hiện: Chuẩn bị hóa chất (cho bộ 50 thử nghiệm): Trước khi sử dụng, cần thêm Ethanol (96-100%) vào chai Prewash Buffer và Wash Buffer như sau: thành phần dung dịch cho tinh sạch sản phẩm.

Bảng 2.2. Thành phần hóa chất thêm vào dung dịch rửa trong việc tinh sạch phản ứng PCR khuếch đại các vùng V3, V6, V7 và V9 trong gene 16S-rRNA

	Prewash Buffer	Wash Buffer
Thể tích ban đầu (ml)	20	7
Thể tích Ethanol (96-100%) thêm vào (ml)	5	35
Tổng (ml)	25	42

Đánh dấu lên thân chai đã thêm Ethanol, lắc đều và lưu trữ ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (15-25°C). Các bước tiến hành: thêm dung dịch Binding Buffer vào tube chứa sản phẩm PCR theo tỉ lệ 5:1. Bảo quản sản phẩm PCR tinh sạch ở -20°C.

(iii) Thực hiện phản ứng “End repair” để tạo đoạn DNA có hai đầu bằng: sử dụng bộ hóa chất NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (hãng New England Biolabs).

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng tạo amplicon hoàn chỉnh - tạo “đầu bằng” cho các bản sao của vùng V3, V6, V7 và V9 trong gene 16S-rRNA

Thành phần	Phản ứng 60 µl
Water	thành 60 µl
NEBNext End Repair Reaction Buffer	6 µl
NEBNext End Repair Enzyme Mix	3 µl
Fragmented DNA	30 µl

(iv) Thực hiện phản ứng gắn Adapter vào đoạn DNA:

Sử dụng bộ hóa chất NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (hãng New England Biolabs). Công thức pha mix cho 1 mẫu: (thành phần phản ứng gắn nhãn).

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng tạo “thư viện” - phản ứng gắn Adapter và trP1 vào 2 đầu các bản sao “đầu bằng” của vùng V3, V6, V7 và V9 trong gene 16S-rRNA

Thành phần	Phản ứng 100 µl
Water	thành 100 µl
T4 DNA Ligase Buffer for Ion Torrent	10 µl
Adapter	2 µl
trP1	2 µl
Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase	1 µl
T4 DNA Ligase	6 µl
End Repair DNA	60 µl

Chương trình chạy trên máy luân nhiệt: 1 chu kỳ: 25°C 15 phút; 1 chu kỳ: 65°C 5 phút; 1 chu kỳ: 4°C giữ cho đến khi dùng.

(v) Tinh sạch và lựa chọn kích thước đoạn trình tự:

Sử dụng bộ hóa chất Agencourt® AMPure® XP Kit (hãng Beckman Coulter). Nguyên tắc: bộ hóa chất này áp dụng kỹ thuật cố định thuận nghịch pha rắn trên hạt từ (Solid Phase Reversible Immobilization magnetic beads – SPRI beads) để tinh sạch, lựa chọn kích thước đoạn DNA mong muốn. Tùy thuộc vào sự điều chỉnh nồng độ PEG và muối trong dung dịch hỗn hợp có thể thu nhận ưu tiên chỉ với các đoạn DNA dài hoặc thu nhận cả đoạn ngắn và dài. Trong NC này, hệ số sử dụng dung dịch Agencourt® là 0,6X với mục đích thu nhận các đoạn dài hơn 250 bp.

(vi) Thực hiện phản ứng khuếch đại thư viện: Công thức pha mix cho 1 mẫu:

Bảng 2.5. Thành phần phản ứng tạo “bản sao” của các thư viện.

Thành phần	Phản ứng 100 µl
Water	thành 100 µl
Adaptor Ligated DNA	20 µl
Primers	4 µl
NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix	50 µl

Chu kỳ nhiệt cho phản ứng: 1 chu kỳ: 98°C 30 giây; 4 - 12 chu kỳ gồm: 98°C 10 giây, 58°C 30 giây, 72°C 30 giây; 1 chu kỳ: 72°C 5 phút; 1 chu kỳ: 4°C giữ cho đến khi dùng.

(vii) Tinh sạch thư viện sau khi khuếch đại: sử dụng bộ hóa chất PCR GeneJET NGS Cleanup Kit, các bước thực hiện giống như quy trình tinh sạch sản phẩm PCR. Sản phẩm thư viện sau khi khuếch đại và tinh sạch được chia nhỏ vào các tube 0,2 ml (cho vào 2 µl/tube) nhằm tránh hiện tượng giảm hàm lượng DNA khi rửa đông nhiều lần.

(viii) **Đo nồng độ thư viện:** thực hiện giống như đo nồng độ dịch ly trích DNA ở trên.

(b) **Chuẩn bị các hạt ISP dương (hạt ion gắn trình tự) bằng hệ thống Ion OneTouch™ 2:** chuẩn bị vật tư và hóa chất dùng cho hệ thống Ion OneTouch™ 2:

Thành phần hóa chất cần chuẩn bị cho phản ứng:

Bảng 2.6. Thành phần dung dịch sử dụng cho việc gắn “thư viện” gen vào hạt ISP

Tên thành phần	Cách thức chuẩn bị
Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix	Để tube chứa hóa chất về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Vortex kỹ trong vòng 30 giây, sau đó ly tâm nhẹ 2 giây. Giữ ở nhiệt độ phòng trong suốt quá trình thao tác thí nghiệm.
Ion PGM™ Hi-Q™ Enzyme Mix	Ly tâm nhẹ 2 giây. Bảo quản lạnh trong khi thao tác.
Thư viện (đã pha loãng)	Vortex kỹ trong vòng 5 giây, sau đó ly tâm nhẹ 2 giây. Bảo quản lạnh trong khi thao tác.
Ion PGM™ Hi-Q™ Ion Sphere™ Particles (ISPs)	Vortex ở tốc độ tối đa trong 1 phút, sau đó ly tâm nhẹ 2 giây. Dùng pipet hút nhỏ nhiều lần để trộn đều dung dịch. Giữ ở nhiệt độ phòng trong suốt quá trình thao tác thí nghiệm.

Bổ sung các thành phần phản ứng theo công thức sau:

Bảng 2.7. Thành phần phản ứng chuẩn bị gắn “thư viện” gene vào hạt ISP

Thành phần	Phản ứng 1000 μl
Nuclease-free Water	25 μ l
Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix	800 μ l
Ion PGM™ Hi-Q™ Enzyme Mix	50 μ l
Thư viện (đã pha loãng)	25 μ l
Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs	100 μ l

Làm sạch hệ thống Ion OneTouch™ 2: Kiểm tra tube chứa dầu và tube chứa dung dịch phản ứng và bổ sung thêm sao cho lượng dung dịch đạt mức 1/2 chiều cao tube.

Làm giàu hạt ISP dương bằng hệ thống Ion OneTouch™ ES:

Chuẩn bị dung dịch Melt - off gồm:

Bảng 2.8. Thành phần phản ứng tách mạch “thư viện” gene khỏi bản sao đã gắn trên hạt ISP

Thành phần	Tổng thể tích 320 μl
Tween® Solution	280 μ l
NaOH 1 M	40 μ l

(c) Giải trình tự trên hệ thống PGM:

(v) Giải trình tự bằng Ion 314™ Chíp v2: Hóa chất có trong bộ Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit:

Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Polymerase, Sequencing Primer, Control Ion Sphere™ Particles, Annealing Buffer.

Hóa chất và thiết bị khác: Ion 314™ Chíp v2, ISPs dương đã được làm giàu, ống nghiệm 0,2mL (non-polystyrene), Rainin® SR-L200F pipette và đầu típ, máy vortex, máy ly tâm Ion PGM™ Chíp Minifuge, máy luân nhiệt, máy đọc barcode (Barcode scanner – đi kèm hệ thống Ion PGM™ System).

Tiến hành gắn môi: Thêm 5 μ L Control Ion Sphere™ Particles vào toàn bộ ISP dương đã được làm giàu, trộn đều, ly tâm 2 phút ở $15.500 \times g$, loại bỏ dịch nổi, giữ lại khoảng 3 μ L dịch. Thêm 6 μ L Sequencing Primer vào ISP(+), trộn đều bằng pipette. Đặt tube chứa ISP, Control Ion Sphere™ Particles và Sequencing Primer vào máy luân nhiệt, chỉnh chu kỳ gồm 95°C trong 2 phút, sau đó 37°C trong 2 phút.

Tiến hành kiểm tra chíp (chíp check): Trên màn hình chính của hệ thống Ion PGM™ Sequencer, nhấn nút **Run**. Loại bỏ tất cả chai nhựa ra khỏi máy, chọn **Next**. Gắn chíp đã dùng để Initialize vào bàn kẹp chíp, chọn **Next**. Thay chíp cũ bằng chíp mới, chọn **Next**. Nhập barcode của chíp mới (dùng máy đọc barcode), chọn **Chíp Check**. Sau khi kiểm tra chíp xong, chọn **Next**. Chọn **Waste bottle is empty** trên màn hình, chọn **Next**.

Gắn Sequencing Polymerase vào ISP (+): Sau khi gắn môi, thêm 3 μ L Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Polymerase vào ISP (+). Trộn đều bằng pipette, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

Chuẩn bị chíp: Sau khi kiểm tra chíp xong, để chíp nghiêng 45° , hút bỏ tất cả nước trong chíp. Đặt chíp lên máy ly tâm chíp, úp ngược chíp, đầu bơm mẫu quay ra ngoài, ly tâm khoảng 5 giây để nước tràn về phía lỗ bơm mẫu. Dùng pipette hút bỏ toàn bộ nước còn sót lại trong chíp, lấy chíp ra khỏi máy ly tâm.

Bơm mẫu vào chíp: Đặt chíp trên mặt phẳng, dùng Rainin® SR-L200F pipette hút toàn bộ mẫu đã gắn enzyme, bơm từ từ hỗn hợp vào lỗ bơm mẫu, hút – nhả 5 lần, tránh tạo bọt, loại bỏ phần dịch thừa tràn ra ở lỗ còn lại trên chíp. Đặt chíp nằm ngửa, đầu bơm mẫu quay vào trong (pointing in), ly tâm khoảng 30 giây, tiếp tục hút – nhả 5 lần bằng pipette, tránh tạo bọt. Đặt chíp trở lại máy ly tâm, lỗ

bơm mẫu quay ra ngoài (pointing out), ly tâm khoảng 30 giây, tiếp tục hút – nhả 5 lần bằng pipette, tránh tạo bọt. Đặt chíp nằm ngửa, đầu bơm mẫu quay vào trong (pointing in), ly tâm khoảng 30 giây, hút bỏ toàn bộ chất lỏng ra khỏi chíp. Đặt chíp trở lại bàn kẹp chíp, tiến hành chạy theo chương trình đã được thiết lập sẵn. Thời gian chạy máy mất khoảng 4 giờ. Phần mềm Torrent Suite™ Software được dùng để phân tích và so đối trình tự gene trên cơ sở dữ liệu NCBI. Mức tương đồng để định danh loài vi khuẩn chúng tôi chọn 99% và 100%.

2.8. Phương pháp phát hiện gene kháng thuốc (phụ lục 8)

2.9. Thu thập số liệu và phân tích dữ liệu

2.9.1. Thu thập số liệu

2.9.1.1. Nhân sự

Người thực hiện NC, các Điều Dưỡng hỗ trợ nội soi phế quản.

2.9.1.2. Phương pháp thu thập số liệu

Thời điểm thu thập số liệu: ngay trước khi BN ra khỏi khoa ICU nội, ICU ngoại và khoa Nội Thân Kinh, hoặc ngay trước khi hồ sơ được trả về phòng kế hoạch tổng hợp. Điền đầy đủ các mục của bản thu thập số liệu của các thông tin từ hồ sơ bệnh án.

2.9.1.3. Công cụ thu thập số liệu

Một máy tính cầm tay có các phép tính đơn giản để thực hiện chuyển đổi các thông số sinh học. Sử dụng bản thu thập số liệu được soạn sẵn (**phụ lục 1**).

2.9.1.4. Phân tích dữ liệu

- Xử lý số liệu:

Kiểm tra số liệu: chỉ ghi vào bản thu thập số liệu khi bệnh nhân ra khỏi khoa ICU. Tất cả các mục của bản thu thập số liệu đều được ghi đầy đủ và kiểm tra cẩn thận. Làm sạch số liệu: những phiếu không ghi đầy đủ 100% các mục đều bị loại

bỏ. Các dữ liệu sau khi thu thập được nhập liệu bằng phần mềm Epi 3.1, xử lý số liệu bằng phần mềm R 3.1.3.

- Phân tích dữ liệu:

Thống kê mô tả: Trung bình và độ lệch chuẩn được dùng mô tả biến định lượng (ví dụ: tuổi). Khi dữ liệu định lượng có phân phối không bình thường (lệch) thì trung vị và khoảng tứ phân vị được dùng để báo cáo (ví dụ: thời gian thở máy trước nội soi phế quản, thời gian nằm viện và thang điểm APACHE II). Với số liệu dạng định tính như giới, phân loại kháng sinh sử dụng ban đầu, phân bố gene kháng thuốc phát hiện được thì tần số và tỉ lệ phần trăm sẽ được báo cáo.

Thống kê phân tích: Để xác định mối liên quan giữa nhiễm trùng bệnh viện (có/không) và các đặc điểm của đối tượng dạng định tính (ví dụ giới, sử dụng an thần) thì kiểm định Chi bình phương được sử dụng. Khi có 25% vng trị < 5 hoặc tần số trong ô < 5 thì phép kiểm chính xác Fisher được dùng thay thế kiểm định Chi bình phương. Phương pháp hồi qui logistic được dùng để tính tỉ số số chênh (OR # Odds Ratio) và khoảng tin cậy 95% của OR. Các kiểm định được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Giá trị OR được xem là có tác động khi KTC 95% của OR không chứa 1. Tất cả các số liệu NC được thực hiện phân tích bằng phần mềm R phiên bản 3.1.3.

2.10. Đạo đức trong nghiên cứu:

Nghiên cứu này trước khi tiến hành đã được xét duyệt và thông qua bởi Hội Đồng Y Đức của trường Đại Học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh. Số chứng nhận là 276/ĐHYD-HĐ, ngày 14 tháng 10 năm 2014 (**phụ lục 2, 3**).

2.11. Liệt kê và định nghĩa các biến số:

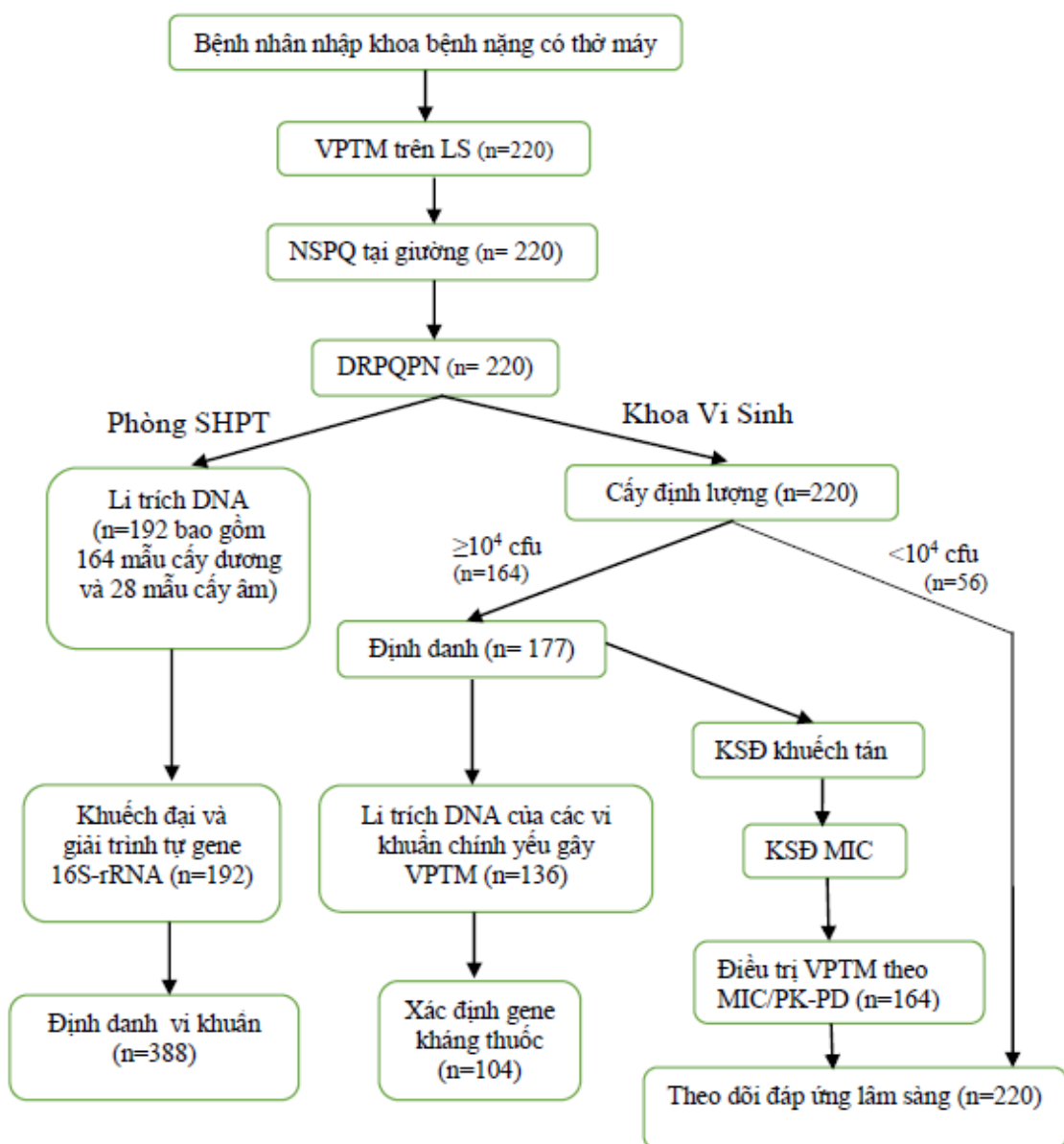
- Biến số nền: bao gồm các biến số như tuổi, giới, lí do chính nhập viện, bệnh nền, thang điểm APACHE II. Trong đó biến tuổi và APACHE II là hai biến định lượng, các biến còn lại là các biến nhị giá.

- Biến số độc lập: sử dụng thuốc an thần – dẫn cơ, dùng thuốc dạ dày, đặt lại nội khí quản, ngày xuất hiện VPTM, kháng sinh đang dùng, số ngày dùng kháng sinh, biến

chúng nội soi phế quản. Trong đó hai biến số ngày xuất hiện VP và số ngày dùng kháng sinh là hai biến định lượng, các biến còn lại là biến nhị giá.

- Biến phụ thuộc: kết quả cấy đàm định lượng, định danh VK theo kinh điển, kháng sinh đồ bằng đĩa khuếch tán, kháng sinh đồ định lượng MIC, giải trình tự 16S-rRNA thể hệ mới, gen đột biến, kết quả điều trị. Trong đó kháng sinh đồ định lượng MIC là biến số định lượng, các biến còn lại là biến nhị giá (**phụ lục 11**).

2.12. Sơ đồ nghiên cứu



Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian lấy mẫu nghiên cứu từ ngày 3/11/2014 đến ngày 30/9/2015, chúng tôi tuyển chọn được 220 bệnh nhân thở máy. Các bệnh nhân được tuyển chọn từ các khoa Hồi Sức Tích Cực Chống Độc (ICU nội), Phẫu Thuật Gây Mê Hồi Sức (ICU ngoại) và phòng Đột quỵ của khoa Nội Thần Kinh BV NDGD. Tất cả các bệnh nhân này đều thỏa tiêu chuẩn VPTM trên lâm sàng và đều được nội soi phế quản tại giường. Trong đó có 12 bệnh nhân được tuyển chọn vào nghiên cứu hai lần (do bệnh nhân tái nhập viện và nhập vào khoa ICU trong thời gian lấy mẫu).

3.1. Đặc điểm chung

Trong mẫu nghiên cứu nam giới chiếm gần 50%. Tuổi trung bình là $71 \pm 16,7$. Phần lớn bệnh nhân được tuyển chọn từ khoa ICU nội (79%) (**Bảng 3.1**). Hai nguyên nhân thường gặp khiến bệnh nhân phải nhập viện là khó thở và rối loạn tri giác (60%). Trong số bệnh nhân có bệnh nền, cao huyết áp là bệnh nền thường gặp nhất chiếm (62%), kế tiếp là tiểu đường (39%). Còn lại bệnh thận mạn và COPD chiếm 13%. Các bệnh nền khác chiếm tỉ lệ dưới 10%. Hơn 75% bệnh nhân được chẩn đoán VPTM khởi phát sau 5 ngày. Thời điểm nội soi phế quản tại giường có trung vị là 9 ngày (dao động từ 2 ngày đến 83 ngày). Không ghi nhận trường hợp nào có xảy ra biến chứng trong quá trình thực hiện thủ thuật nội soi phế quản tại giường. Hơn nữa, trung vị của số ngày bệnh nhân nằm điều trị tại các khoa bệnh nặng có thở máy là 16 ngày (dao động từ 3 ngày đến 135 ngày). Ngoài ra, 75% bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu có thang điểm APACHE II từ 18 điểm trở lên.

Bảng 3.1: Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân nghiên cứu (n = 220)

Đặc điểm	Thông kê
Tuổi (năm; trung bình (\pm độ lệch chuẩn))	70,7 (\pm 16,7)
	Số ca (tỉ lệ %)
Giới (nam)	109 (49,5)
Phân loại khoa	
Hồi Sức Tích Cực Chống Độc	174 (79,1)
Phẫu Thuật Gây Mê Hồi Sức	43 (19,5)
Phòng Đột quỵ Khoa Nội Thần Kinh	3 (1,4)
Lý do chính nhập viện	
Khó thở	92 (41,8)
Rối loạn tri giác	39 (17,7)
Tai nạn giao thông	14 (6,4)
Đau bụng	13 (5,9)
Sốt	7 (3,2)
Tai nạn sinh hoạt	7 (3,2)
Ngưng tim ngưng thở	5 (2,3)
Tiền sử bệnh	
Tăng huyết áp	113 (62,4)
Đái tháo đường	70 (38,6)
Bệnh thận mạn	24 (13,2)
COPD	24 (13,2)
khác†	79 (36)
Sử dụng an thần	
Midazolam	118 (53,6)
Fentanyl	79 (35,9)
Seduxen	14 (6,4)
khác	7 (3,2)

Đặc điểm	Thống kê
Sử dụng thuốc dạ dày	
PPI	199 (91,3)
Kháng H2	19 (8,7)
Đặt lại nội khí quản	
Một lần	22 (88)
Ba lần	3 (12)
	Trung vị (khoảng tứ phân vị)
Số ngày thở máy trước NSPQ	9 (6 – 11,5)
Thang điểm APACHE II	22 (18 - 28)
Thời gian nằm ICU	16 (11 - 25)

Chú thích: † (n (%)): ung thư giai đoạn cuối: 20 (11); xuất huyết não: 19 (10); lao phổi: 14 (7); suy tim: 9 (5); nhồi máu cơ tim cấp: 7 (4); nhồi máu não: 4 (2); xuất huyết tiêu hóa, nhiễm khuẩn đường tiêu, phì đại tiền liệt tuyến: 2 (1); khác: 4 (2).

3.2. Định danh vi khuẩn dựa trên vi sinh kinh điển

Trong số 220 bệnh nhân được chẩn đoán VPTM trên lâm sàng đều trải qua nội soi phế quản tại giường. Các mẫu dịch rửa phế quản phế nang này được cấy định lượng. Có 164 mẫu thỏa tiêu chuẩn $\geq 10^4$ cfu/ml. Trong đó có 13 mẫu cấy dương tính đồng thời với hai loài VK khác nhau. Bao gồm *A. baumannii* và *K. pneumoniae*; *A. baumannii* và *P. aeruginosa*; *Klebsiella spp* và *P. aeruginosa* đều có ba mẫu. Còn lại *E. coli* và *K. pneumoniae*; *K. pneumoniae* và *Burkholderia cepacia*; *Staphylococcus aureus* và *A. baumannii*; *Staphylococcus aureus* và *P. aeruginosa* đều có một mẫu. Như vậy chúng tôi phân lập được 177 VK, chia thành 11 loài (**Bảng 3.2**). Ba loài VK phân lập phổ biến nhất là *Acinetobacter spp* 75 (42%), *Klebsiella spp* 39 (23%) và *P. aeruginosa* 29 (16%). Các loài VK còn lại phân lập được chiếm dưới 5%.

Bảng 3.2: Phân bố vi khuẩn phân lập được bằng định danh truyền thống (n = 177)

Vi khuẩn	Số ca (tỉ lệ %)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	55 (31)
<i>Acinetobacter spp</i>	20 (11,3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38 (21,5)
<i>Klebsiella spp</i>	1 (0,5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29 (16,3)
<i>Escherichia coli</i>	9 (5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (5)
<i>Burkholderia cepacia</i>	8 (4,5)
<i>Enterobacter cloace</i>	2 (1,1)
<i>Enterobacter spp</i>	1 (0,5)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 (1,1)
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 (0,5)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (0,5)
<i>Chryobacterium indologens</i>	1 (0,5)

Chú ý: phần trăm tính theo cột.

3.3. Định danh vi khuẩn dựa trên giải trình tự gene 16S-rRNA

Tổng số có 220 mẫu dịch rửa phế quản phế nang được chuyển tới phòng sinh học phân tử của Trung Tâm Pháp Y thành phố Hồ Chí Minh. Trong đó có 164 mẫu cấy dương và 56 mẫu cấy âm (tất cả các mẫu dịch rửa phế quản phế nang này đều được mã hóa tương đồng với các mẫu gửi tới Khoa Vi Sinh của bệnh viện Nhân Dân Gia Định). Trong số 164 mẫu cấy dương chúng tôi chọn ra 96 mẫu cho một lần chạy giải trình tự đầu tiên (các mẫu cho lần giải trình tự đầu tiên này đều trên các mẫu dịch rửa phế quản phế nang tương đồng với vi sinh truyền thống có kết quả cấy dương tính (mẫu cấy dương)). Trên 56 mẫu cấy âm chúng tôi chọn ra 28 mẫu cùng

với 68 mẫu cây dương còn lại (tổng số 96 mẫu) cho một lần giải trình tự tiếp theo (tất cả các mẫu cây dương đều được giải trình tự).

Kết quả chung cho hai lần giải trình tự PGM thu được 76 mẫu cho kết quả cuối cùng. Bao gồm 68 mẫu từ các mẫu cây dương và 8 mẫu từ các mẫu cây âm. Trong 68 mẫu cây dương (có 2 mẫu cây dương đồng thời với 2 loài VK) gồm 34 mẫu *Acinetobacter baumannii*, 14 mẫu *Klebsiella pneumoniae* và 7 mẫu *Pseudomonas aeruginosa*. Ngoài ra còn có các mẫu khác như 4 mẫu *Escherichia coli*, 4 mẫu *Staphylococcus aureus* và 4 mẫu *Burkholderia cepacia*. Các loài còn lại *Enterobacter cloacae*, *Haemophilus influenzae* và *Stenotrophomonas maltophilia* đều có một mẫu (**phụ lục 10**). Trên 76 mẫu thu được cuối cùng này chúng tôi định danh được 388 vi khuẩn chia thành 109 loài khác nhau. Trong đó có 99 loài được định danh dựa trên các chuỗi trình tự có chiều dài tổng số a xít nucleic ≥ 200 pb (**Biểu đồ 3.1**). Bảy loài VK phổ biến nhất là *Acinetobacter* spp (bao gồm *Acinetobacter baumannii* và *Acinetobacter* spp) chiếm tỉ lệ 20%, *Pseudomonas* spp (bao gồm *Pseudomonas aeruginosa* và *Pseudomonas* spp) chiếm tỉ lệ cao thứ hai là 10%. Đồng chiếm tỉ lệ cao thứ hai (10%) là các loài *prevotella* spp. Các loài *Staphylococcus* spp (bao gồm *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus* spp) chiếm tỉ lệ cao thứ ba là 6,7%. Cả hai loài vi khuẩn *Klebsiella* spp (bao gồm *Klebsiella pneumoniae* và *Klebsiella* spp) và *Haemophilus* spp (bao gồm *Haemophilus influenzae* và *Haemophilus* spp) đều chiếm tỉ lệ 5,7%. Đối với các loài *Burkholderia* spp (bao gồm *Burkholderia cepacia* và *Burkholderia* spp) chiếm tỉ lệ cao tiếp theo là 5,4%. Các loài vi khuẩn còn lại chiếm tỉ lệ dưới 3,5%.

Có tất cả 116 mẫu bao gồm 96 mẫu cây dương và 20 mẫu cây âm của hai lần chạy giải trình tự cho kết quả là các chuỗi trình tự không đủ chiều dài để bao phủ được các vùng trình tự đích ban đầu đã được thiết kế. Ngoài ra kết quả còn thu được là các chuỗi trình tự gene 16S-rRNA của các loài *Homo sapiens*.



Biểu đồ 3.1. Phân tích cụm trên 99 loài vi khuẩn định danh bằng giải trình tự 16S-rRNA

Nhận xét: Phương pháp phân tích cụm trên dữ liệu trình tự DNA được thực hiện để phát hiện những VK có cấu trúc DNA giống hay khác nhau, và kết quả phân tích được trình bày trong **Biểu đồ 3.1**. Mỗi liên quan giữa các VK được thể hiện qua hệ số tương quan, và hệ số tương quan được thể hiện bằng chiều cao của các cụm trên biểu đồ. Chiều cao các cụm càng thấp tương đương với mức độ liên quan càng cao; ngược lại, chiều cao càng cao thì mức độ tương quan càng thấp. Các VK có cấu trúc di truyền giống nhau nhất được xếp gần nhau tạo nên các cụm nhỏ. Các cụm nhỏ này được liên kết với nhau bởi các VK hoặc các cụm VK có cấu trúc di truyền ít giống nhau hơn để tạo thành một cụm lớn hơn. Cuối cùng, các cụm này được liên kết lại với nhau để tạo ra một khối VK đồng nhất. Kết quả phân tích cho thấy có 5 cụm VK chính như sau:

Cụm lớn thứ nhất bao gồm 12 loài VK từ *Peptostreptococcus stomatis* đến *Veillonella parvula*. Trong cụm đầu tiên này, hai VK *Peptostreptococcus stomatis* (cầu khuẩn Gram dương yếm khí) và *Bacillus coagulans* (trực khuẩn Gram dương yếm khí tùy nghi) được xếp gần nhau. Hai VK thuộc họ *Cyanobacteria* là *Chroococcidiopsis thermalis* và *Calothrix desertica* được xếp gần nhau. Cả bốn VK này tạo nên một cụm nhỏ thứ nhất. Tương tự ba liên cầu Gram dương tùy nghi yếm khí bao gồm *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus salivarius* và *Streptococcus* spp được xếp gần nhau. Hai cầu khuẩn Gram dương yếm khí tùy nghi *Vagococcus entomophilus* và *Enterococcus* spp được xếp gần nhau. Năm cầu khuẩn Gram dương yếm khí tùy nghi này cùng nối kết với *Lactobacillus* spp, một trực khuẩn Gram dương thành một cụm nhỏ thứ hai. Hai cụm nhỏ này được nối kết với một cầu khuẩn Gram dương khác, ít giống nhau hơn so với các VK cùng nhóm, *Gemella* spp. Tất cả VK này lại nối kết với một cầu khuẩn Gram âm yếm khí tuyệt đối, *Veillonella parvula*, tạo nên một cụm riêng biệt đầu tiên đặc trưng bởi các cầu khuẩn Gram dương yếm khí tùy nghi là chính yếu.

Ở cụm lớn thứ hai bao gồm 29 VK, kể cả các VK từ *Nocardia* spp đến *Diaphorobacter* spp. Trong cụm này đặc trưng chính yếu của các trực khuẩn Gram âm, tùy nghi yếm khí và hiếu khí. Điển hình như: các loài *Acinetobacter* spp,

Klebsiella spp, *Pseudomonas* spp, *Shigella* spp, *Sphingomonas* spp, *Sphingopyxis* spp và *Diaphorobacter* spp.

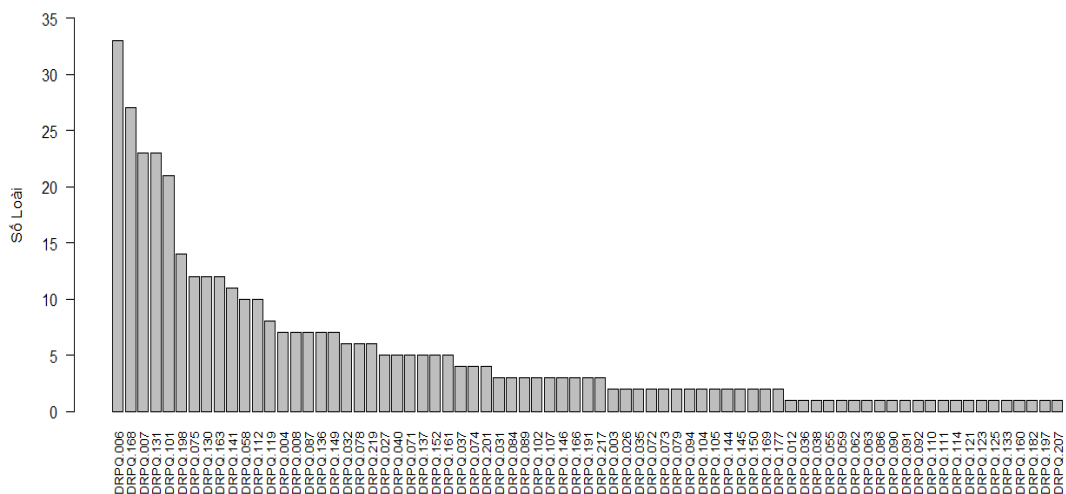
Cụm lớn thứ ba bao gồm 20 loài VK khác nhau từ *Prevotella salivae* đến *Prevotella loescheii*. Trong cụm này hầu hết các trực khuẩn Gram âm yếm khí xếp rất gần nhau. Điển hình đặc trưng trong nhóm này là các loài *Prevotella* spp.

Cụm thứ tư bao gồm 4 cụm nhỏ chứa đựng 21 loài VK từ *Aeromonas* spp đến *Corynebacterium striatum*. Trong cụm này có các cầu – trực khuẩn Gram âm tùy nghi yếm khí như *Aeromonas* spp, họ *Pasteuellaceae* và các cầu khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* và *Micrococcus*.

Cụm thứ năm bao gồm 17 loài VK từ *Haemophilus aegyptius* đến *Burkholderia* spp. Hầu hết các VK trong cụm này là các trực khuẩn hay cầu khuẩn Gram âm, yếm khí tùy nghi. *Burkholderia* spp được coi như là một VK có cấu trúc di truyền hoàn toàn khác so với các VK còn lại.

3.4. Tổng số loài vi khuẩn phát hiện được trên từng mẫu dịch rửa phế quản phế nang

Số loài VK phát hiện được nhiều nhất trên một mẫu dịch rửa phế quản phế nang là 32 loài. Số loài phát hiện được ít nhất là một loài.



Biểu đồ 3.2: Số loài vi khuẩn phát hiện trên từng mẫu dịch rửa phế quản phế nang

3.5. So sánh giữa giải trình tự gene 16S-rRNA và vi sinh kính hiển trong định danh vi khuẩn

Trên 34 mẫu *A. baumannii*, đồng thuận giữa cây và PGM là 91,2% (31/34) (**phụ lục 10**). Ngoài ra có ba trường hợp không đồng thuận giữa kết quả cây và giải trình tự. Trong đó hai trường hợp có kết quả giải trình tự đều cho ra *Burkholderia* spp và một trường hợp là *S. aureus* và *Alloprevotella rava*.

Trên 14 mẫu *K. pneumoniae* (một trường hợp đồng nhiễm với *B. cepacia*), đồng thuận giữa cây và PGM là 35,7% (5/14). Có 9 trường hợp không đồng thuận giữa cây và PGM. Trong đó có 3 trường hợp cây là *K. pneumoniae*, nhưng giải trình tự đều định danh là *A. baumannii*. Một trường hợp cây *K. pneumoniae*, giải trình tự cho ra *Bacillus coagulans*, *Burkholderia* spp, *Calothrix desertica*, *Neisseria* spp, *Pseudomonas* spp, *Rhodospirillum oryzae*. Ngoài ra có một trường hợp cây *K. pneumoniae*, nhưng giải trình tự cho ra *Bacteroides pyogenes*, *Parvimonas micra*, *Prevotella* spp, *S. aureus*. Một trường hợp đồng nhiễm *K. pneumoniae* và *Burkholderia cepacia*, giải trình tự ra *B. cepacia* và *Haemophilus* spp. Các trường hợp còn lại giải trình tự cho ra kết quả *H. aegyptius*, *Elizabethkingia* spp, *Pseudomonas* spp.

Đối với *P. aeruginosa*, tính đồng thuận giữa cây và PGM là 85,7% (6/7). Chỉ có một trường hợp giải trình tự cho ra *A. baumannii*.

Đối với 4 trường hợp *Escherichia coli* không có trường hợp nào đồng thuận giữa cây và PGM. Trường hợp thứ nhất cây là *E. coli*, giải trình tự là *A. baumannii*, *Corynebacterium striatum* và *Veillonella* spp. Kết quả giải trình tự thứ hai là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *Veillonella* spp. Kết quả giải trình tự thứ ba và thứ tư đều cho kết quả là *A. baumannii*. Chỉ có một trong bốn trường hợp *S. aureus*, giải trình tự cho ra *A. baumannii* và *Prevotella baroniae*. Tương tự chỉ có một trong ba trường hợp *Burkholderia cepacia*, giải trình tự cho ra *Corynebacterium striatum*. Một trường hợp cây *S. maltophilia*, giải trình tự là *Pseudomonas* spp và cây là *Enterobacter cloacae*, giải trình tự là *Streptococcus* spp. Một trường hợp *H. influenzae*, có sự đồng thuận giữa cây và PGM.

Bảng 3.3. So sánh hai phương pháp định danh vi khuẩn dựa vào nuôi cấy và giải trình tự trên hệ thống PGM

Đồng thuận giữa nuôi cấy và PGM	Trực khuẩn gr (-) yếm khí tùy nghi
<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Actinobacillus lignieresii</i>
<i>Klebsiella</i> spp	<i>Aeromonas</i> spp
<i>Pseudomonas</i> spp	<i>Calothrix desertica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Chroococciopsis thermalis</i>
<i>Burkholderia</i> spp	<i>Erwinia psidii</i>
<i>Haemophilus</i> spp	<i>Shigella</i> spp
Các loài chỉ định danh bằng PGM	Trực khuẩn gr (+) yếm khí
Trực khuẩn gr (-) yếm khí	<i>Atopobium rimae</i>
<i>Alloprevotella rava</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Bacteroides pyogenes</i>	Trực khuẩn gr (+) hiếu khí
<i>Catonella morbi</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Fusobacterium</i> spp	<i>Corynebacterium striatum</i>
<i>Pectobacterium</i> spp	Cầu khuẩn gr (+) yếm khí tùy nghi
<i>Porphyromonas</i> spp	<i>Gemella</i> spp
<i>Prevotella</i> spp	<i>Granulicatella adiacens</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Rothia mucilaginoso</i>
<i>Shewanella profunda</i>	<i>Vagococcus entomophilus</i>
<i>Tannerella forsythia</i>	Cầu khuẩn gr (+) yếm khí
Trực khuẩn gr (-) hiếu khí	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>
<i>Aureimonas glaciistagni</i>	Liên cầu gr (+) yếm khí tùy nghi
<i>Diaphorobacter</i> spp	<i>Streptococcus</i> spp
<i>Elizabethkingia</i> spp	Cầu trực khuẩn gr (+) yếm khí tùy nghi
<i>Neisseria</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp
<i>Novosphingobium</i> spp	Cầu trực khuẩn gr (-) yếm khí tùy nghi
<i>Psychrobacter</i> spp	<i>Gallibacterium anatis</i>

<i>Sphingomonas</i> spp	<i>Pasteurella</i> spp
<i>Xoắn khuẩn gr (-) yếm khí tùy nghi</i>	<i>Cầu khuẩn gr (-) yếm khí</i>
<i>Rhodospirillum oryzae</i>	<i>Veillonella parvula</i>

Nhận xét: Tính chung, đồng thuận giữa cây và PGM là 75% (57/76). Có 19 trong 76 trường hợp không có sự đồng thuận giữa vi sinh kính điển và giải trình tự gene 16S-rRNA đối với chín loài VK gram âm, hiếu khí, dễ mọc được xác định là tác nhân gây VPTM. Đó là các VK thường thấy trên lâm sàng được phân lập được từ các bệnh nhân VPTM như: *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp. Hơn nữa, còn có các VK khác như: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* spp, *Enterobacter* spp, *Stenotrophomonas* spp, *Haemophilus* spp, (**Bảng 3.3**). Ngoài ra, giải trình tự gene trên hệ thống Ion Torrent PGM còn định danh được các loài VK khác nữa. Trong đó các loài trực khuẩn Gram âm yếm khí chiếm nhiều nhất lên tới 10 loài. Trong đó hàng đầu là các VK *Prevotella* spp. Chiếm tỉ lệ cao thứ hai là các trực khuẩn Gram âm hiếu khí khó mọc có 7 loài. Tiếp theo là các trực khuẩn Gram âm yếm khí tùy nghi chiếm 6 loài và các cầu khuẩn Gram dương yếm khí tùy nghi chiếm 4 loài. Các loài trực khuẩn Gram dương hiếu hay yếm khí và cầu trực khuẩn Gram âm yếm khí tùy nghi đều có 2 loài. Các loài VK còn lại như: cầu khuẩn và liên cầu Gram dương yếm khí tùy nghi, cầu trực khuẩn Gram dương yếm khí tùy nghi, cầu khuẩn Gram âm yếm khí và xoắn khuẩn đều có một loài.

3.6. Tính độ nhạy và độ đặc hiệu của PGM

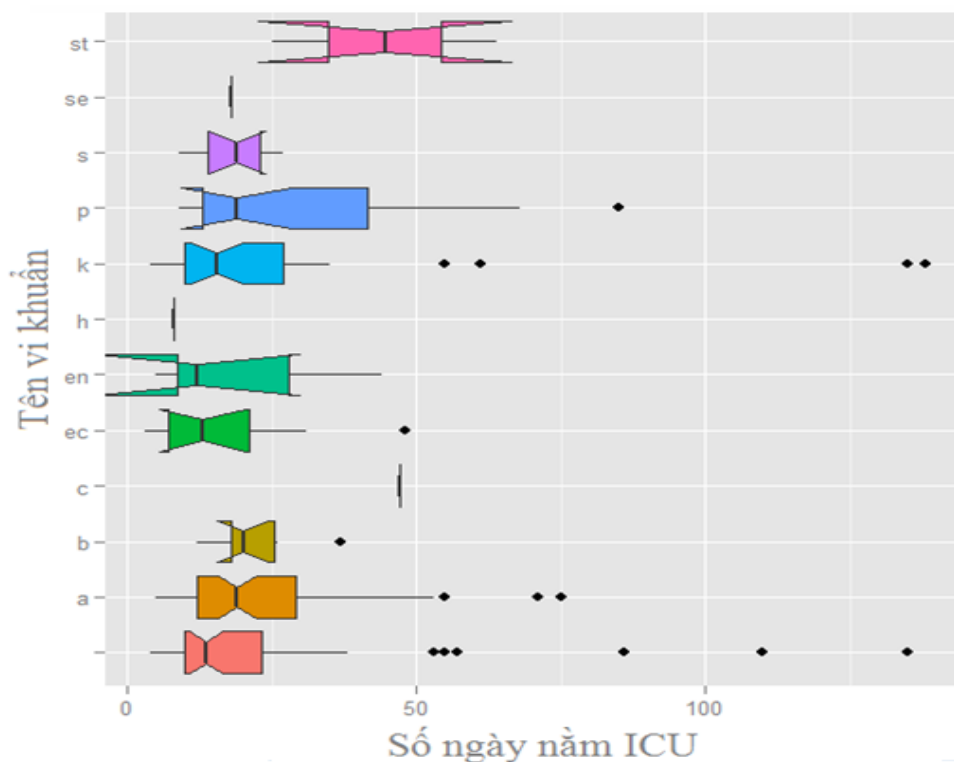
Bảng 3.4. Độ nhạy và độ đặc hiệu của PGM

Kết quả	Cây dương	Cây âm	Tổng số
PGM dương	372	16	398
PGM âm	16	1	17

Nếu dùng kết quả cấy là tiêu chuẩn vàng, thì độ nhạy và độ đặc hiệu của PGM lần lượt là 93,5% (372 / 398), và ~6% (1 / 17).

3.7. Thời gian nằm ICU và tác nhân vi khuẩn gây viêm phổi thở máy

Tính trung bình trung vị của VPTM là 16 ngày. Có sự khác nhau giữa trung vị VPTM của các tác nhân VK. Như đối với *A. baumannii*, *P. aeruginosa* và *Staphylococcus aureus* có trung vị gần 20 ngày; *K. pneumoniae* là 18 ngày; *E. coli* và *Enterobacter cloace* là ngắn nhất 14 ngày. Tuy nhiên đối với *Stenotrophomonas maltophilia* có trung vị là gần 45 ngày.



Biểu đồ 3.3: Mối liên quan giữa vi khuẩn phân lập được và số ngày nằm ICU

Chú thích: a - ■: *Acinetobacter baumannii*; b - ■: *Burkholderia cepacia*; c - ■: *Chryseobacterium indologenes*; ec - ■: *Escherichia coli*; en - ■: *Enterobacter cloace*; h - ■: *Haemophilus influenzae*; k - ■: *Klebsiella pneumoniae*; p - ■: *Pseudomonas aeruginosa*; s - ■: *Staphylococcus aureus*; se - ■: *Serratia marcescens*; st - ■: *Stenotrophomonas maltophilia*.

3.8. Kết quả kháng sinh đồ

3.8.1. Kết quả kháng sinh đồ khuếch tán chung

Có 1701 đĩa kháng sinh được dùng để thực hiện kháng sinh đồ theo phương pháp Bauer–Kirby, trong đó kháng sinh đồ levofloxacin, meropenem, imipenem, amikacin chiếm tỉ lệ cao nhất gần 10%. Các kháng sinh còn lại chiếm dưới 9% bao gồm: piperacillin – tazobactam, cefepime, cefoperazone - sulbactam, colistin, ciprofloxacin, genetamycin, Ceftriaxone, ertapenem và cefoperazone. Gần 85% các VK phân lập được là đa kháng (**Bảng 3.5**).

Bảng 3.5. Kết quả kháng sinh đồ khuếch tán chung

Kháng sinh	Tỉ lệ đề kháng (số ca, tỉ lệ %)
Cefoperazone	14 (63,6)
Ceftazidime	132 (80)
Ceftriaxone	68 (88,3)
Cefoperazon-Sulbactam	20 (16,8)
Cefepime	105 (75)
Piperacillin-Tazobactam	97 (64,2)
Imipenem	114 (70,8)
Meropenem	105 (63,2)
Ertapenem	15 (39,4)
Amikacin	87 (53,7)
Genetamycin	73 (70,1)
Ciprofloxacin	86 (77,4)
Levofloxacin	120 (71,8)
Colistin	2 (1,6)

Ghi chú: phần trăm tính theo dòng.

3.8.2. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với *Acinetobacter* spp

Acinetobacter spp nhạy cảm đối với colistin và cefoperazone - sulbactam lần lượt là 98% và 93% (**Bảng 3.6**). Tuy nhiên *Acinetobacter* spp kháng với hầu hết các kháng sinh còn lại được thực hiện kháng sinh đồ. *Acinetobacter* spp kháng với nhóm carbapenem bao gồm imipenem và meropenem trên 90%. VK này còn kháng piperacillin - tazobactam và các cephalosporine thế hệ ba và bốn đến 95%. Hơn nữa *Acinetobacter* spp còn kháng với nhóm aminoglycoside bao gồm amikacin và genetamycin hơn ba phần tư các trường hợp. Ngoài ra *Acinetobacter* spp kháng với ciprofloxacin và levofloxacin cũng trên 90%.

Bảng 3.6. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với *Acinetobacter* spp

Kháng sinh	Tỉ lệ đề kháng (số ca, tỉ lệ %)
Ceftazidime	68 (93,2)
Ceftriaxone	40 (95,2)
Cefoperazon-Sulbactam	3 (4,3)
Cefepime	59 (93,6)
Piperacillin-Tazobactam	58 (95)
Imipenem	69 (93,2)
Meropenem	67 (90,5)
Amikacin	56 (77,8)
Genetamycin	37 (84,1)
Ciprofloxacin	40 (95,2)
Levofloxacin	65 (91,5)
Colistin	1 (1,5)

Ghi chú: phần trăm tính theo dòng.

3.8.3. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với *klebsiella* spp

Klebsiella spp nhạy cảm đối với carbapenem bao gồm imipenem (69%) và meropenem (80%). Ngoài ra đối với kháng sinh nhóm aminoglycoside bao gồm amikacin và genetamycin, *Klebsiella* spp nhạy cảm với hai kháng sinh này lần lượt là 95% và 72%. Hơn nữa *Klebsiella* spp nhạy với cefoperazon - sulbactam 68%. Chưa ghi nhận trường hợp nào *Klebsiella* spp kháng với colistin (**Bảng 3.7**). Tuy nhiên *Klebsiella* spp kháng đối với cefoperazone, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime và piperacillin - tazobactam từ 60% đến 80%. Bên cạnh đó đối với nhóm kháng sinh fluoroquinolone, *Klebsiella* spp kháng với ciprofloxacin và levofloxacin lần lượt là 53% và 57%. Ngoài ra *Klebsiella* spp kháng với ertapenem 46%.

Bảng 3.7. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với *klebsiella* spp

Kháng sinh	Tỉ lệ đề kháng (số ca, tỉ lệ %)
Cefoperazone	11 (73,3)
Ceftazidime	29 (76,3)
Ceftriaxone	24 (82,7)
Cefoperazon-Sulbactam	4 (21)
Cefepime	23 (65,7)
Piperacillin-Tazobactam	25 (64,1)
Imipenem	10 (25,6)
Meropenem	7 (20)
Ertapenem	13 (46,4)
Amikacin	2 (5,1)
Genetamycin	5 (27,8)
Ciprofloxacin	10 (52,6)
Levofloxacin	21 (56,7)
Colistin	0

Ghi chú: phần trăm tính theo dòng.

3.8.4. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với *Pseudomonas* spp

Pseudomonas spp nhạy cảm đối với colistin và piperacillin - tazobactam lần lượt là 95% và 68% (**Bảng 3.8**). Tuy nhiên đối với các kháng sinh cephalosporine thế hệ ba và bốn, cefoperazon - sulbactam, piperacillin - tazobactam, carbapenem nhóm hai, nhóm aminoglycoside và nhóm fluoroquinolone, *Pseudomonas* spp kháng từ 60 đến 86%.

Bảng 3.8. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với *Pseudomonas* spp

Kháng sinh	Tỉ lệ đề kháng (số ca, tỉ lệ %)
Ceftazidime	21 (72,4)
Cefoperazon-Sulbactam	12 (60)
Cefepime	13 (61,9)
Piperacillin-Tazobactam	9 (32,1)
Imipenem	23 (79,3)
Meropenem	25 (86,2)
Amikacin	19 (65,5)
Genetamycin	16 (80)
Ciprofloxacin	20 (80)
Levofloxacin	22 (75,8)
Colistin	1 (5,3)

Ghi chú: phần trăm tính theo dòng.

3.8.5. Kháng sinh đồ khuếch tán đối với *Escherichia coli* và *Burkholderia cepacia*

E. coli chưa ghi nhận kháng amikacin và nhạy cảm đối với imipenem và meropenem lần lượt là 63% và 67%. Ngoài ra *E. coli* nhạy đối với piperacillin - tazobactam 56%. Tuy nhiên *E. coli* kháng cephalosporine thế hệ ba và bốn trên 70%, kháng ciprofloxacin và levofloxacin trên 80%, kháng genetamycin hơn 60%

Burkholderia cepacia nhạy cảm với ceftazidim, cefepime, piperacillin - tazobactam, meropenem và levofloxacin trên 70%. Chưa ghi nhận trường hợp nào *Burkholderia cepacia* kháng cefoperazone - sulbactam. Tuy nhiên *Burkholderia cepacia* kháng imipenem, amikacin và ciprofloxacin trên 70%.

3.8.6. Kháng sinh đề khuếch tán đối với *Staphylococcus aureus*

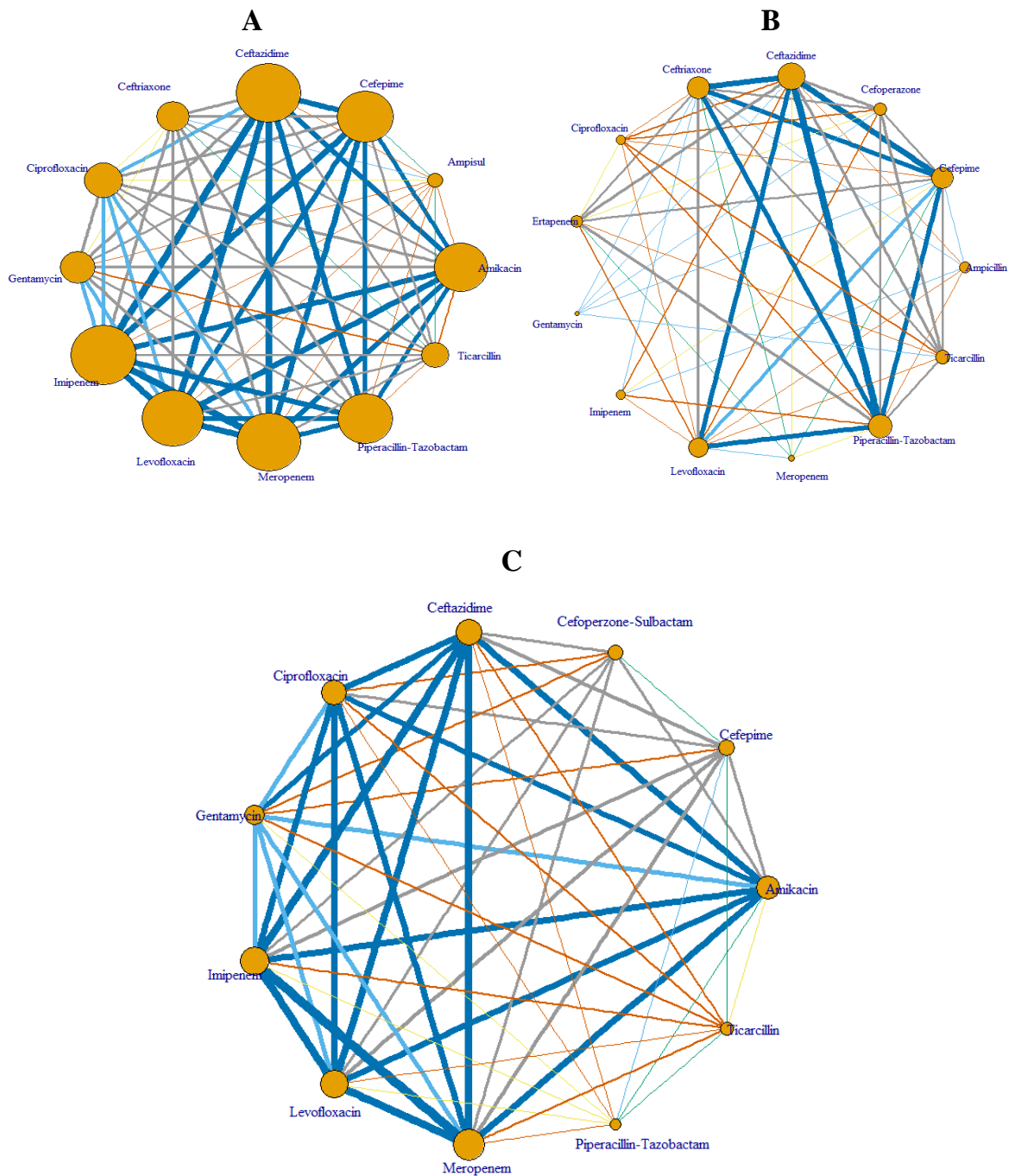
Staphylococcus aureus nhạy với clindamycin gần 70%. Chưa ghi nhận trường hợp nào *Staphylococcus aureus* kháng vancomycin. Tuy nhiên phân nửa các VK *Staphylococcus aureus* phân lập được kháng với doxycillin.

3.8.7. Kháng sinh đề khuếch tán đối với *Enterobacter spp*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia marcescens* và *Chryseobacterium indologens*

Chỉ có một trường hợp kháng ceftazidime, ceftriaxone và piperacillin - tazobactam đối với *Enterobacter spp* (n = 3). Đối với *Stenotrophomonas maltophilia* cả hai trường hợp đều kháng imipenem, meropenem và amikacin. *Stenotrophomonas maltophilia* nhạy với levofloxacin. Đối với *Haemophilus influenzae* nhạy với piperacillin - tazobactam, meropenem và levofloxacin. Đối với *Serratia marcescens* chưa ghi nhận kháng thuốc. Đối với *Chryseobacterium indologens* kháng imipenem, meropenem và amikacin.

3.8.8. Các dạng đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa*

Khuynh hướng đề kháng kháng sinh của *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* hình thành một mạng lưới đa kháng kháng sinh. Mỗi đường nối giữa hai kháng sinh đại diện cho tối thiểu 5 trường hợp bị đề kháng cả hai loại kháng sinh đó. Độ dày của đường nối hai kháng sinh biểu hiện cho mức độ đề kháng của hai kháng sinh đó. Đường nối giữa hai kháng sinh càng dày thì hai kháng sinh đó bị kháng càng cao. Mỗi nốt tròn đại diện cho tối thiểu 5 bệnh nhân. Kích thước của các nốt càng lớn tương ứng với số lượng bệnh nhân sử dụng cả hai loại kháng sinh đó càng nhiều (**Biểu đồ 3.4**).



Biểu đồ 3.4: Mạng lưới của đa kháng kháng sinh đối với *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*

Ghi chú: Biểu đồ mạng lưới đa kháng đối với *Acinetobacter baumannii* (A), *Klebsiella pneumoniae* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C).

3.9. Kết quả kháng sinh đồ MIC dựa trên E-test

3.9.1. Kháng sinh đồ MIC đối với *Acinetobacter baumannii*

Theo tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng MIC, hơn phân nửa các trường hợp *Acinetobacter* spp có MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ đối với sulbactam. Ngoài ra, *Acinetobacter* spp có MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ hơn hai phần ba trường hợp đối với amikacin (**Bảng 3.9**). Với tiêu chuẩn MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, *Acinetobacter* spp đề kháng đối với carbapenem nhóm 2 bao gồm imipnem và meropenem hơn 90% và levofloxacin gần 90%. Đối với colistin, với MIC ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ được gọi là kháng. Như vậy theo tiêu chuẩn này thì *Acinetobacter* spp kháng colistin chưa tới 2%. Tuy nhiên, có đến 80% các trường hợp MIC của colistin đối với *Acinetobacter* spp là dưới 0,125 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 3.9. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với *Acinetobacter baumannii* (n = 74)

Kháng sinh	Nhạy n (%)	Trung gian n (%)	Kháng n (%)
	MIC ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$
Amikacin	12 (16,2)	10 (13,5)	52 (70,3)
	MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$
Sulbactam	7 (9,5)	26 (35,1)	41 (55,4)
	MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$		MIC ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$
Colistin	73 (98,6)		1 (1,4)
	MIC $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$	MIC > 0,125 $\mu\text{g/ml}$	
Colistin	59 (80)		15 (20)
	MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
Levofloxacin	4 (5,4)	4 (5,4)	66 (89,2)
Imipenem	3 (4)		71 (96)
Meropenem	3 (4)	2 (2,7)	69 (93,2)

Ghi chú: tỉ lệ phần trăm tính theo dòng (trong quá trình lưu chủng trước khi thực hiện kháng sinh đồ MIC có một chủng *A. baumannii* bị chết).

3.9.2. Kháng sinh đồ MIC đối với *Klebsiella Pneumoniae*

Theo tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng MIC, chưa ghi nhận trường hợp nào *K. pneumoniae* kháng amikacin và colistin (**Bảng 3.10**). Tuy nhiên, với tiêu chuẩn kháng sinh đồ MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ được gọi là kháng của *K. pneumoniae* đối với imipenem, meropenem và levofloxacin. Theo tiêu chuẩn này thì ba kháng sinh trên có tỉ lệ đề kháng lần lượt là 23%, 7% và 59%. Ngoài ra, đối với hoạt chất sulbactam đơn lẻ, cùng với tiêu chuẩn MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ được gọi là kháng, thì không có trường hợp nào trong 39 trường hợp *K. pneumoniae* phân lập được còn nhạy đối với hoạt chất sulbactam.

Bảng 3.10. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với *K. Pneumoniae* (n = 39)

Kháng sinh	Nhạy n (%)	Trung gian n (%)	Kháng n (%)
	MIC ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$
Amikacin	37 (94,9)	2 (5,1)	0
	MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$
Sulbactam	0	0	38 (100)
	MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
Colistin	38 (100)	0	0
Levofloxacin	16 (41)	0	23 (59)
	MIC ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
Imipenem	26 (67)	4 (10)	9 (23)
Meropenem	30 (79)	5 (13,1)	3 (7,9)

Ghi chú: tỉ lệ phần trăm tính theo dòng.

3.9.3. Kháng sinh đồ MIC đối với *Pseudomonas aeruginosa* (n = 29)

Với tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ được cho là đề kháng của *P. aeruginosa* đối với amikacin. Theo tiêu chuẩn này thì *P. aeruginosa* đề kháng đối với amikacin gần 60% (Bảng 3.11). Trong trường hợp colistin, trên 29 chủng *P. aeruginosa*, không có chủng VK nào có MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. Hầu hết các chủng *P. aeruginosa* (28/29) đều có MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$. Đối với levofloxacin với MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ được cho là đề kháng của *P. aeruginosa*. Theo tiêu chuẩn này *P. aeruginosa* đề kháng đối với levofloxacin hơn ba phần tư trường hợp. Tương tự *P. aeruginosa* kháng đối với imipenem và meropenem cũng gần ba phần tư và bốn phần năm các trường hợp. Với tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng trên hợp chất sulbactam, khi *P. aeruginosa* có MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ được cho là kháng. Theo tiêu chuẩn như vậy, không có trường hợp nào *P. aeruginosa* còn nhạy với hợp chất này.

Bảng 3.11. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với *Pseudomonas aeruginosa*

Kháng sinh	Nhạy n (%)	Trung gian n (%)	Kháng n (%)
	MIC ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$
Amikacin	10 (34,5)	2 (6,9)	17 (58,6)
	MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
Colistin	28 (96,5)	1 (3,5)	0
Levofloxacin	5 (17,2)	2 (6,9)	22 (75,9)
Imipenem	6 (20,7)	1 (3,4)	22 (75,9)
Meropenem	5 (17,2)		24 (82,8)
	MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$
Sulbactam	0	0	29 (100)

Ghi chú: tỉ lệ phần trăm tính theo dòng.

3.9.4. Kháng sinh đồ MIC đối với *Escherichia coli*

Theo tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng, MIC \geq 64 $\mu\text{g/ml}$ đồng nghĩa với *Escherichia coli* đề kháng đối với amikacin. Theo tiêu chuẩn này thì kết quả cho thấy không có trường hợp nào *Escherichia coli* đề kháng đối với amikacin (**Bảng 3.12**). Đối với levofloxacin, tất cả 9 trường hợp phân lập được *Escherichia coli*, đều có kết quả kháng sinh đồ định lượng MIC \geq 8 $\mu\text{g/ml}$. Tương tự với tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng, với giá trị MIC \geq 8 $\mu\text{g/ml}$ là đề kháng đối với imipenem. Như vậy kết quả cho thấy có tới 3/9 trường hợp *Escherichia coli* đề kháng đối với imipenem. Với tiêu chuẩn tương tự khi áp dụng cho meropenem thì tỉ lệ này chỉ có 1/9 trường hợp *Escherichia coli* đề kháng đối với meropenem.

Bảng 3.12. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với *Escherichia coli*

Kháng sinh	Nhạy n, (%)	Trung gian n, (%)	Kháng n, (%)
	MIC \leq 16 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$	MIC \geq 64 $\mu\text{g/ml}$
Amikacin	8 (89)	1 (11,1)	0
	MIC \leq 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$	MIC \geq 16 $\mu\text{g/ml}$
Sulbactam	0	0	9 (100)
	MIC \leq 2 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC \geq 8 $\mu\text{g/ml}$
Colistin	8 (89)	0	1 (11,1)
Levofloxacin	0	0	9 (100)
	MIC \leq 1 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$	MIC \geq 4 $\mu\text{g/ml}$
Imipenem	6 (66,7)	0	3 (33,3)
Meropenem	7 (77,8)	1 (11,1)	1 (11,1)

Ghi chú: tỉ lệ phần trăm tính theo dòng.

3.9.5. Kháng sinh đồ MIC đối với *Burkholderia cepacia*

Với tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ là *Burkholderia cepacia* kháng đối với amikacin. Theo tiêu chuẩn này thì *Burkholderia cepacia* có tới ba phần tư trường hợp kháng với amikacin (**Bảng 3.13**). Đối với sulbactam, *Burkholderia cepacia* có gần 1/3 trường hợp MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên với tiêu chuẩn MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, có 3/8 trường hợp imipenem vượt mức tiêu chuẩn này. Đối với levofloxacin, có 3/8 trường hợp *Burkholderia cepacia* có MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 3.13. Kết quả kháng sinh đồ MIC đối với *Burkholderia cepacia*

Kháng sinh	Nhạy n, (%)	Trung gian n, (%)	Kháng n, (%)
	MIC ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$
Amikacin	2 (25)	0	6 (75)
	MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$
Sulbactam	3 (43)	2 (28,5)	2 (28,5)
	MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
Colistin	0	1 (14,3)	6 (85,7)
Levofloxacin	4 (50)	1 (12,5)	3 (37,5)
	MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$	MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$	MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$
Imipenem	0	5 (62,5)	3 (37,5)
Meropenem	6 (85,7)	1 (12,5)	0

Ghi chú: tỉ lệ phần trăm tính theo dòng.

3.9.6. Kháng sinh đồ MIC đối với *Enterobacter spp* (n = 3), *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 2), *Haemophilus influenzae* (n = 1) và *Chryseobacterium indologens* (n = 1)

Đối với *Enterobacter spp*: chưa ghi nhận trường hợp nào kháng amikacin, levofloxacin, imipenem và meropenem.

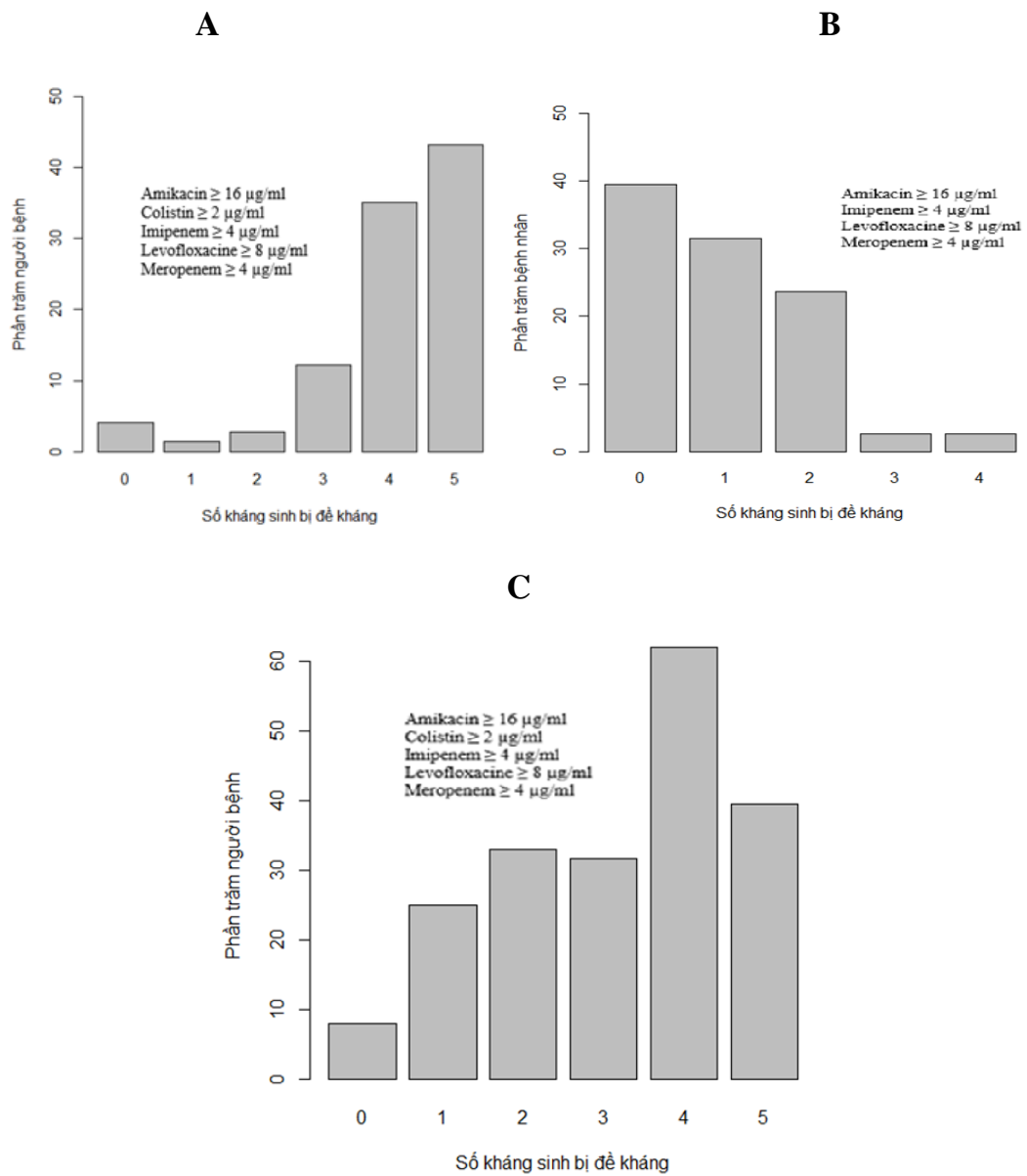
Đối với *Stenotrophomonas maltophilia*: chỉ nhạy với colistin và levofloxacin.

Đối với *Haemophilus influenzae* và *Serratia marcescens*: chưa ghi nhận kháng amikacin, levofloxacin, imipenem và meropenem.

Đối với *Chryseobacterium indologens*: kháng amikacin, imipenem và meropenem.

3.9.7. Số kháng sinh bị đề kháng

Trong sáu loại kháng sinh thực hiện kháng sinh đồ MIC bao gồm: amikacin, colistin, imipenem, levofloxacin, meropenem và sulbactam. Đối với *A. baumannii*: tỉ lệ chỉ kháng một trong sáu kháng sinh này là 1,4%, kháng hai kháng sinh là 2,7%, kháng ba kháng sinh là 12%, kháng bốn kháng sinh là 35% và kháng với năm kháng sinh là 43%. Nhạy hoàn toàn trong sáu kháng sinh trên là 4% (**Biểu đồ 3.5 A**). Đối với *K. pneumoniae*: tỉ lệ kháng một trong bốn kháng sinh amikacin, imipenem, levofloxacin và meropenem là 30%. Tương tự kháng hai kháng sinh là 25%, kháng từ ba đến cả bốn kháng sinh là 2,5%. Tỉ lệ nhạy hoàn toàn cho cả bốn loại kháng sinh này là 60% (**Biểu đồ 3.5 B**). Đối với *P. aeruginosa*: Tỉ lệ kháng bốn trong sáu kháng sinh này là 60%, kháng năm kháng sinh là 40%, chỉ kháng ba kháng sinh là 31%, kháng hai kháng sinh là 34% và kháng với một kháng sinh là 25%. Nhạy hoàn toàn trong sáu kháng sinh trên là 8% (**Biểu đồ 3.5 C**).



Biểu đồ 3.5: Tỷ lệ số kháng sinh bị đề kháng đối với *A. baumannii* (A), *K. pneumoniae* (B), *P. aeruginosa* (C).

3.10. Kết quả PCR tìm gene kháng thuốc

3.10.1. Phân bố gene kháng thuốc phát hiện được từ các VK *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa*

Đối với *Acinetobacter*, ba gene kháng thuốc phát hiện nhiều nhất là TEM, SPM, và SHV. Đối với *Klebsiella*, gene BIC phát hiện nhiều nhất (**Bảng 3.14**).

Bảng 3.14. Phân bố gene kháng thuốc phát hiện được

Gene kháng thuốc	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>
	N (%)		
TEM (964bp)	23 (39,6)	6 (13,9)	0
SPM (271 bp)	14 (22,4)	9 (20,9)	0
SHV (790bp)	9 (15,5)	6 (13,9)	1 (20)
BIC (537 bp)	3 (5,1)	15 (34,9)	0
IMP (232bp)	3 (5,1)	4 (9,3)	2 (40)
KPC (798 bp)	3 (5,1)	0	0
NDM (621 bp)	2 (3,4)	0	2 (40)
OXA (438 bp)	1 (1,7)	1 (6,9)	0

3.10.2. Mối liên quan giữa gene kháng thuốc và đề kháng kháng sinh

Mối liên quan giữa gene kháng thuốc phát hiện ở ba loài VK thường gặp gây VPTM với kháng thuốc trên lâm sàng đều không có ý nghĩa thống kê (**Bảng 3.15**)

Bảng 3.15. Mối liên quan giữa gene kháng thuốc và đề kháng các kháng sinh

Gene	Amikacin	Levofloxacin	Imipenem	Meropenem	Sulbactam
OR (KTC 95%)					
IMP	NA	NA	NA	2,22 0,08-57,9	NA
KPC	2,94 0,13-65	1,94 0,06-56,9	1,67 0,05-58,3	NA	1,29 0,17-9,84
OXA	NA	NA	NA	NA	NA
NDM1	NA	1,67 0,05-91,13	1,48 0,03-62,8	1,57 0,25-9,67	4,55 0,22-94,14
SPM	2,65 0,46-15,17	1,17 0,18-7,76	3,68 0,19-71,1	NA	1,65 0,49-5,51
BIC	NA	NA	NA	1,4 0,31-6,31	NA
TEM	1,08 0,32-3,67	2,03 0,33-12,51	1,32 0,19-9,08	NA	NA
SHV	NA	NA	NA	2,22 0,08-57,9	1,17 0,3-4,73

Ghi chú: NA: not applicable: không áp dụng

3.11. Kết quả điều trị

3.11.1. Kết quả điều trị chung

Bảng 3.16. Kết quả người bệnh ra khỏi khoa chung (n = 220)

Ra khỏi khoa	N (%)
Xuất thường	9 (4,1)
Chuyển khoa	60 (27,3)
Chuyển viện	2 (0,9)
Xuất nặng	94 (42,7)
Tử vong	55 (25)
Tổng số	220

3.11.2. Kết quả điều trị theo nhóm

Bảng 3.17. Kết quả điều trị (n = 220)

Kết quả điều trị	N (%)
Thành công	69 (31,4)
Thất bại	151 (68,6)

Ghi chú:

Thành công = xuất thường + chuyển khoa

Thất bại = chuyển viện + xuất nặng + tử vong

Tỉ lệ tử vong ở bệnh nhân nhiễm *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa* lần lượt là 67%, 60% và 55%. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

Chương 4: BÀN LUẬN

VPTM là một thách thức toàn cầu, nhất là các quốc gia Á Châu trong đó có Việt Nam. VPTM là nguyên nhân hàng đầu gây tăng tỉ lệ tử vong, kéo dài thời gian nằm viện và tăng chi phí điều trị. VPTM được chẩn đoán dựa vào lâm sàng và bằng chứng về vi sinh. Nội soi phế quản ống mềm là cách tốt nhất để tiếp cận đường hô hấp dưới một cách chính xác và hiệu quả. Cho đến hôm nay nội soi phế quản kết hợp cấy đàm định lượng được xem là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán VPTM trên lâm sàng [41]. Hầu hết các NC về VPTM là dựa vào hút đàm qua nội khí quản, cấy đàm bán định lượng và phần ít là cấy đàm định lượng [2], [5], [8], [11], [16]. Hiện nay định danh VK dựa vào vi sinh kính hiển như nhuộm Gram, nuôi cấy và các phản ứng sinh hóa là tiêu chuẩn vàng. Cho đến hôm nay, hầu hết các NC trong nước phân lập VK là dựa vào kiểu hình. Kháng sinh đồ khuếch tán trong thạch của các đĩa giấy có tấm kháng sinh là một thử nghiệm kháng sinh đồ chuẩn mực, thường qui [19]. Kháng sinh đồ định lượng xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được khuyến cáo hiện nay dành cho các VK gây bệnh đa kháng nhất là các VK gây VPTM [27], [61]. Hiện nay trong nước các NC xác định tác nhân VK gây VPTM dựa trên nội soi phế quản tại giường chưa được áp dụng thường qui [5], [18]. Tuy nhiên việc hút đàm qua nội khí quản kết hợp cấy đàm định lượng được áp dụng phổ biến hơn [16], [86], [87]. Hơn nữa việc thực hiện kháng sinh đồ xác định MIC của các VK phân lập được bằng que E-test chưa được áp dụng phổ biến [13]. Ngoài ra việc định danh VK dựa trên giải trình tự thế hệ mới Ion Torrent PGM và tìm gene gây kháng thuốc chưa có số liệu đầy đủ. Chúng tôi đã tiến hành NC nhằm xác định tác nhân VK gây VPTM và gene kháng thuốc tại các khoa Hồi Sức Tích Cực Chống Độc, Phẫu Thuật Gây Mê Hồi Sức và phòng đột quỵ khoa Nội Thần Kinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định. Bệnh nhân nghi ngờ VPTM trên lâm sàng được nội soi phế quản tại giường kết hợp cấy đàm định lượng để tái khẳng định VPTM. Thực hiện kháng sinh đồ MIC bằng que E-test và định danh VK bằng giải trình tự gene 16S-rRNA trên hệ thống Ion Torrent PGM và tìm gene kháng thuốc.

Dựa vào vi sinh kinh điển chúng tôi định danh được 11 loài VK khác nhau như là tác nhân thủ phạm gây VPTM. Tuy nhiên dựa vào giải trình tự gene 16S-rRNA trên hệ thống Ion Torrent PGM, chúng tôi phát hiện được 99 loài VK khác nhau. Tất cả các loài VK phát hiện được bằng phương pháp vi sinh truyền thống đều được thực hiện kháng sinh đồ khuếch tán trên thạch của các đĩa giấy có tấm kháng sinh. Ngoài ra tất cả các VK định danh dựa trên kiểu hình này đều được thực hiện kháng sinh đồ định lượng MIC trên các que E-test. Ba tác nhân VK gây VPTM phổ biến nhất đã được xác định là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*. Dựa trên kết quả kháng sinh đồ thì ba VK vừa kể trên kháng hầu hết các kháng sinh được thực hiện kháng sinh đồ, ngoại trừ colistin.

Tuy nhiên đối với *K. pneumoniae* còn nhạy cao với nhóm carbapenem. Cũng trên ba VK chính yếu gây VPTM vừa kể trên được thực hiện PCR tìm gene kháng thuốc. Các gene TEM, SPM và SHV chiếm tỉ lệ cao ở *A. baumannii*. BIC và SPM là hai gene phát hiện được nhiều nhất đối với *K. pneumoniae*. Đối với *P. aeruginosa* phát hiện hai trường hợp mang gene IMP và NDM1. Mặc dù các gene kháng thuốc đã được phát hiện trên các VK chính yếu gây VPTM. Nhưng không tìm thấy có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa gene kháng thuốc và đề kháng kháng sinh trên lâm sàng.

4.1. Định danh vi khuẩn

4.1.1. Dựa trên vi sinh kinh điển

Qua 11 tháng (từ 11/2014 đến 9/2015), chúng tôi đã cấy định lượng dịch rửa phế quản phế nang của 220 bệnh nhân (bảng 3.1). Kết quả cho thấy có 164 bệnh nhân dương tính với mẫu đàm thỏa tiêu chuẩn $\geq 10^4$ cfu/ml. Theo phương pháp định danh dựa vào kiểu hình: nhuộm Gram, nuôi cấy, đặc tính mọc của VK và các phản ứng sinh hóa. Chúng tôi phân lập được 177 VK, chia thành 11 loài. Trong đó có 13 trường hợp phân lập được hai loài VK khác nhau trên cùng một bệnh nhân. *Acinetobacter* spp là tác nhân gây VPTM được phân lập nhiều nhất gần phân nửa các trường hợp (n = 75). Kế đến là *Klebsiella* spp chiếm gần một phần tư các trường

hợp (n = 39). VK thường gặp thứ ba là *P. aeruginosa* gần một phần sáu các trường hợp (n = 29). Số liệu của chúng tôi cho thấy các tác nhân VK thường gặp gây VPTM là *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter* spp và *Staph aureus*. Ngoài ra, chúng tôi còn định danh được các tác nhân VK khác như nhóm VK không lên men đường: *Burkholderia cepacia* (n = 8), *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 2), *Chryseobacterium indologens* (n = 1) và nhóm VK đường ruột *Serratia marcescens* (n = 1) (bảng 3.2). Đây là các nhóm VK rất ít hoặc không được ghi nhận trước đây của các NC trong nước [2], [5], [7], [8], [11], [16], [17].

Số liệu trên của chúng tôi cũng cần đặt ra trong bối cảnh của các NC khác trước đây. Như chính NC của chúng tôi vào năm 2011 (từ tháng 01 đến tháng 09), trên 87 bệnh nhân tại khoa ICU nội bệnh viện Nhân Dân Gia Định. NC này phân lập được tất cả 29 VK chia thành 04 loài. Trong đó *Acinetobacter* spp chiếm tỉ lệ cao nhất gần ba phần tư các trường hợp (n = 20). Chiếm tỉ lệ cao thứ hai và thứ ba là *K. pneumoniae* và *Enterobacter* spp. Tuy nhiên hai loài VK này chiếm khoảng một phần mười các trường hợp. Còn lại *P. aeruginosa* chỉ có một trường hợp. Tất cả bệnh nhân trong NC năm 2011 chỉ phân lập được một loài VK [5]. Vì NC trước đây, tuy trong cùng một bệnh viện, nhưng các bệnh nhân được tuyển chọn từ ICU nội duy nhất. Các bệnh nhân được tuyển chọn vào NC không nằm trong môi trường ngoại khoa. Do đó kết quả có thể lý giải một phần là chỉ phân lập ra các VK Gram âm. Trong NC này (2014) chúng tôi có tuyển chọn gần một phần năm số bệnh nhân (n = 43) từ khoa Phẫu Thuật Gây Mê Hồi Súc. Ngoài ra trong NC 2014 chúng tôi tuyển chọn 220 bệnh nhân so với 87 bệnh trong NC năm 2011. Do đó khả năng phát hiện được số loài VK nhiều hơn: 177 VK chia thành 11 loài khác nhau so với 29 VK chia thành 4 loài. Tuy chúng tôi đã tiến hành NC ở hai thời điểm khác nhau, ở cùng một bệnh viện, nhưng tựu chung lại một điểm giống nhau là *Acinetobacter baumannii* là tác nhân gây VPTM luôn chiếm tỉ lệ cao nhất.

Hơn nữa theo NC gần đây được thực hiện tại khoa ICU và Hồi Súc Ngoại Thần Kinh bệnh viện Chợ Rẫy từ tháng 10/2013 đến 06/2014. Số liệu của NC này

đã cho thấy phân lập được 57 VK chia thành 5 loài khác nhau. Trong đó *Acinetobacter* spp chiếm tỉ lệ cao nhất gần hai phần ba các trường hợp. Chiếm tỉ lệ cao tiếp theo là *S. aureus* hơn một phần tư các trường hợp [16]. *A. baumannii* là tác nhân VK gây VPTM chiếm tỉ lệ cao nhất trong số các tác nhân VK gây VPTM phân lập được. Lại một lần nữa kết quả từ NC của tác giả Trần Đình Phùng cho thấy tác nhân VK gây VPTM *A. baumannii* là đáng quan tâm. Mặc dù hai NC được thực hiện ở hai bệnh viện khác nhau. Ngoài ra tỉ lệ VK *S. aureus* phân lập được chiếm tỉ lệ cao hơn so với NC của chúng tôi (hơn một phần tư so với dưới một phần mười). Mặc dù thời gian thở máy trước khi được chẩn đoán VPTM trên lâm sàng trong NC của chúng tôi có trung vị là 16 ngày. Sự khác biệt về phần trăm VK Gram dương này có thể lý giải sau. Thứ nhất mẫu NC của chúng tôi phần lớn người bệnh nằm điều trị tại ICU nội (hơn hai phần ba trường hợp), có liên quan đến bệnh lý nội khoa. Khoa Hồi Sức Ngoại Thần Kinh bệnh viện Chợ Rẫy hầu hết người bệnh có liên quan đến chấn thương sọ não, liên quan đến phẫu thuật. Điều này lý giải được phần nào tác nhân VK gây VPTM chiếm tỉ lệ cao thứ hai là *S. aureus*, không phải *K. pneumoniae* như trong NC của chúng tôi. Thứ hai là do tính đặc thù của từng khoa ICU một của từng bệnh viện khác nhau, mà đặc điểm tác nhân VK gây VPTM có thể khác nhau. Tuy nhiên có một đặc điểm chung là tác nhân gây VPTM chiếm tỉ lệ cao nhất vẫn là *Acinetobacter* spp. Ngoài *Acinetobacter* spp và *S. aureus*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* cũng là các tác nhân VK Gram âm phổ biến nhất gây VPTM như trong NC của chúng tôi [16].

Số liệu NC của chúng tôi một lần nữa cũng nhất quán với NC tại bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh. Theo số liệu của NC này, qua 11 năm (từ 2000 đến 2010) cho thấy ba tác nhân VK gây VPTM hàng đầu là *A. baumannii*, *K. Pneumoniae* và *P. aeruginosa* [79]. Theo NC này thì tỉ lệ *A. baumannii* gây VPTM tăng dần theo thời gian nhất là trong những năm gần đây. Vào năm 2000 phân lập được 6 trường hợp nhiễm *A. baumannii*. Năm 2001 và 2002 số lượng VK *A. baumannii* phân lập được là 17 và 19 trường hợp. Đến năm 2010 phân lập được 35 trường hợp VPTM do *A. baumannii* [79]. Gần đây, một NC khác cũng được lập lại

tại khoa ICU người lớn bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh từ 11/2014 đến 1/2016 [15]. Kết quả NC cho thấy ba tác nhân VK gây VPTM thường gặp nhất được xác định cũng là *A. baumannii*, *K. Pneumoniae* và *P. aeruginosa*. Hơn nữa *A. baumannii* cũng là tác nhân gây VPTM tăng dần theo thời gian dựa trên các NC tại bệnh viện Chợ Rẫy. Số liệu này cho thấy tỉ lệ VPTM do *A. baumannii* chiếm chưa đầy một phần năm các trường hợp vào năm 2001 [8]. Nhưng tỉ lệ nhiễm VK *A. baumannii* tăng lên hơn một phần ba trường hợp vào năm 2004 [17] và gần hai phần ba trường hợp vào năm 2010 [11].

Như vậy, *A. baumannii* được xem là tác nhân chính, thường gặp và ngày tăng dần trong những năm vừa qua. Khi các NC xác định tác nhân VK gây VPTM dựa vào vi sinh kinh điển, định danh VK gây bệnh dựa vào kiểu hình. Đây cũng là mối quan tâm hàng đầu của các bác sĩ lâm sàng cũng như những người quản lý trong lĩnh vực kiểm soát nhiễm khuẩn.

Kết quả NC của chúng tôi cho thấy ba tác nhân VK phân lập được phổ biến nhất từ các bệnh nhân VPTM là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*. Kết quả NC này được tái khẳng định lại một lần nữa từ các NC khác với qui mô lớn hơn, trên toàn quốc cũng cho kết quả tương tự [86], [87]. Hơn nữa kết quả NC của chúng tôi cũng thống nhất với kết quả NC của tác giả Nguyễn Hữu Thông và cộng sự. NC này thực hiện tại bệnh viện Bạch Mai từ 09/2009 đến 08/2011 dựa trên 77 bệnh nhân thỏa tiêu chuẩn chọn vào NC. Kết quả cho thấy ba tác nhân VK gây VPTM phổ biến nhất vẫn là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* [18]. Ngoài ra kết quả NC của chúng tôi còn nhất quán với kết quả NC của tác giả Nguyễn Gia Bình và cộng sự. NC này cũng được thực hiện tại ICU bệnh viện Bạch Mai từ ngày 15/8/2014 đến ngày 15/1/2015 trên 28 bệnh nhân. Trong đó có 26 bệnh nhân được xác định là VPTM. Kết quả cho thấy ba tác nhân VK phổ biến nhất phân lập được cũng là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* [30].

Ngoài ra số liệu của chúng tôi cũng nhất quán với số liệu NC tại bệnh viện King Fahad Hofuf, Saudi Arabia [78]. Theo số liệu của NC này, tỉ lệ VK phân lập

được cao nhất vẫn là *Acinetobacter* spp chiếm gần hai phần ba các trường hợp. Điều này tái khẳng định lại một lần nữa, tác nhân VK gây VPTM chủ yếu vẫn là *Acinetobacter* spp trong gần hai thập niên qua [5], [7], [11], [16], [17], [78], [79].

Tuy nhiên, theo NC của nhóm tác giả Maksun Radji, thực hiện NC tại khoa ICU bệnh viện Fatwamati, Jakarta, Indonesia từ 2/2009 đến 3/2010 [74]. Theo NC này, trên 385 mẫu cấy, trong đó gần chín mươi phần trăm các mẫu cấy VK được hút ra từ đường hô hấp của bệnh nhân ICU. Các mẫu cấy còn lại được lấy từ đường tiêu, vết mổ, máu và dịch ổ bụng. Kết quả cấy cho thấy dương tính gần hai phần ba các trường hợp (n = 249). Ngoài ra kết quả vi sinh cũng cho thấy phân lập được 20 loài VK khác nhau. Trong đó có ba loài VK thường gặp nhất là *P. aeruginosa* chiếm gần một phần ba các trường hợp (n = 66). Thứ hai và thứ ba là *K. pneumoniae* và *S. epidermidis* chiếm gần một phần năm các trường hợp (n = 38 và 37). Về số lượng loài VK phân lập được đa dạng hơn so với NC của chúng tôi, 20 loài so với 11 loài. Tuy nhiên VK phân lập được chiếm tỉ lệ cao nhất là *P. aeruginosa*, không phải là *A. baumannii*. Điều này có thể lý giải là do đặc trưng cộng đồng VK gây VPTM ở từng đơn vị ICU của từng bệnh viện khác nhau. Các VK Gram âm dễ mọc như *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *A. baumannii*, *Pseudomonas* spp cũng được phân lập như trong NC của chúng tôi. Hơn nữa trong NC của nhóm tác giả Maksun Radji còn định danh được các trực khuẩn Gram âm yếm khí *Serratia liquefaciens*, định danh được các trực khuẩn Gram âm yếm khí tùy nghi *Proteus mirabilis*, *Raoutella ornithinolytica*. Mặt khác kết quả NC tại ICU bệnh viện Fatwamati còn xác định được liên cầu Gram dương yếm khí tùy nghi *Streptococcus* group A. Trong NC của chúng tôi, các mẫu dịch rửa phế quản phế nang được chuyên chở, phân lập và nuôi cấy trong môi trường hiếu khí. Do đó, trong NC của chúng tôi không phát hiện được các loài VK yếm khí.

Hơn nữa, kết quả NC của chúng tôi một phần nào đó không tương đồng với kết quả NC của tác giả Pierre Dore và cộng sự. NC này được tiến hành từ 1/1989 đến 12/1992 trên 415 bệnh nhân. Tất cả bệnh nhân trải qua 494 lần nội soi phế quản kèm thực hiện chải phế quản có nòng bảo vệ qua nội khí quản đường miệng, đường

mũi và khai khí quản. Tất cả các mẫu đàm được chuyên chở và nuôi cấy trong cả hai môi trường hiếu và yếm khí. Trong đó có 130 bệnh nhân được xác định VPTM dựa vào tiêu chuẩn $\geq 10^3$ cfu/ml đưa vào phân tích. Bao gồm 49 bệnh nhân từ ICU nội, 81 bệnh nhân từ ICU ngoại (34 Phẫu Thuật Tim, 31 Ngoại Bụng và 16 Ngoại Chính Hình) [45]. Kết quả vi sinh cho thấy có 100 mẫu chỉ phân lập được các VK hiếu khí. Trong đó ba tác nhân VK phổ biến nhất là *S. aureus*, *A. baumannii* và *P. aeruginosa*. Như vậy VK phân lập được chiếm tỉ lệ cao nhất không phải là *A. baumannii* như trong NC của chúng tôi. Sự khác biệt này có thể lý giải như sau. Thứ nhất là do quần thể NC khác nhau. Phần lớn (gần hai phần ba các trường hợp) bệnh nhân được tuyển chọn vào NC nằm trong môi trường ngoại khoa. Thứ hai có thể là do đặc điểm cộng đồng vi sinh khác nhau giữa các đơn vị ICU. Ngoài ra số liệu từ NC của tác giả Pierre Dore và cộng sự còn cho thấy có 30 bệnh nhân (chiếm gần một phần tư các trường hợp) có kết quả cấy dương tính với VK yếm khí. Trong số 30 trường hợp cấy cho kết quả dương tính với VK yếm khí, có 26 bệnh nhân (gần chín phần mười) đồng nhiễm với VK hiếu khí. Chỉ có 4 bệnh nhân còn lại có kết quả cấy cho thấy nhiễm một loại VK yếm khí duy nhất. Ngoài ra kết quả NC còn cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa đối với nhiễm VK yếm khí giữa các khoa ICU. Mặt khác, hơn phân nửa (18/30) bệnh nhân nhiễm VK yếm khí có thở máy qua ống nội khí quản đường miệng. Trong NC của chúng tôi tất cả các bệnh nhân đều thở máy qua nội khí quản đường miệng. Ngoài ra các trường hợp đồng nhiễm chỉ là các VK hiếu khí Gram dương và hoặc Gram âm. Trong điều kiện hiện nay, khoa Vi Sinh của bệnh viện Nhân Dân Gia Định không thực hiện định danh VK yếm khí một cách thường qui. Cũng giống như các khoa Vi Sinh của các bệnh viện khác trong Thành Phố và cả nước, ngoài những trường hợp đặc biệt do nhu cầu chỉ định của các bác sĩ lâm sàng về cấy VK trong môi trường yếm khí. Còn lại hầu hết các mẫu được thực hiện tại các khoa vi sinh trong cả nước đều thực hiện cấy thường qui trong môi trường hiếu khí. Một nguyên nhân khác là do điều kiện cơ sở vật chất chưa được trang bị đầy đủ và đồng bộ, hơn nữa giá thành của việc định danh VK yếm khí cao hơn nhiều so với định danh VK hiếu khí thường qui. Trong

NC này của chúng tôi đã thực hiện định danh VK theo vi sinh kinh điển. Chúng tôi áp dụng kỹ thuật định danh dựa trên kiểu hình như nhuộm Gram, nuôi cấy, đặc tính mọc và các phản ứng sinh hóa. Dựa vào vi sinh kinh điển như thế, thực hiện nuôi cấy và phân lập trên các chủng VK trong môi trường hiếu khí, dễ mọc. Do đó chúng tôi không phát hiện được các VK yếm khí. Đây cũng là điểm hạn chế của vi sinh kinh điển và cũng là điểm hạn chế của đề tài. Do đó các phương pháp mới, hiện đại hơn trong việc định danh VK không thông qua cấy trên các bệnh nhân nghi ngờ VPTM cần được áp dụng và phát triển.

4.1.2. Định danh VK dựa vào giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent PGM

Qua hai lần chạy giải trình tự trên 192 mẫu DRPQPN, trong đó có 168 mẫu cấy dương và 24 mẫu cấy âm, kết quả cuối cùng thu được 76 mẫu. Từ 76 mẫu này chúng tôi định danh được 388 VK chia thành 99 loài. Số loài phát hiện được nhiều nhất trên một mẫu dịch rửa phế quản phế nang là 32 loài. Số loài phát hiện được ít nhất trên một mẫu dịch rửa phế quản phế nang là 1 loài. Bảy loài VK phổ biến nhất là *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *prevotella* spp, *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp và *Haemophilus* spp và *Burkholderia* spp. Trong đó *Acinetobacter* spp chiếm tỉ lệ cao nhất, hai mươi phần trăm các trường hợp. Chiếm tỉ lệ cao tiếp theo là *Pseudomonas* spp và *prevotella* spp, chiếm mười phần trăm các trường hợp. Các VK còn lại chiếm tỉ lệ dưới mười phần trăm các trường hợp. Như vậy cho dù định danh VK bằng kiểu hình hay giải trình tự đều cho thấy kết quả cũng không khác nhau. Đó là các loài VK *Acinetobacter* spp vẫn phổ biến nhất. Điều này tái khẳng định một lần nữa là *Acinetobacter* spp, phải nói là một tác nhân đáng được quan tâm trong việc xác định VK gây VPTM trên lâm sàng hiện nay (phụ lục: 10).

Tuy nhiên việc xác định hệ vi sinh trên các bệnh nhân thở máy tại các khoa ICU của bệnh viện Nhân Dân Gia Định cũng nên đặt vào bối cảnh của các NC khác trên thế giới. Một trong những NC cần được đặt ra ở đây là NC của nhóm tác giả Ryan M. Huebinger. NC được thực hiện trên 12 bệnh nhân sau chấn thương nằm điều trị tại khoa ICU ngoại của bệnh viện Parkland Memorial, Dallat, Texas, Hoa

Kỳ [53]. Bệnh nhân được xác định chẩn đoán VPTM dựa trên thang điểm CPIS ≥ 6 . Đàm được hút qua nội khí quản, phương pháp ly trích DNA bằng cột, giải trình tự trên hệ thống Pyrosequencing. Kết quả cho thấy số chủng và loài phát hiện được là 15 loài. Bao gồm các trực khuẩn Gram âm không lên men đường như *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas* spp. Các VK đường ruột Gram âm như *Klebsiella* spp, *Escherichia* spp. Nhóm cầu khuẩn Gram dương như *S. aureus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus* spp. Ngoài ra còn có các loài khác *Mycoplasma* spp, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* spp, *Prevotella* spp, *Ruminococcus* spp, *Methylobacterium* spp. Số loài phát hiện được nhiều nhất bằng Pyrosequencing trên một mẫu đàm được hút qua nội khí quản là 14 loài. So với NC của chúng tôi, tổng số loài phát hiện được là 99 loài. Số loài nhiều nhất được phát hiện trên một bệnh nhân được chẩn đoán VP thở máy là 32 loài VK khác nhau. Sự khác biệt này có thể được lý giải như sau. Thứ nhất bệnh nhân trong nhóm NC của chúng tôi đều là lớn tuổi (tuổi trung bình là 71), có nhiều bệnh nền mạn tính kèm theo. Trong đó THA, ĐTD, suy thận mạn và COPD là bốn bệnh nền thường gặp nhất. Thời gian trung bình nằm ở ICU trước khi được chẩn đoán VP thở máy trên lâm sàng là 11 ngày. Độ tuổi trung bình trong nhóm NC của tác giả Ryan M. Huebinger và cộng sự là 46 tuổi. Hầu hết bệnh nhân trong nhóm NC này đều khỏe mạnh trước đó, không có nhiều bệnh nền mạn tính. Thứ hai là do môi trường vi sinh ở từng khoa ICU khác nhau. Các khoa ICU ở các nước tiên tiến đều có từng phòng riêng biệt. Mỗi bệnh nhân nằm trong một phòng cách li đạt tiêu chuẩn. Hầu hết dụng cụ của từng phòng đều dành riêng biệt cho bệnh nhân đó mà thôi. Môi trường ICU không quá tải như các khoa ICU tại bệnh viện Nhân Dân Gia Định. Hơn nữa trong mẫu NC của chúng tôi có đến 24 (13,2%) bệnh nhân có tiền sử COPD. Các bệnh nhân này, hầu hết là nhập viện nhiều lần với nhiều đợt sử dụng kháng sinh trước đó. Ngoài ra chúng tôi không tìm thấy cách nào khác nữa để lý giải hợp lý hơn. Mặt khác trong NC của nhóm Ryan M. Huebinger và cộng sự cho thấy VK xác định được phổ biến nhất là *S. aureus*, không phải *Acinetobacter* spp như trong NC của chúng tôi. Sự khác biệt này cũng có thể giải

thích như sau: trên 12 bệnh nhân trong NC của nhóm tác giả Ryan M. Huebinger và cộng sự đều là bệnh nhân chấn thương, nằm trong môi trường ngoại khoa. Trong khi đó bệnh nhân trong NC của chúng tôi phần lớn, gần bốn phần năm các trường hợp, được tuyển chọn trong môi trường ICU nội khoa.

Ngoài ra, theo NC nhóm tác giả Qiulong Yan, thực hiện giải trình tự toàn bộ bộ gene của VK trên ba BN thở máy tại ICU ngoại bệnh viện Dalian Municipal Central, Dalian, Trung Quốc [88]. Đàm được hút ra qua nội khí quản ở ngày 4 và ngày 7 của thở máy. Nền tảng kỹ thuật được sử dụng trong NC này là Illumina HiSeq2500. Kết quả cho thấy tổng số chủng và loài VK phát hiện là 9. Các VK này bao gồm *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria* spp, *Prevotella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Veillonella parvula*. Sự khác biệt về số loài VK phát hiện được trên đường hô hấp trong NC của chúng tôi và nhóm tác giả Trung Quốc có thể lý giải như sau: (1) số mẫu trong quần thể NC khác nhau. Trong NC của chúng tôi, thu thập trên 220 BN thở máy kéo dài tại các khoa ICU. Trong NC của nhóm tác giả Trung Quốc chỉ có ba BN, nằm ở ICU ngoại, thời gian thở máy trước khi được lấy mẫu kéo dài nhất chỉ mới có 7 ngày. So với NC của chúng tôi, thời gian thở máy trước khi được nội soi phế quản lấy mẫu có trung vị là 11 ngày. (2) Cả ba BN của nhóm tác giả Trung Quốc đều nằm trong môi trường ngoại khoa, không có nhiều bệnh nền kèm theo. (3) Có thể trên hệ thống Illumina HiSeq2500, khi giải trình tự toàn bộ bộ gene của VK, dữ liệu trung bình có thể đọc được lên tới 3,5 Gbp cho một mẫu. Do đó chất lượng của một trình tự sẽ tốt nhất và hoàn toàn có thể phát hiện ra các loài VK hoàn toàn mới. Trong NC của chúng tôi, mỗi lần chạy chúng tôi thiết kế cho 96 mẫu trên hệ thống Ion Torrent Personal Genome Machine. Mỗi đoạn trình tự chúng tôi phát hiện được nằm trong khoảng 200 đến 400 bp. Do đó khả năng phát hiện được các loài VK hiện diện trong các mẫu dịch rửa phế quản phế nang là rất cao. Ngoài ra chúng tôi không tìm được cách lý giải nào khác để biện minh cho sự khác biệt này.

Hơn nữa, NC của chúng tôi cũng được hỗ trợ từ kết quả NC của nhóm tác giả Fadi Bittar và cộng sự. NC này thực hiện dựa trên 16 trẻ em và 9 người lớn được chẩn đoán xơ nang phổi trước đó. Trên 25 mẫu đàm, được li trích DNA, khuếch đại, tạo dòng và giải trình tự trên hệ thống ABI PRISM 3130 [48]. Kết quả định danh được 53 loài VK khác nhau và số loài phát hiện được nhiều nhất trên một BN là 14 loài. Tính đa dạng của VK trong đường hô hấp của các BN xơ nang phổi phải nói là rất lớn. Đặc biệt là các VK yếm khí như trong NC của chúng tôi, nhất là các loài *Prevotella* spp. Ngoài ra có sự thống nhất trong việc định danh các VK bằng kiểu gene của các VK yếm khí giữa NC của nhóm tác giả Fadi Bitta và NC của chúng tôi. Đó là các VK yếm khí *Gemella* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas* spp, *Tannerella* spp, *Veillonella* spp. Tuy nhiên các VK yếm khí khác như: *Dialister pneumosintes*, *Lachnospiraceae* *geneomosp*, *Selenomonas* spp chỉ phát hiện trên các BN xơ nang phổi trong NC của Fadi Bitta, không có trong NC của chúng tôi. Đây là nhóm VK yếm khí ở đường miệng, hầu họng và đường ruột gây ra nhiều bệnh cảnh lâm sàng khác nhau như: viêm phúc mạc trên BN xơ gan, áp xe não, VP, viêm ruột [25], [26], [92]. Sự khác biệt này có thể do sự khác nhau về quần thể NC. Hơn nữa, cũng có sự giống nhau trong việc định danh các VK còn lại trong NC của chúng tôi và nhóm tác giả Fadi Bitta. Đó là các VK: *Granulicatella* spp, *Lactobacillus* spp, *Neisseria* spp, *Rothia mucilaginosa*, *Streptococcus* spp. Tuy nhiên, tổng số loài VK phát hiện được cũng ít hơn so với các BN VP thở máy như trong NC của chúng tôi. Sự khác biệt này (99 loài so với 53 loài) chính yếu có thể là do quần thể NC khác nhau. Tất cả BN trong NC của chúng tôi đều là những BN lớn tuổi, thở máy kéo dài trong môi trường ICU. Ngoài ra, trên nền tảng Ion Torrent PGM trong NC của chúng tôi đã phát hiện ra các VK trong đường hô hấp dưới của các BN VPTM mà chưa được ghi nhận trong NC của Fadi Bitta và các NC khác trước đây. Đồng thời khi so sánh giữa vi sinh kính điện và giải trình tự 16S-rRNA ngay trong NC của chúng tôi. Các VK này chỉ phát hiện được bằng giải trình tự PGM, như các trực khuẩn Gram âm yếm khí: *Alloprevotella rava*, *Bacteroides pyogenes*, *Catonella morbi*, *Fusobacterium* spp, *Pectobacterium* spp, *Shewanella*

profunda, *Serratia liquefaciens*. Các trực khuẩn Gram âm hiếu khí như: *Aureimonas glaciistagni*, *Diaphorobacter* spp, *Elizabethkingia* spp, *Novosphingobium* spp, *Psychrobacter* spp, *Sphingomonas* spp. Các trực khuẩn Gram âm yếm khí tùy nghi như: *Actinobacillus lignieresii*, *Aeromonas* spp, *Calothrix desertica*, *Chroococcidiopsis thermalis*, *Erwinia psidii*, *Shigella* spp. Các trực khuẩn Gram dương yếm khí như: *Atopobium rimaе*, *Bacillus coagulans*. Các trực khuẩn Gram dương hiếu khí như: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Corynebacterium striatum*, cầu khuẩn Gram dương hiếu khí tùy nghi *Vagococcus entomophilus*. Các cầu trực khuẩn Gram âm yếm khí tùy nghi như: *Gallibacterium anatis*, *Pasteurella* spp, xoắn khuẩn Gram âm yếm khí tùy nghi như: *Rhodospirillum oryzae*.

Các mẫu còn lại (116 mẫu) cho ra kết quả với các chuỗi trình tự không đủ chiều dài để bao phủ được các vùng trình tự đích ban đầu đã được thiết kế. Lý do có thể giải thích cho điều này có thể là do lượng Dithiothreitol để làm tan mẫu đàm trong quá trình ly trích DNA còn tồn tại trong dịch ly trích, gây đứt gãy các đoạn DNA. Mặt khác, sau bước PCR, chúng tôi có chạy điện di trên gel agarose để kiểm tra sản phẩm khuếch đại gene 16S rRNA. Tuy nhiên, hoàn tất quá trình giải trình tự và so sánh trình tự với ngân hàng gene thì trình tự 16S rRNA lại cho kết quả là loài *Homo sapiens*. Điều này có thể giải thích là do DNA được ly trích trực tiếp từ mẫu DRPQN vẫn có lẫn bạch cầu và tế bào có nhân của bệnh nhân. Gene 16S rRNA cũng có hiện diện trong tế bào có nhân của người. Qua kết quả giải trình tự của nghiên cứu này, một phương pháp tiền xử lý để loại bỏ bớt tế bào người trước khi chuyển qua phá vỡ tế bào và thu nhận DNA cần được đề xuất. Một yếu tố khác cũng có thể ảnh hưởng đến hiệu quả khuếch đại thư viện cần được xem xét là tối ưu hóa tốc độ gia nhiệt trong phản ứng PCR. Sự thay đổi nền nhiệt độ chậm sẽ cho hiệu quả PCR tốt hơn. Ngoài ra chúng tôi không còn cách nào khác để giải thích.

Có sự đồng thuận giữa hai kỹ thuật định danh dựa vào kiểu hình và PGM tùy thuộc vào từng loài VK khác nhau mà mức độ đồng thuận khác nhau. Vi sinh kinh điển định danh dựa vào nhuộm Gram, đặc tính mọc của quần thể VK và các phản ứng sinh hóa. Việc định danh VK phụ thuộc nhiều vào kỹ năng và kinh nghiệm của

các kỹ thuật viên vi sinh lâm sàng. Đối với *A. baumannii* có tính đồng thuận cao nhất hơn chín mươi phần trăm. Tuy nhiên có ba trường hợp có kết quả cấy là *A. baumannii*, nhưng kết quả giải trình tự có hai trường hợp là *Burkholderia* spp và một trường hợp là *S. aureus* và *Alloprevotella rava*. Tương tự đối với *K. pneumoniae*, có 9 trường hợp trong tổng số 14 trường hợp không có sự đồng thuận giữa cấy và PGM. Trong đó 3 trường hợp kết quả giải trình tự cho kết quả là *A. baumannii*. Tương tự các trường hợp còn lại kết quả PGM cho ra *Bacillus coagulans*, *Burkholderia* spp, *Calothrix desertica*, *Neisseria* spp, *Pseudomonas* spp, *Rhodospirillum oryzae*; *Haemophilus aegyptius*, *Elizabethkingia* spp. Tuy nhiên đối với bốn trường hợp *Escherichia coli* không có trường hợp nào đồng thuận giữa vi sinh kinh điển và PGM. Chúng tôi có thể lí giải như sau: thứ nhất là do đặc tính của từng vi khuẩn có biểu hiện kiểu hình bất thường. Theo kết quả giải trình tự và biểu đồ phân tích cụm cho thấy *Burkholderia* spp là một loài vi khuẩn rất đặc biệt, có kiểu gene hoàn toàn khác so với các vi khuẩn còn lại được phát hiện trên đường hô hấp của BN VPTM. Ngoài ra *Burkholderia* spp còn là vi khuẩn ít có biểu hiện kiểu hình, đôi khi cần áp dụng thêm các kỹ thuật đặc biệt khác cũng như đòi hỏi người vi sinh lâm sàng có kinh nghiệm mới đưa ra quyết định chính xác về định danh. Thứ hai có thể mỗi lần chúng tôi chạy giải trình tự lên tới 96 mẫu dịch rửa phế quản phế nang. Các mẫu này chứa cả các tế bào có nhân của người và gene 16S-rRNA của vi khuẩn. Do đó các mạch khuôn trong quá trình khuếch đại PCR không đạt được tới đích của tất cả các thành phần vi khuẩn trong một mẫu dịch rửa phế quản phế nang. Đến khi giải trình tự thì không thu được các trình tự đích của gene 16S-rRNA như thiết kế ban đầu. Dẫn đến việc định danh không bao phủ được tất cả các loài vi khuẩn trong cùng một mẫu dịch rửa phế quản phế nang. Ngoài ra chúng tôi cũng không còn cách nào khác để giải thích hợp lý hơn cho các kết quả của các trường hợp này.

Nếu dựa vào vi sinh kinh điển trong định danh VK làm tiêu chuẩn vàng thì độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp giải trình tự PGM lần lượt là 93,5% và 6%. Tuy nhiên như chúng tôi đã đề cập ở trên, hiện nay định danh VK dựa vào kiểu

hình là một phương pháp được áp dụng phổ biến, chuẩn mực và là tiêu chuẩn vàng nhưng phương pháp vi sinh kinh điển thường áp dụng nhuộm Gram, nuôi cấy và các phản ứng sinh hóa trong môi trường hiếu khí, trên các VK dễ mọc. Do đó, đây là các hạn chế của vi sinh kinh điển. Đối với một số VK chỉ biểu hiện một vài đặc tính về sinh hóa thì không thể định danh được. Thứ hai tất cả các VK phân lập được trên lâm sàng là các VK thuộc nhóm dễ mọc và trên môi trường hiếu khí. Thứ ba là hầu hết BN nhập vô khoa ICU đều được sử dụng kháng sinh trước đó, làm hạn chế trong việc nuôi cấy và định danh VK. Mặt khác phương pháp áp dụng trong cấy VK ở NC này là cấy định lượng đằm trong dịch rửa phế quản phế nang. Đây là phương pháp chuẩn mực của vi sinh lâm sàng hiện nay, được áp dụng rộng rãi cho việc phân định giữa các tác nhân gây bệnh và VK thường trú, dựa trên điểm cắt 10^4 cfu/ml.

Tuy nhiên phương pháp định danh VK dựa vào sinh học phân tử là kỹ thuật khuếch đại các bản sao trình tự DNA của các vi khuẩn hiện diện trên đường hô hấp dưới của bệnh nhân. Chỉ cần một đoạn rất nhỏ của trình tự vi sinh vật thì phương pháp sinh học phân tử cũng phát hiện được. Do đó đặc tính vượt trội của sinh học phân tử trong việc định danh vi khuẩn là phát hiện được bộ gene của vi khuẩn (microbiome) trên đường hô hấp của bệnh nhân. Đây là thế mạnh của sinh học phân tử và cũng là thế mạnh của giải trình tự thế hệ mới. Dựa trên nền tảng NGS, các nhà vi sinh áp dụng sinh học phân tử đã khám phá ra nhiều loài mới cũng như xác định trở lại các loài đã được biết trước đây [73]. Ngoài định danh VK, giải trình tự gene 16S-rRNA khám phá nhiều loài VK mới chưa được mô tả trước đây [67]. Trong NC của chúng tôi đã phát hiện được 88 loài mới chưa được phát hiện bằng định danh VK dựa trên kiểu hình. Chính vì đặc tính về độ nhạy của sinh học phân tử, nhất là phương pháp giải trình tự thế hệ mới trên hệ thống Ion Torrent PGM. Đây là vấn đề nan giải của các nhà sinh học phân tử áp dụng kết quả của mình vào vi sinh lâm sàng [73].

Cuối cùng, chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng liệu tác nhân VK phân lập được trên các mẫu cấy dương tính ở những bệnh nhân VPTM trên lâm sàng không phải là thủ phạm thật sự và duy nhất gây ra kết cuộc trên BN VPTM tại các khoa ICU của

bệnh viện Nhân dân Gia Định. Về mặt vi sinh, tính đồng thuận chung giữa vi sinh kinh điển và giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent PGM là 70,6% (48/68). Kết cuộc cho thấy tỉ lệ tử vong đối với các BN nhiễm ba VK chính yếu gây VPTM lần lượt là 76%, 60% và 55%. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, gần 90% (98/109) các loài VK phát hiện mới bằng giải trình tự gene 16S-rRNA là VK yếm khí mà vi sinh kinh điển không thể phát hiện được (bảng 3.3). Như vậy, “rất có thể vi sinh kinh điển không thể bao phủ được các tác nhân VK gây VPTM”. Tuy nhiên với số liệu của NC này, chúng tôi không thể hoàn toàn qui kết được tác nhân nào là thủ phạm gây VPTM nếu dựa vào giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent PGM. Nhưng kỹ thuật này giúp cho các bác sĩ lâm sàng định hướng được các tác nhân khả dĩ gây VPTM ở các BN nặng. Điều này sẽ giúp cho các bác sĩ lâm sàng (ICU) có được chiến lược nhận ra được các BN nguy cơ cao và có chiến lược điều trị thích hợp nhất cho từng BN nặng, có nhiều yếu tố nguy cơ đi kèm.

Nhờ vào hệ thống Ion Torrent PGM và dán nhãn trên các môi đặc hiệu, chúng tôi đã phát hiện được cùng một lúc cho nhiều tác nhân VK. Các VK này hiện diện trên đường hô hấp dưới của BN thở máy tại các khoa ICU nội, ICU ngoại và phòng Đột quỵ của khoa Nội Thần Kinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định. Hầu hết các VK này là VK yếm khí. Đây là một thế mạnh của sinh học phân tử trong chẩn đoán vi sinh, góp phần định danh loài VK nhanh chóng mà không thông qua nuôi cấy. Điều đặc biệt hơn là sinh học phân tử cho phép tái khẳng định lại các loài vi khuẩn có kiểu hình bất thường mà vi sinh kinh điển có thể định danh chưa có kết quả cuối cùng. Ngoài ra trên hệ thống Ion Torrent PGM có thể chạy cùng một lúc nhiều mẫu nhờ vào việc dán nhãn trên các môi đặc hiệu. Đặc tính này cũng góp phần vào giảm một phần chi phí trong vận hành hệ thống giải trình tự thế hệ mới.

Như vậy trong 24 giờ, chúng tôi có thể định danh được chính xác các tác nhân khả dĩ gây bệnh trên đường hô hấp của BN nghi ngờ VPTM trên lâm sàng. Ngoài việc định danh được chính xác các loài VK gây bệnh thường thấy trên lâm sàng, giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent PGM còn phát hiện ra các loài mới trong hệ vi sinh trên đường hô hấp của BN thở máy. Từ đó giúp cho các bác sĩ lâm

sàng đưa ra các quyết định điều trị chính xác đối với BN. Có thể phân tích cùng lúc trên nhiều mẫu cho một lần chạy máy. Điều này giúp làm giảm chi phí cho việc định danh VK dựa vào sinh học phân tử, đặc biệt là trên hệ thống Ion torrent PGM.

4.2. Kết quả kháng sinh đồ

4.2.1. Kháng sinh đồ khuếch tán

Theo tiêu chuẩn kháng sinh đồ khuếch tán, số liệu NC của chúng tôi cho thấy tỉ lệ *Acinetobacter* spp đề kháng với các kháng sinh: amikacin, imipenem, meropenem, levofloxacin và piperacillin - tazobactam hơn ba phần tư các trường hợp (bảng 3.6). Chúng tôi ghi nhận chỉ có một trường hợp *Acinetobacter* spp kháng Colistin. Số liệu này cho thấy NC của chúng tôi nhất quán với số liệu từ NC của tác giả Trần Đình Phùng tại bệnh viện Chợ Rẫy 2014 [16]. Số liệu từ NC của tác giả Trần Đình Phùng cho thấy không có trường hợp nào *Acinetobacter* spp còn nhạy với kháng sinh nhóm carbapenem và fluoroquinolone. Cũng theo NC này chưa ghi nhận trường hợp nào *Acinetobacter* spp kháng với Colistin. Ngoài ra số liệu NC của chúng tôi cho thấy cũng nhất quán với các NC khác trong nước [1], [4], [9], [10], [14], [79], [86], [87]. Số liệu từ các NC này cho thấy tỉ lệ *Acinetobacter* spp đề kháng đối với carbapenem rất thường gặp và gần như tối đa, hơn tám mươi phần trăm. Do đó, cho dù NC ở đơn hay đa trung tâm trên toàn quốc đều cho thấy nhất quán một kết quả là *Acinetobacter* spp là tác nhân chính yếu gây đa kháng. Đặc biệt là đối với nhóm kháng sinh mạnh, phổ rộng thuộc nhóm carbapenem. Ngoài ra số liệu của các kết quả NC trong nước cũng cho thấy colistin là kháng sinh duy nhất còn nhạy cảm đối với *Acinetobacter* spp hiện nay. Tuy nhiên tỉ lệ đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter* spp trong NC của chúng tôi khác biệt đáng kể khi so sánh với số liệu NC của nhóm tác giả Mwanri [78]. Theo số liệu NC này cho thấy tính trung bình, *Acinetobacter* spp đa kháng chiếm gần hai phần ba. Điều này chứng tỏ chất liệu di truyền của chính *Acinetobacter* spp có độc tính cao.

K. pneumoniae là tác nhân gây VPTM đứng hàng thứ hai sau *Acinetobacter* spp trong NC của chúng tôi. *K. pneumoniae* gây đề kháng đối với nhóm

cephalosporin thế hệ ba - bốn và Piperacillin – Tazobactam hơn hai phần ba trường hợp (bảng 3.7). Ngoài ra VK này còn đề kháng với levofloxacin hơn phân nửa các trường hợp. Tuy nhiên *K. pneumoniae* đề kháng carbapenem nhóm hai dưới hai mươi lăm phần trăm các trường hợp. Đặc biệt VK này còn nhạy với amikacin gần chín mươi lăm phần trăm. Với số liệu này, kết quả đề kháng kháng sinh của *K. pneumoniae* nhất quán với NC tại bệnh viện Chợ Rẫy [16]. Theo số liệu NC này thì tỉ lệ *K. pneumoniae* kháng cefepime và ceftazidime là gần hai phần ba các trường hợp. Tuy nhiên đối với imipenem và meropenem, *K. pneumoniae* kháng hơn phân nửa các trường hợp. Điều này có thể lý giải như sau, Bệnh viện Chợ Rẫy là bệnh viện tuyến cuối theo phân tuyến điều trị của Bộ Y Tế. Bệnh viện này tiếp nhận tất cả BN từ các bệnh viện phía nam. Điều này cho thấy người bệnh trước khi được chuyển tới bệnh viện Chợ Rẫy đã có một thời gian dài nằm điều trị ở các bệnh viện tuyến trước và sử dụng nhiều loại kháng sinh trước đó. Mẫu NC của chúng tôi, hầu hết người bệnh nhập trực tiếp từ cấp cứu và các bệnh viện quận, huyện trong thành phố chuyển đến. Thời gian điều trị kháng sinh của tuyến trước không kéo dài. Ngoài ra số liệu từ NC của chúng tôi cũng cho thấy tỉ lệ đề kháng kháng sinh của *K. pneumoniae* cũng nhất quán với NC của nhóm tác giả Maksim Radji [74].

P. aeruginosa là tác nhân đứng hàng thứ ba gây VPTM. Số liệu từ mẫu NC cho thấy, VK này đề kháng với ceftazidime và cefepime gần ba phần tư các trường hợp (bảng 3.8). Đây là hai kháng sinh thuộc nhóm cephalosporin thế hệ ba và bốn. Trước đây, hai kháng sinh này được khuyến cáo dùng cho những trường hợp nhiễm khuẩn do *P. aeruginosa*. Nhưng với kết quả kháng sinh đồ hiện nay của NC chúng tôi cho thấy hai kháng sinh vừa kể không còn thích hợp để chọn lựa sử dụng cho *P. aeruginosa*. Thật vậy, số liệu từ NC tại bệnh viện Chợ Rẫy 2014 cũng nhất quán với số liệu của chúng tôi. *P. aeruginosa* trong NC này kháng hoàn toàn với cephalosporin thế hệ ba và bốn [16]. Như vậy, việc lựa chọn kháng sinh cephalosporin thế hệ ba và bốn cho VPTM do *P. aeruginosa* không phải là lựa chọn đầu tay. Hơn nữa số liệu từ mẫu NC của chúng tôi còn cho thấy *P. aeruginosa* kháng amikacin, levofloxacin, imipenem và meropenem lần lượt là hơn hai phần ba

các trường hợp. Điều thú vị trong NC của chúng tôi cho thấy tỉ lệ đề kháng của piperacillin – tazobactam đối với *P. aeruginosa* chỉ một phần ba các BN VPTM. Ngoài ra chúng tôi chưa ghi nhận trường hợp nào *P. aeruginosa* kháng với Colistin. Kết quả này một lần nữa cũng nhất quán với kết quả NC tại bệnh viện Chợ Rẫy. Số liệu từ NC này cho thấy chưa ghi nhận trường hợp nào *P. aeruginosa* kháng với Colistin. Mặt khác, số liệu từ NC của tác giả Trần Đình Phùng, bệnh viện Chợ Rẫy còn cho thấy *P. aeruginosa* kháng piperacillin – tazobactam chỉ một phần tư các trường hợp [16]. Tuy nhiên số liệu NC của chúng tôi cũng được đặt vào bối cảnh của các NC khác nữa trước đây, trong nước. Kết quả NC của chúng tôi cho thấy nhất quán với kết quả NC của tác giả Trần Hữu Thông và cộng sự thực hiện tại bệnh viện Bạch Mai [18]. Kết quả của NC này cho thấy tỉ lệ *P. aeruginosa* kháng với piperacillin – tazobactam khoảng một phần ba các trường hợp. Hơn nữa, số liệu NC của chúng tôi còn cho thấy cũng nhất quán với kết quả nghiên cứu của tác giả Bùi Hồng Giang và cộng sự cũng được thực hiện tại bệnh viện Bạch Mai. Kết quả NC này cho thấy tỉ lệ *P. aeruginosa* kháng với carbapenem nhóm hai bao gồm imipenem và meropenem khoảng hai phần ba các trường hợp [4]. Ngoài ra, số liệu của chúng tôi cho thấy cũng nhất quán với số liệu NC tại khoa ICU bệnh viện Thống Nhất thành phố Hồ Chí Minh. Theo số liệu này tỉ lệ *P. aeruginosa* kháng với cefepime và ceftazidime gần chín mươi phần trăm, kháng imipenem ba phần tư. Tuy nhiên, số liệu của chúng tôi cho thấy không nhất quán với NC của chính chúng tôi tại khoa ICU nội bệnh viện Nhân Dân Gia Định 2011 và nhóm tác giả NC tại khoa ICU bệnh viện Fatmawati, Indonesia [5], [74]. Theo số liệu của NC tại ICU bệnh viện Fatmawati, Indonesia cho thấy *P. aeruginosa* kháng với ceftazidime và cefepime khoảng bốn mươi phần trăm. VK này kháng với carbapenem nhóm hai khoảng một phần tư các trường hợp. Điều này có thể lý giải như sau: trong NC của chúng tôi, tất cả BN đều có thở máy. Số ngày thở máy trung bình trước khi có biểu hiện VPTM trên lâm sàng trong quần thể NC của chúng tôi là 16 ngày (nhỏ nhất 5 ngày – lớn nhất 72 ngày). Điều này chứng tỏ phần lớn các BN trong NC của chúng tôi có VPTM khởi phát muộn. Trong NC nhóm tác giả Maksun Radji tại ICU bệnh

viện Fatmawati, Indonesia. Không phải tất cả BN đều thở máy. Tất cả *P. aeruginosa* phân lập được từ nhiễm khuẩn ở nhiều cơ quan khác nhau. Ngoài đường hô hấp còn có nhiễm khuẩn đường tiết niệu, nhiễm khuẩn ổ bụng, nhiễm khuẩn huyết và nhiễm khuẩn vết mổ. Ngoài ra chúng tôi không có cách nào khác để lý giải cho trường hợp này.

Hơn nữa, số liệu của NC này còn cho thấy trong 6 loại kháng sinh thường dùng nhất tại ICU là amikacin, colistin, levofloxacin, imipenem, meropenem và thành phần sulbactam. Theo kháng sinh đồ MIC, tỉ lệ kháng bốn trong sáu kháng sinh này là gần hai phần ba các trường hợp. Kháng năm kháng sinh là hơn một phần ba và chỉ kháng ba hay hai kháng sinh là một phần ba các trường hợp. Chỉ kháng với một kháng sinh trong sáu loại kháng sinh kể trên là một phần tư các trường hợp. Nhạy hoàn toàn trong sáu kháng sinh trên chưa tới một phần mười. Số liệu của chúng tôi nhất quán với NC của tác giả Aysen Bayram. Theo số liệu của NC này, phân tích dựa trên 157 chủng *P. aeruginosa*. Tỉ lệ *P. aeruginosa* đa kháng là gần ba phần tư các trường hợp [28]. Điều này chứng tỏ *P. aeruginosa* là tác nhân tiềm tàng gây đa kháng trong VPTM nguy hiểm hơn cả *Acinetobacter* spp. Ba tác nhân VK chính yếu gây ra VPTM trong NC của chúng tôi là *A. baumannii*, *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae* chiếm tỉ lệ trên tám mươi phần trăm. Đặc biệt là *A. baumannii* kháng với hầu hết các loại kháng sinh hiện có đang sử dụng tại Việt Nam cũng như trên thế giới, trừ colistin. Tương tự *P. aeruginosa* cũng là tác nhân gây ra đa kháng, đề kháng rộng đối với các kháng sinh sử dụng trên lâm sàng.

Một VK Gram âm không lên men đường khác cũng là một tác nhân gây đa kháng trên BN VPTM cũng đáng quan tâm là *Burkholderia cepacia*. VK này kháng với imipenem, amikacin và ciprofloxacin trên bảy mươi phần trăm. Tuy nhiên VK này còn nhạy với ceftazidime, cefepime, piperacillin – tazobactam, meropenem và levofloxacin trên 70%. Chưa ghi nhận trường hợp nào *B. cepacia* kháng cefoperazon – sulbactam. So với NC của tác giả Huỳnh Văn Bình thực hiện tại khoa ICU Ngoại bệnh viện Nhân Dân Gia Định. Kết quả phân lập được một trường hợp dương tính với *B. cepacia* trong tổng số 36 mẫu đàm được hút qua nội khí quản trên

BN hậu phẫu [3]. kết quả kháng sinh đồ cho thấy VK này kháng với các kháng sinh cephalosporin thế hệ ba và bốn. Ngoài ra VK này còn kháng luôn với cả amikacin và ciprofloxacin. Tuy chỉ chiếm có năm phần trăm tác nhân VK phân lập được, nhưng *B. cepacia* cũng là một tác nhân gây đa kháng.

Ngoài ra hai tác nhân thuộc nhóm trực khuẩn đường ruột, Gram âm cũng dự phần gây VPTM là *E. coli* và *Enterobacter* spp. Mặc dù chiếm tỉ lệ khoảng năm phần trăm, nhưng *E. coli* kháng cephalosporin thế hệ ba - bốn, ciprofloxacin – levofloxacin và genetamycin hơn sáu mươi phần trăm. Tuy nhiên VK này chưa ghi nhận kháng với amikacin và nhạy với carbapenem nhóm hai hơn hai phần ba các trường hợp. Hơn nữa, *Enterobacter* spp kháng ceftazidime, ceftriaxone và piperacillin - tazobactam chiếm một phần ba trường hợp. Kết quả NC của chúng tôi cho thấy không nhất quán với kết quả NC của Maksum Radji [74].

S. aureus trong NC của chúng tôi chiếm tỉ lệ năm phần trăm (chín trường hợp). Số liệu của NC chúng tôi cho thấy chưa ghi nhận trường hợp nào *S. aureus* kháng với vancomycin. Số ngày trung vị trong nhóm người bệnh VPTM do *S. aureus* là 20 ngày, dài hơn số ngày trung bình VPTM chung là 11,3 ngày. Kết quả NC này nhất quán với số liệu từ NC tại bệnh viện Chợ Rẫy, cũng không ghi nhận trường hợp nào *S. aureus* kháng vancomycin [16]. Số liệu của chúng tôi cho thấy cũng nhất quán với số liệu từ NC tại khoa ICU của bệnh viện Famawati [74].

4.2.2. Kháng sinh đồ định lượng xác định MIC

Kết quả kháng sinh đồ dựa trên tiêu chuẩn MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) hiện nay được xem là tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng chuẩn mực. Kết quả kháng sinh đồ định lượng MIC cho biết được VK nào nhạy hay kháng với từng loại kháng sinh ở từng nồng độ cụ thể. Ngoài ra, kết quả này còn giúp cho bác sĩ lâm sàng cách lựa chọn kháng sinh và cách dùng kháng sinh cho BN nhằm tối ưu hóa hiệu quả diệt trừ VK. Kết quả kháng sinh đồ định lượng dựa trên các que thử E-test trên sáu loại kháng sinh chủ lực dùng cho các VK đa kháng trên lâm sàng: amikacin, colistin, imipenem, levofloxacin, meropenem và sulbactam. Theo tiêu

chuẩn kháng sinh đồ định lượng dựa trên MIC, *Acinetobacter* spp kháng đối với imipenem và meropenem hơn chín mươi phần trăm. Phần lớn MIC của colistin đối với *A. baumannii* cho kết quả rất thấp < 0,125 µg/ml. Kết quả này cho thấy có sự nhất quán với kết quả NC của tác giả Trần Văn Ngọc và Nguyễn Gia Bình [13], [30]. Theo tác giả Nguyễn Gia Bình thực hiện NC tại bệnh viện Bạch Mai, hầu hết các chủng *A. baumannii* phân lập được có MIC giao động từ 0,064 đến 0,75 µg/ml. Với kết quả nồng độ MIC của colistin đối với *A. baumannii* tại bệnh viện Chợ Rẫy của tác giả Trần Văn Ngọc cũng cho kết quả tương tự. Hầu hết các chủng *A. baumannii* cũng có nồng độ MIC của colistin dưới 1 µg/ml. Ngoài ra kết quả kháng sinh đồ định lượng carbapenem đối với *A. baumannii* của tác giả Trần Văn Ngọc cũng nhất quán với kết quả NC của chúng tôi [13]. Tuy nhiên đối với cefoperazone – sulbactam thì không có sự nhất quán giữa hai phương pháp kháng sinh đồ định tính và định lượng ngay trong số liệu NC của chúng tôi. Theo kết quả kháng sinh đồ định tính thì *A. baumannii* kháng với cefoperazone – sulbactam là 4,3%. Nhưng theo kết quả kháng sinh đồ định lượng trên hoạt chất sulbactam cho thấy VK *A. baumannii* kháng với kháng sinh này lên tới 55%. Hơn nữa số liệu của chúng tôi cho thấy không nhất quán với NC của chính chúng tôi tại khoa ICU bệnh viện Nhân Dân Gia Định 2011 và nhóm tác giả NC tại khoa ICU bệnh viện Chợ Rẫy năm 2010 [5], [11]. Theo số liệu của nhóm NC tại ICU bệnh viện Chợ Rẫy 2010, tỉ lệ *Acinetobacter* spp kháng với colistin là 14%. Theo số liệu NC của chúng tôi 2011 tỉ lệ *Acinetobacter* spp kháng với colistin là 47%. Để lý giải điều này chúng tôi đã xem xét thật kỹ lưỡng các vấn đề, và cuối cùng giả định hợp lý nhất ở đây là chất lượng của nhà cung cấp các đĩa giấy có tấm kháng sinh. Giả định này càng được củng cố thêm là qua số liệu NC của chúng tôi cho thấy không có sự khác biệt giữa kết quả kháng sinh đồ khuếch tán trên các đĩa giấy có tấm kháng sinh và kháng sinh đồ định lượng dựa trên E-test đối với các kháng sinh khác. Một lần nữa mình chứng rằng chất lượng của các đĩa có tấm kháng sinh cũng cần được đặt ra ở đây.

Chúng tôi đã tìm ra được MIC của colistin đối với *Acinetobacter* spp tại bệnh viện Nhân Dân Gia Định. Đây là kết quả quan trọng cho các bác sĩ lâm sàng

tính toán liều lượng và cách sử dụng colistin để diệt trừ *Acinetobacter* spp gây VPTM. Tỷ lệ MIC $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$ của colistin đối với *Acinetobacter* spp là 80% (bảng 3.9). Theo tác giả D. Plachouras và cộng sự, thực hiện NC phân tích dược lực học của colistin đối với *Acinetobacter* spp. Để đạt được nồng độ colistin trong máu ≥ 2 mg/L trong liều tải ban đầu phải là 12 triệu đơn vị truyền tĩnh mạch trong 15 phút hay truyền tĩnh mạch liên tục trong hai giờ. Nếu như liều tải ban đầu là 3 triệu đơn vị colistin truyền tĩnh mạch trong 15 phút, để đạt được nồng độ đỉnh vượt qua 2 mg/L thì sau 48 giờ thì nồng độ thuốc mới đạt được. Để duy trì được thời gian hữu dụng của colistin trên 2 mg/L cần duy trì liều colistin là 4,5 triệu đơn vị mỗi 8 giờ. Với kết quả MIC này trên VK *Acinetobacter* spp trong NC của chúng tôi, có đến hơn 80% MIC của colistin đối với *Acinetobacter* spp là $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$. Cho đến hôm nay, các hướng dẫn liều tải và duy trì của colistin đối với *Acinetobacter* spp đa kháng gây VPTM là liều cao. Như vậy điểm sáng cần nhấn mạnh trong NC này là liệu có cần liều tải và liều duy trì cao của colistin trong điều trị VPTM do *Acinetobacter* spp đa kháng hay không. Vì liều cao colistin có thể gây bất lợi trên chức năng thận của BN nặng nằm thở máy tại các khoa ICU. Tuy nhiên do colistin không phải là kháng sinh nội bào, nên việc khuếch tán của colistin vào nhu mô phổi không giống như các kháng sinh nội bào khác. Do đó nồng độ thuốc vào trong dịch lót phế nang có thể không đảm bảo. Từ đó nên xem xét kết hợp colistin phun khí dung và colistin đường toàn thân [56].

Theo tiêu chuẩn MIC, số liệu trong NC chúng tôi thấy: tỷ lệ *K. pneumoniae* có MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ đối với amikacin là khoảng tám phần trăm. Tỷ lệ *K. pneumoniae* có MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ đối với levofloxacin là gần hai phần ba các trường hợp. Kết quả này cho thấy có sự nhất quán với kết quả NC của tác giả Trần Văn Ngọc tại bệnh viện Chợ Rẫy [13]. Tuy nhiên đối với imipenem, meropenem thì không có sự nhất quán giữa NC của chúng tôi và của tác giả Trần Văn Ngọc. Kết quả của chúng tôi cho thấy *K. pneumoniae* có MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ chưa tới một phần ba so với hơn hai phần ba các trường. Điều này có thể là do tính đặc thù của bệnh viện Chợ Rẫy, là tuyến cuối nhận rất nhiều bệnh nặng, điều trị kháng sinh nhiều ngày trước đó. Hơn

nữa, số liệu của NC của chúng tôi còn cho thấy trong 4 loại kháng sinh thường dùng tại ICU cho *K. pneumoniae* là amikacin, levofloxacin, imipenem và meropenem. Theo kháng sinh đồ MIC, tỉ lệ kháng một trong bốn kháng sinh này là gần một phần ba các trường. Kháng hai và ba kháng sinh lần lượt là một phần tư và dưới ba phần trăm. Tỉ lệ nhạy hoàn toàn cho cả bốn loại kháng sinh này là gần hai phần ba. Kết quả này có thể giúp cho các bác sĩ lâm sàng định hướng được việc chọn lựa kháng sinh phù hợp cho các BN nghi ngờ VPTM do *K. pneumoniae*. Chúng tôi không tìm thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa giấy và kháng sinh đồ dựa trên MIC đối với *K. pneumoniae*. Tuy nhiên kháng sinh đồ dựa trên MIC cho các bác sĩ lâm sàng dễ dàng sử dụng kháng sinh ở liều lượng thích hợp cho BN. Ngoài ra kết quả kháng sinh đồ dựa trên MIC cũng cho biết được tiên lượng của BN trước khi điều trị.

Theo tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng dựa trên MIC, tỉ lệ *P. aeruginosa* kháng amikacin, imipenem, levofloxacin, meropenem và sulbactam từ sáu mươi đến một trăm phần trăm. Tuy nhiên số liệu của chúng tôi cho thấy chưa ghi nhận trường hợp nào *P. aeruginosa* kháng với colistin. Kết quả này có sự nhất quán hoàn toàn giữa hai phương pháp kháng sinh đồ định tính và định lượng. Ngoại trừ trường hợp hoạt chất sulbactam. Theo kết quả kháng sinh đồ định tính, *P. aeruginosa* nhạy với cephoperazone – sulbactam là bốn mươi phần trăm. Tuy nhiên với kết quả kháng sinh đồ định lượng cho thấy không có trường hợp nào *P. aeruginosa* còn nhạy với hoạt chất sulbactam. Ngoài ra kết quả NC của chúng tôi còn nhất quán với kết quả NC của tác giả Trần Văn Ngọc tại bệnh viện Chợ Rẫy. Kết quả của NC này cho thấy *P. aeruginosa* kháng với carbapenem nhóm hai gần ba phần tư các trường hợp. Một lần nữa, phương pháp kháng sinh đồ định lượng dựa trên que E-test tái khẳng định tầm quan trọng của *P. aeruginosa* trong VPTM.

4.3. Xác định gene kháng thuốc và mối liên quan với đề kháng kháng sinh

Kết quả PCR đa môi và giải trình tự tìm gene kháng thuốc trên hệ thống Sanger 3130, trên các gene IMP (232bp), KPC (798 bp), OXA (438 bp), NDM (621 bp), SPM (271 bp), BIC (537 bp), TEM (964bp) và SHV (790bp). Kết quả cho thấy: trên 71 loài *Acinetobacter baumannii*, chúng tôi phát hiện 58 gene kháng thuốc. Trong đó chiếm tỉ lệ phổ biến nhất là gene TEM (964bp) 23 gene (bốn mươi phần trăm). Tiếp theo với tỉ lệ phổ biến thứ hai là gene SPM (271 bp), 14 gene (gần một phần tư các trường hợp). Chiếm tỉ lệ cao thứ ba là gene SHV (790bp), 9 gene (mười lăm phần trăm). Các gene IMP (232bp), KPC (798 bp) và BIC (537 bp) chiếm tỉ lệ bằng nhau 3 gene (năm phần trăm). Các gene còn lại chiếm dưới năm phần trăm: NDM (621 bp) 2 gene và OXA (438 bp) 1 gene. Trên 29 loài *Klebsiella pneumoniae*, kết quả PCR đa môi phát hiện được 11 gene kháng thuốc bao gồm TEM (964bp) chiếm tỉ lệ cao nhất với 4 gene được phát hiện (hơn một phần ba trường hợp). Các gene IMP (232bp) và OXA (438 bp) đều có 3 gene. Gene SHV (790bp) chỉ có 1 gene. Các gene còn lại KPC (798 bp), NDM (621 bp), SPM (271 bp) và BIC (537 bp), chúng tôi chưa ghi nhận được sự hiện diện của các gene này đối với *Klebsiella pneumoniae*. Đối với *Pseudomonas aeruginosa*, chúng tôi phát hiện được năm gene kháng thuốc. Trong đó bao gồm: 2 gene IMP (232bp), 2 gene NDM (621 bp) và 1 gene SHV (790bp). Các gene còn lại KPC (798 bp), OXA (438 bp), SPM (271 bp), BIC (537 bp), TEM (964bp) chưa ghi nhận có sự hiện diện trên các loài VK *Pseudomonas aeruginosa* này (bảng 3.14).

Trên 71 loài *A. baumannii*, chúng tôi phát hiện được 58 gene kháng thuốc. Cũng trên các chủng VK này chúng tôi đã xác định được mức độ đề kháng kháng sinh đối với sáu kháng sinh chính yếu sử dụng trên lâm sàng hiện nay cho *A. baumannii*. Các kháng sinh bao gồm: amikacin, colistin, imipenem, levofloxacin, meropenem và sulbactam. Trong tám gene kháng thuốc được phát hiện từ các loài *A. baumannii* chỉ có một số gene có liên quan đến đề kháng một trong sáu loại kháng sinh kể trên. Đối với colistin, kết quả cho thấy không có mối liên quan nào đến việc đề kháng kháng sinh thông qua tám gene kể trên, với OR = 1, tất cả đều không có ý nghĩa thống kê với giá trị $p = 1$. Điều này là phù hợp với lâm sàng và

tiêu chí kháng sinh đồ MIC. Đối với amikacin, chỉ có 3 gene KPC, SPM và TEM là có liên quan đến đề kháng kháng sinh này. *A. baumannii* mang gene KPC có odds kháng với amikacin là 2,94 lần, dao động từ 0,13 – 65, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê với giá trị $p = 0,49$. Đối với *A. baumannii* mang gene SPM có odds kháng với amikacin là 2,56 lần, dao động từ 0,46 – 15,17. Tuy nhiên sự tăng này cũng không có ý nghĩa thống kê, với giá trị $p = 0,27$. Tương tự đối với *A. baumannii* mang gene TEM có odds kháng với amikacin là 1,08 lần (tăng khoảng 8%), dao động từ 0,32 – 3,67. Tuy nhiên sự tăng này cũng không có ý nghĩa thống kê, với giá trị $p = 0,9$. Đối với các gene OXA, BIC và SHV đều không có liên quan đến đề kháng kháng sinh của *A. baumannii* mang gene này đối với amikacin.

Tương tự *A. baumannii* đề kháng đối với imipenem theo tiêu chuẩn kháng sinh đồ định lượng dựa trên que E-test khi $MIC \geq 8 \mu\text{g/ml}$. *A. baumannii* mang các gene KPC, NDM, SPM và TEM có mối liên quan với đề kháng imipenem. Trường hợp của KPC, *A. baumannii* mang gene này có odds đề kháng với imipenem tăng lên 1,67 lần, dao động từ 0,05 - 58,3. Tuy nhiên sự gia tăng này không có ý nghĩa thống kê, với giá trị $p = 0,77$. Tương tự các trường hợp của NDM, SPM và TEM, *A. baumannii* mang các gene này có odds gây đề kháng đối với imipenem tăng lên lần lượt là 1,48, 3,68 và 1,32 lần. Khoảng tin cậy 95% thay đổi lần lượt là 0,03 - 62,8, 0,19 - 71,1 và 0,19 - 9,08. Tuy nhiên tất cả đều không có ý nghĩa thống kê, với giá trị $p > 0,05$ (bảng 3.15).

Ngoài ra *A. baumannii* đề kháng đối với levofloxacin khi $MIC \geq 8 \mu\text{g/ml}$. *A. baumannii* mang các gene KPC, NDM, SPM và TEM, tính trung bình có odds gây đề kháng đối với levofloxacin lần lượt là 1,94, 1,67, 1,17 và 2,03. Tuy nhiên tất cả đều không có ý nghĩa thống kê, với giá trị $p > 0,5$. Hơn nữa đối với kháng sinh meropenem, *A. baumannii* mang các gene KPC, SPM và TEM, tính trung bình có odds đề kháng đối với kháng sinh này lần lượt là 2,22, 1,57 và 1,4. Tuy nhiên tất cả cũng đều không có ý nghĩa thống kê với giá trị $p > 0,05$. Tương tự đối với sulbactam, các VK *A. baumannii* mang các gene KPC, NDM và SPM, tính trung bình có odds đề kháng đối với sulbactam lần lượt là 1,29, 4,55 và 1,65. Với khoảng

tin cậy 95% và giá trị p lần lượt là 0,17 – 9,84, $p = 0,8$; 0,22 – 94,14, $p = 0,32$ và 0,49 – 5,51, $p = 0,41$.

Tất cả các mối liên quan giữa VK mang gene kháng thuốc và đặc tính đề kháng kháng sinh của VK phân lập được đều cho thấy không có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy do số lượng gene kháng thuốc của chúng tôi phát hiện không nhiều (mẫu nhỏ), nên chưa đủ để phát hiện có sự khác biệt có ý nghĩa. Nhưng việc phát hiện ra các gene kháng thuốc này có thể giúp ích được cho các bác sĩ lâm sàng trong việc chỉ định sử dụng kháng sinh. Trong một khoảng thời gian ngắn (khoảng ba giờ) các bác sĩ lâm sàng có thể chọn lựa được kháng sinh trúng đích cho từng loại VK cụ thể. Hạn chế được việc sử dụng kháng sinh ban đầu không phù hợp, cũng như hạn chế được các kháng sinh mạnh phổ rộng không cần thiết.

Tuy nhiên kết quả NC của chúng tôi cũng cần đặt trong bối cảnh kết quả của các NC khác trong và ngoài nước. NC được thực hiện tại bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh. Đây là NC hồi cứu trên 492 BN nghi ngờ VPTM trên lâm sàng. Tổng số có 765 mẫu đàm được hút qua nội khí quản. Thời gian thực hiện NC từ năm 2000 đến năm 2010. Kết quả cấy đàm định lượng với ngưỡng cắt $\geq 10^5$ cfu/ml thì được gọi là dương tính. Qua 11 năm NC phân lập được 206 chủng *Acinetobacter* spp đề kháng với imipenem tăng lên hàng năm. Với tỉ lệ đề kháng của *Acinetobacter* spp đối với imipenem chưa ghi nhận được trường hợp nào vào các năm 2000 và 2001. Tuy nhiên đến năm 2009 và 2010, tỉ lệ đề kháng của *Acinetobacter* spp đối với imipenem là 89,5% và 88,6%. Trên 34 trong 35 chủng *Acinetobacter* spp phân lập được trong năm 2010, được tầm soát các gene liên quan đến đề kháng carbapenem blaOXA-51, blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-58 và blaNDM-1 bằng PCR đa môi. Tất cả 5 gene liên quan đề kháng carbapenem đều được phát hiện trong ít nhất một chủng, phần lớn các chủng đều cho kết quả dương tính hơn 2 gene kháng thuốc. Trong đó 27 chủng *Acinetobacter* spp mang gene blaOXA-51 [79]. Trong NC của chúng tôi chỉ có xuất hiện một chủng trong 71 chủng *Acinetobacter* spp mang gene OXA trong 58 gene được phát hiện. Điều này cũng có thể lý giải như sau: thứ nhất chúng tôi chạy PCR trên môi OXA-48 trên các

chủng *Acinetobacter* spp mà chúng tôi phát hiện được. Thứ hai là sự khác biệt này có thể giải thích là do đặc thù của từng chủng *Acinetobacter* spp ở từng môi trường ICU khác nhau.

Như vậy trải qua 11 tháng NC (11/2014 đến 9/2015) chúng tôi đã thu thập được 220 BN thỏa tiêu chuẩn chẩn đoán VPTM trên lâm sàng. Tất cả 220 BN này đều được nội soi phế quản tại giường và được cấy đàm định lượng. Theo tiêu chuẩn vi sinh kinh điển, chúng tôi phân lập được 177 VK phân thành 11 loài khác nhau. *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa* là ba loài VK phân lập được nhiều nhất. Trên các mẫu dịch rửa phế quản phế nang, chúng tôi giải trình tự và xác định được 99 loài VK. Số loài phát hiện được nhiều nhất trên một mẫu dịch rửa phế quản là 32 loài. Số loài phát hiện được ít nhất là một loài trên một mẫu dịch rửa phế quản phế nang. *Acinetobacter baumannii* là tác nhân thường gặp nhất gây VPTM được định danh dựa vào cả hai phương pháp truyền thống và giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent PGM. Kết quả kháng sinh đồ định lượng dựa trên MIC cho thấy: *Acinetobacter baumannii* kháng với hầu hết kháng sinh hiện có, thường dùng trên lâm sàng hiện nay. Các gene kháng thuốc mà chúng tôi phát hiện được dựa vào các VK thuần. Các gene kháng thuốc này phát hiện được dựa trên ba VK chính yếu gây VPTM là *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa*. Các gene chính yếu phát hiện được bao gồm: IMP, KPC, OXA, NDM, BIC, TEM, SHV, SPM. Như vậy NC này có các điểm đóng góp cho chuyên ngành như sau:

(1) Áp dụng kỹ thuật mới trên hệ thống Ion Torrent PGM kết quả có tính chính xác, nhanh (trong 24 giờ) có thể giúp cho bác sĩ lâm sàng tiên lượng được BN đang điều trị tại các khoa ICU. Kỹ thuật này giúp cho các bác sĩ lâm sàng định hướng được các tác nhân khả dĩ gây VPTM ở các BN nặng. Từ đó giúp cho các bác sĩ ICU có chiến lược nhận ra được các BN nguy cơ cao và có chiến lược điều trị thích hợp nhất cho từng BN nặng, có nhiều nguy cơ. Hơn nữa kỹ thuật sinh học phân tử còn cho ra kết quả mang tính khám phá trong việc xác định hệ vi sinh hiện diện tại đường hô hấp của BN VPTM. Phần nào đó đóng góp vào bức tranh lớn của

hệ vi sinh trong đường hô hấp của BN nghi ngờ VPTM tại các khoa bệnh nặng có thở máy.

(2) Sử dụng phương pháp tiêu chuẩn trong việc lấy mẫu dịch tiết từ đường hô hấp dưới thông qua nội soi phế quản tại giường. Đây là phương pháp duy nhất, hiện nay, tiếp cận chính xác vị trí tổn thương trong đường hô hấp của BN thở máy. Kết quả định danh tác nhân VK hiện diện là đáng tin cậy.

(3) Sử dụng phương pháp vi sinh chuẩn mực mang tính tiên lượng: cấy đàm định lượng và thực hiện kháng sinh đồ định lượng MIC dựa trên que E-test. Thông qua MIC, các bác sĩ ICU dễ dàng áp dụng PK/PD trong việc lựa chọn liều lượng và cách dùng kháng sinh cho các BN nặng phải thở máy. Kết quả này giúp cho bác sĩ lâm sàng dễ dàng áp dụng cho BN trong thực hành hàng ngày và dễ dàng lập lại ở bất cứ bệnh viện nào có khoa vi sinh.

(4) Việc phát hiện ra các gene kháng thuốc trong thời gian sớm nhất giúp cho các bác sĩ lâm sàng có thể chọn lựa được kháng sinh trúng đích cho từng loại VK một trong một thời gian ngắn (3 giờ). Hạn chế được việc sử dụng kháng sinh ban đầu không phù hợp, cũng như hạn chế được việc sử dụng các kháng sinh mạnh, phổ rộng không cần thiết. Phát hiện ra các gene kháng thuốc và kết quả kháng sinh đồ nhằm cảnh báo đối với các nhà quản lý cho việc nâng cao hiệu quả kiểm soát sử dụng kháng sinh và kiểm soát nhiễm khuẩn tại bệnh viện.

(5) Khám phá ra các loài VK mới trong hệ vi sinh của BN VPTM nhằm cảnh báo cho các nhà khoa học, các nhà vi sinh và kiểm soát nhiễm khuẩn, các bác sĩ lâm sàng về tác nhân có thể gây bệnh trên BN thở máy tại các khoa ICU.

Tuy nhiên NC này còn có các điểm hạn chế sau:

(1) Đây là NC lâm sàng, thông tin thu thập được từ hồ sơ bệnh án nên không kiểm soát được chặt chẽ những thông tin ban đầu.

(2) Sinh học phân tử trong chẩn đoán vi sinh chưa được coi là tiêu chuẩn vàng trong việc định danh VK một cách rộng rãi. Tuy nhiên, sinh học phân tử đang

ngày dần có vai trò trong việc định danh VK, ngày càng được khẳng định là phương pháp tham chiếu cho vi sinh kinh điển.

(3) Áp dụng sinh học phân tử trong chẩn đoán vi sinh hiện nay không sẵn có tại mỗi bệnh viện. Do đó, hiện nay chưa áp dụng rộng rãi sinh học phân tử cho vi sinh lâm sàng. Cần đến đầu tư về dụng cụ, trang thiết bị và đào tạo nguồn nhân lực. Tuy nhiên sinh học phân tử, hiện nay, là phương pháp duy nhất khả dĩ trong việc phát hiện, góp phần phòng chống và ngăn ngừa lan truyền bệnh lý truyền nhiễm một khi có dịch xảy ra.

(4) Kinh phí cho một mẫu định danh VK cao hơn so với vi sinh kinh điển. Tuy nhiên vấn đề này có thể khắc phục được bằng cách dán nhãn (barcode) trên các môi đặc hiệu, một lần chạy có thể hàng chục hoặc hàng trăm mẫu giúp ích rút ngắn thời gian và giảm được chi phí. Tuy nhiên việc tinh sạch mẫu trước khi tiến hành li trích DNA nên được thực hiện.

(5) Hiện nay sinh học phân tử chưa thể kết luận tác nhân vi sinh nào là thủ phạm gây bệnh. Tuy nhiên có thể giúp cho bác sĩ lâm sàng tầm soát được khả năng tiềm tàng của VK hiện diện trong mẫu bệnh phẩm không cần qua nuôi cấy. Bên cạnh đó có thể phát hiện được gene kháng thuốc giúp cho bác sĩ chọn lựa được kháng sinh trúng đích và sớm cho BN.

KẾT LUẬN

Qua mười một tháng, chúng tôi đã thực hiện đề tài “*nghiên cứu tác nhân vi khuẩn gây viêm phổi thở máy và gene kháng thuốc bằng kỹ thuật sinh học phân tử*” trên 220 bệnh nhân, chúng tôi đi đến kết luận sau:

1. Định danh vi khuẩn gây viêm phổi thở máy:

Dựa vào vi sinh kinh điển: Có 164 trong 220 bệnh nhân dương tính với cấy định lượng dịch rửa phế quản phế nang. Trong đó có 13 trường hợp dương tính với hai loài vi khuẩn trên cùng một mẫu. Chúng tôi phân lập được 177 vi khuẩn chia thành 11 loài: nhóm trực khuẩn Gram âm không lên men đường *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *C. indologens*, *S. maltophilia*. Nhóm trực khuẩn đường ruột Gram âm *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloace*, *S. marcescens*. Cầu khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* và cầu khuẩn Gram âm *H. influenzae*. Ba loài VK gây VPTM thường gặp nhất là *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* chiếm 81%.

Dựa vào sinh học phân tử: Trên 76 mẫu dịch rửa phế quản phế nang, giải trình tự gene 16S-rRNA, chúng tôi định danh được 388 vi khuẩn chia thành 109 loài. Trong đó có 99 loài được định danh dựa trên các chuỗi trình tự có chiều dài ≥ 200 pb. Số loài phát hiện được nhiều nhất trên một mẫu dịch rửa phế quản phế nang là 32 loài.

So sánh giữa giải trình tự gene 16S-rRNA và vi sinh kinh điển trong định danh vi khuẩn: Có sự đồng thuận cao giữa giải trình tự gene 16S-rRNA và vi sinh kinh điển trên các vi khuẩn Gram âm hoặc Gram dương dễ mọc. Đồng thuận giữa cấy và PGM của *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* là 91,2%, 35,7% và là 85,7%. Đối với *Staphylococcus aureus*, *B. cepacia* và *H. influenzae* đồng thuận là 75%, 67% và 100%. *E. coli* không có trường hợp nào đồng thuận giữa cấy và PGM. Các loài chỉ định danh được bằng Ion Torrent PGM: cầu - trực khuẩn Gram âm hoặc Gram dương, khó mọc, hiếu khí hay yếm

khí và xoắn khuẩn. Nếu dùng kết quả cấy là tiêu chuẩn vàng, thì độ nhạy và độ đặc hiệu của PGM lần lượt là 93,5% và 6%.

2. Kháng sinh đồ của vi khuẩn gây viêm phổi thở máy:

Kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa giấy tẩm kháng sinh: Gần 85% các vi khuẩn phân lập được là đa kháng, kháng cephalosporin thế hệ ba và bốn từ 63% đến 88%. Kháng carbapenem nhóm hai từ 39% đến 71%; cefoperazone – sulbactam và piperacillin – tazobactam là 17% và 64%. Kháng levofloxacin và ciprofloxacin là 72% và 77%; amikacin và genetamycin là 54% và 70%; colistin là 1,6%.

A. baumannii nhạy colistin và cefoperazone – sulbactam là 98% và 93%; kháng carbapenem nhóm hai, fluoroquinolone và aminoglycoside từ 80% đến 90%.

K. pneumoniae nhạy colistin 100%, nhạy carbapenem nhóm hai và aminoglycoside từ 70% đến 95%. Kháng cephalosporin thế hệ ba - bốn, piperacillin – tazobactam và nhóm aminoglycoside từ 50% đến 80%..

P. aeruginosa nhạy colistin và piperacillin – tazobactam là 95% và 68%. Kháng cephalosporin thế hệ ba và bốn, cefoperazon – sulbactam, piperacillin – tazobactam, carbapenem nhóm hai, aminoglycoside, fluoroquinolone 60% đến 86%.

E. coli chưa ghi nhận kháng amikacin và nhạy imipenem và meropenem là 63% và 67. Chỉ có một trong ba trường hợp *Enterobacter* spp kháng ceftazidime, ceftriaxone và piperacillin - tazobactam. *H. influenzae* nhạy hoàn toàn piperacillin - tazobactam, meropenem và levofloxacin. *S. marcescens* chưa ghi nhận kháng thuốc.

Burkholderia cepacia kháng imipenem, amikacin và ciprofloxacin trên 70%. *Stenotrophomonas maltophilia* kháng imipenem, meropenem và amikacin. *Chryseobacterium indologens* kháng imipenem, meropenem và amikacin.

Staphylococcus aureus chưa ghi nhận kháng vancomycin, nhạy clindamycin gần 70%; kháng doxycillin 50%.

Kháng sinh đồ định lượng MIC trên que E-test:

A. baumannii nhạy với colistin 98,6% và 80% colistin có MIC $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$; kháng carbapenem nhóm hai và levofloxacin trên 95%.

K. pneumoniae chưa ghi nhận kháng colistin và amikacin, kháng với meropenem, imipenem và levofloxacin lần lượt là 8%, 23% và 59%.

P. aeruginosa chưa ghi nhận kháng colistin, kháng đối với amikacin, levofloxacin, carbapenem nhóm hai lần lượt là 59%, 76% và trên 76%.

E. coli chưa ghi nhận kháng amikacin, kháng meropenem và imipenem là 10% và 33%. Không có trường hợp nào *E. coli* nhạy levofloxacin. Chưa ghi nhận trường hợp nào *Enterobacter spp*, *H. influenzae* và *Serratia marcescens* kháng amikacin, levofloxacin, imipenem và meropenem.

B. cepacia nhạy với meropenem là 86%. *C. indologens* kháng amikacin, imipenem và meropenem. *S. maltophilia* chỉ nhạy với colistin và levofloxacin.

Kháng sinh đồ Etest và đĩa giấy có kết quả tương đương nhau đối với các vi khuẩn gây viêm phổi thở máy phân lập được. Ngoại trừ trường hợp sulbactam: tỉ lệ nhạy cảm của *A. baumannii* đối với sulbactam 9,5% (Etest) và 93% (đĩa giấy)

3. Các gene kháng thuốc phát hiện được và mối liên quan với MIC:

Có 81% vi khuẩn gây viêm phổi thở máy phân lập được là có mang gene kháng thuốc như sau: IMP, KPC, OXA, NDM, SPM, BIC, TEM, SHV.

Trong 58 gene kháng thuốc phát hiện được từ *A. baumannii*, ba gene phổ biến nhất là SMP, TEM và SHV chiếm 77%. Các gene KPC, IMP và BIC đều chiếm tỉ lệ 5%. Gene NDM chiếm 3,4% và gene OXA chiếm 1,7%.

Trong 41 gene kháng thuốc phát hiện được, *K. pneumoniae* mang các gene BIC, SPM, TEM và SHV chiếm 84%. Các gen IMP, OXA chiếm 9% và 7%.

Có 5 gene kháng thuốc phát hiện được từ *P. aeruginosa*. Trong đó gene IMP và NDM đều có 2 gene, gene SHV có 1 gene.

Có mối liên quan giữa các vi khuẩn *A. baumannii*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* mang gene kháng thuốc và đề kháng các kháng sinh chính yếu trên lâm sàng. Tuy nhiên mối liên quan này chưa đủ mạnh ($P > 0,05$).

KIẾN NGHỊ

1. Thực hiện thêm xét nghiệm định danh và kháng sinh đồ đối với các vi khuẩn yếm khí trong các mẫu dịch tiết đường hô hấp dưới cho những bệnh nhân nghi ngờ viêm phổi thở máy trên lâm sàng.
2. Xét nghiệm tìm nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) thường qui đối với các vi khuẩn gây viêm phổi thở máy. Đặc biệt trên các vi khuẩn nghi ngờ đa kháng kháng sinh.
3. Triển khai sinh học phân tử trong phát hiện vi khuẩn gây bệnh và tìm các gene kháng thuốc tại bệnh viện Nhân Dân Gia Định và các bệnh viện khác trong thành phố Hồ Chí Minh.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU

1. Trần Minh Giang, Trần Văn Ngọc. (2016). Đề kháng của *Klebsiella pneumoniae* gây viêm phổi thở máy tại bệnh viện Nhân Dân Gia Định. Y học thành phố Hồ Chí Minh, 20(1): tr 58-65.
2. Trần Minh Giang, Trần Văn Ngọc. (2016). *Acinetobacter baumannii* đa kháng: kết quả từ nghiên cứu lâm sàng trên bệnh nhân viêm phổi thở máy. Y học thành phố Hồ Chí Minh, 19(5): tr 96-103.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt:

1. Nguyễn Thanh Bảo, Lê Thị Ánh Phúc Nhi, Vũ Thị Tuyết Nga, Đỗ Thị Diệu Linh, Đặng Thanh Bình (2018), "Trực khuẩn Gram âm không lên men đường trong các bệnh nhiễm khuẩn và sự đề kháng kháng sinh", tạp chí *y học thành phố Hồ Chí Minh*, 22(2), tr.149-154.
2. Lê Hữu Thiện Biện (1998), "Viêm phổi nhiễm trùng bệnh viện ở bệnh nhân thở máy", *Thời sự Y Dược học*, 9/1998, tr.240-243.
3. Huỳnh Văn Bình, Lại Hồng Thái, Hồ Minh Văn, Nguyễn Thị Thanh, Hoàng Quốc Thắng (2009), "Khảo sát tình hình viêm phổi bệnh nhân sau mổ có thở máy tại khoa Phẫu Thuật Gây Mê Hồi Sức bệnh viện Nhân Dân Gia Định", tạp chí *y học thành phố Hồ Chí Minh*, 13(6), tr.208-216.
4. Bùi Hồng Giang (2013), *Nghiên cứu đặc điểm vi khuẩn và điều trị nhiễm khuẩn bệnh viện tại khoa Hồi Sức Tích Cực bệnh viện Bạch Mai năm 2012*, luận Văn Thạc Sĩ Y Học, Đại Học Y Hà Nội, tr.41-50.
5. Trần Minh Giang, Trần Văn Ngọc (2013), "Viêm phổi thở máy và đề kháng kháng sinh tại ICU bệnh viện Nhân Dân Gia Định", tạp chí *y học thành phố Hồ Chí Minh*, 17(6), tr 134-139.
6. Lê Hồng Hà, Nguyễn Huỳnh Điệp (2002), *Những Vấn Đề Thiết Yếu Trong Thông Khí Cơ Học*, nhà xuất bản Đà Nẵng, Đà Nẵng, tr.97-104.
7. Lê Bảo Huy (2008), *Khảo sát đặc điểm viêm phổi bệnh viện liên quan đến thở máy tại khoa Hồi Sức Cấp Cứu bệnh viện Thống Nhất*, luận văn thạc sĩ y học, Đại Học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, tr.45-73.
8. Võ Hồng Lĩnh (2001), *Khảo sát nhiễm khuẩn bệnh viện tại khoa Sản Súc Đặc Biệt bệnh viện Chợ Rẫy*, luận văn thạc sĩ y học, Đại Học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, tr.37-57.
9. Dương Bảo Lộc, Hoàng Văn Quang, Trịnh Thị Bích Hà (2018), "Tỉ lệ viêm phổi thở máy và đề kháng kháng sinh do *Acinetobacter baumannii* ở người cao tuổi

- tại bệnh viện Thống Nhất", tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh, 2(2), tr.244-249.
10. Phạm Lực (2013), "Khảo sát in vitro vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện tại khoa Hồi Sức Cấp Cứu bệnh viện Phạm Ngọc Thạch năm 2010-2011", tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh, 17(1), tr.97-104.
 11. Võ Hữu Ngoan (2013), "Nghiên cứu đặc điểm viêm phổi liên quan đến thở máy tại khoa Sản Súc Đặc Biệt bệnh viện Chợ Rẫy", tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh, 17(1), tr.213-219.
 12. Trần Văn Ngọc (2012), *Điều trị viêm phổi bệnh viện và viêm phổi kết hợp thở máy do Acinetobacter baumannii. Cập nhật chẩn đoán bệnh lý hô hấp từ ATS đến ERS và APSR-2011*, nhà xuất bản Y Học thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh, tr.59-65.
 13. Trần Văn Ngọc, Phạm Thị Ngọc Thảo, Trần Thị Thanh Nga (2016), "Xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC₉₀ của các vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện tại bệnh viện Chợ Rẫy", tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh, 20(1), tr.76-84.
 14. Đặng Văn Ninh, Trần Văn Ngọc, Phạm Hùng Vân (2016), "Đề kháng carbapenem của *Pseudomonas aeruginosa* & *Acinetobacter baumannii* gây VP bệnh viện và viêm phổi thở máy tại khoa Hồi Sức Tích Cực tại bệnh viện Nguyễn Tri Phương", tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh, 20(1), tr.85-90.
 15. Phạm Kim Oanh, Nguyễn Văn Hào, Dương Bích Thủy (2018), "Đặc điểm nhiễm trùng bệnh viện tại khoa Cấp Cứu Hồi Sức Tích Cực Chống Độc Người Lớn bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới từ 11/2014 đến 1/2016", tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh, 22(2), tr.92-98.
 16. Trần Đình Phùng, Huỳnh Quang Đại, Phạm Thị Ngọc Thảo (2016), "Nghiên cứu viêm phổi liên quan thở máy tại bệnh viện Chợ Rẫy", tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh, 20(1), tr.91-95.
 17. Vương Thị Ngọc Thảo (2004), *Khảo sát tình hình viêm phổi bệnh viện tại khoa Sản Súc Đặc Biệt bệnh viện Chợ Rẫy*, luận văn thạc sĩ y học, Đại Học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, tr.24-40.

18. Trần Hữu Thông, Nguyễn Đạt Anh, Đặng Quốc Tuấn (2012), "Căn nguyên gây viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Cấp Cứu và Hồi Sức Tích Cực bệnh viện Bạch Mai", *tạp chí Nghiên Cứu Y Học*, 80(3), tr.66-72.
19. Phạm Hùng Vân (2013), *Kháng sinh-đề kháng kháng sinh-kỹ thuật kháng sinh đồ-các vấn đề cơ bản thường gặp*, nhà xuất bản Y Học thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh, tr.51-58.
20. Phạm Hùng Vân (2009), "Nghiên cứu đa trung tâm tình hình đề kháng các kháng sinh của các trực khuẩn Gram âm dễ mọc gây nhiễm khuẩn bệnh viện phân lập từ 1/2007 đến 5/2008", *tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh*, 13(2) tr.1-4.
21. Phạm Hùng Vân (2013), *Kháng sinh-đề kháng kháng sinh-kỹ thuật kháng sinh đồ-các vấn đề cơ bản thường gặp*, nhà xuất bản y Học thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chi Minh, tr.35-50.
22. Phạm Hùng Vân (2013), *Kháng sinh-đề kháng kháng sinh-kỹ thuật kháng sinh đồ-các vấn đề cơ bản thường gặp*, nhà xuất bản y Học thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chi Minh, tr.71-75.

Tài liệu tham khảo Tiếng Anh

23. Alvarez L F- (1996), "Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit. ICU-Acquired Pneumonia Study Group". *Intensive care Medicine*, 22(5), pp.387-394.
24. American Thoracic S, Infectious Diseases Society of A (2005), "Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia". *Am J Respir Crit Care Med*, 171(4), pp.388-416.
25. Ashley A Hibberd A L, Arthur C Ouwehand, Peter Rolny, Helena Lindegren, Lennart Cedgård, Yvonne Wettergren (2017), "Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention". *BMJ open Gastroenterology*, 4(1), e000145.

26. Bahrani-Mougeot F K, Paster B J, Coleman S, Barbuto S, Brennan M T, Noll J, et al. (2007), "Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia". *J Clin Microbiol*, 45(5), pp.1588-1593.
27. Barlam T F, Cosgrove S E, Abbo L M, MacDougall C, Schuetz A N, Septimus E J, et al. (2016), "Implementing an Antibiotic Stewardship ProGram: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America". *Clin Infect Dis*, 62(10), e51-77.
28. Bayram A (2006), "Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey". *BMC Infectious Diseases*, 6(155), pp.1-6.
29. Becker J, Poroyko V, Borhade S (2014), "The lung microbiome after lung transplantation". *Expert Rev Respir Med*, 8(2), pp.221-231.
30. Binh N G, Hayakawa K, Co D X, Tuan N D, Anh N H, Thuy N T, et al. (2015), "The efficacy and nephrotoxicity associated with colistin use in an intensive care unit in Vietnam: Use of colistin in a population of lower body weight". *Int J Infect Dis*, 35, pp.18-23.
31. Bosshard P P, Zbinden R, Abels S, Boddinhaus B, Altwegg M, Bottger E C (2006), "16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory". *J Clin Microbiol*, 44(4), pp.1359-1366.
32. Bryan S. Charles and Reynolds L. Kenneth (1984), "Bacteremic nosocomial pneumonia. Analysis of 172 episodes from a single metropolitan area". *Am Rev Respir Dis*, 129(5), pp.668-671.
33. Bush K, Jacoby G A (2010), "Updated functional classification of beta-lactamases". *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), pp.969-976.
34. CDC (2014), "CDC/NHSN Surveillance Definitions for Specific Types of Infections". (17), pp.1 - 63.

35. CLSI (2014), "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement". 34(1), pp.50-80.
36. Cole J R, Chai B, Farris R J, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen A S, McGarrell D M, et al. (2007), "The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data". *Nucleic Acids Res*, 35(Database issue), D169-172.
37. Combes P F B, Oleyer. C (2000), "Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients, a prospective randomised evaluation of the Stericath closed suctioning system". *Intensive Care Med*, 26(7), pp.878-882.
38. Cook Deborah, Guyatt Gordan, Marshall John et al (1998), "A comparison of sucralfate and ranitidine for the prevention of upper gastrointestinal bleeding in patients requiring mechanical ventilation. Canadian Critical Care Trials Group". *N Engl J Med*, 338(12), pp.791-797.
39. Cook J. Deborah, Walter D. Stephen, Cook J. Richard et al (1998), "Incidence of and Risk Factors for Ventilator-Associated Pneumonia". *Annals of Internal Medicine*, 129(6), pp.433-440.
40. Craven D E, Hudcova J, Lei Y (2011), "Diagnosis of ventilator-associated respiratory infections (VARI): microbiologic clues for tracheobronchitis (VAT) and pneumonia (VAP)". *Clin Chest Med*, 32(3), pp.547-557.
41. Chastre (2006), *pneumonia in the ventilator - dependent patient*, McGraw - Hill, New York, pp.991-1018.
42. Chastre E. Jean L E-C, Fagon Yves - Jean (2013), "*Pneumonia in the ventilator - dependent patient*", McGraw-Hill, New York, pp.1091-1122.
43. Chawla R (2008), "Epidemiology, etiology, and diagnosis of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in Asian countries". *Am J Infect Control*, 36(4 Suppl), S93-100.
44. Dickson R P, Erb-Downward J R, Martinez F J, Huffnagle G B (2016), "The Microbiome and the Respiratory Tract". *Annu Rev Physiol*, 78, pp.481-504.

45. Dore Pierre, Robert Rene, Grollier Ghislaine et al (1996), "Incidence of Anaerobes in Ventilator-associated Pneumonia". *Am J Respir Crit Care Med*, 153(4), pp.1292-1298.
46. Dupont. H, Mentec. H, Sollet. P. J, Bleichner. G (2001), "Impact of appropriateness of initial antibiotic therapy on the outcome of ventilator-associated pneumonia". *Intensive Care Med*, 27(2), pp.355-362.
47. Fàbregas N (1999), "Clinical diagnosis of ventilator associated pneumonia revisited: comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies". *Thorax* 54, pp.867–873.
48. Fadi Bittar H R, Jean-Christophe Dubus, Martine Reynaud-Gaubert, Nathalie Stremler, Jacques Sarles, Didier Raoult, Jean-Marc Rolain (2008), "Molecular Detection of Multiple Emerging Pathogenes in Sputa from Cystic Fibrosis Patients". *PLoS One*, 3(8), e2908.
49. Fagon J-Y (2006), "Diagnosis and Treatment of Ventilator-Associated Pneumonia Fiberoptic Bronchoscopy with Bronchoalveolar Lavage Is Essential". *Semin Respir Crit Care Med*, 27(1), pp.34-44.
50. Flanagan J L, Brodie E L, Weng L, Lynch S V, Garcia O, Brown R, et al. (2007), "Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*". *J Clin Microbiol*, 45(6), pp.1954-1962.
51. Garner. S Julia, Jarvis. R William, Grace Emori. T, Horan. C Teresa, Hughes. M James (1988), "CDC definitions for nosocomial infections, 1988". *American Journal of Infection Control*, 16(3), pp.128-140.
52. Harmsen Dag D S, Roth Andreas, Niemann Stefan, Rothgänger Jörg, Sammeth Michael, Albert Jürgene, Frosch Matthias and Richter Elvira (2003), "RIDOM Comprehensive and public sequence database for identification of Mycobacterium species". *BMC Infectious Disease*, 3(26), pp.1-10.
53. Huebinger R M, Liu M M, Dowd S E, Rivera-Chavez F A, Boynton J, Carey C, et al. (2013), "Examination with next-generation sequencing technology of

- the bacterial microbiota in bronchoalveolar lavage samples after traumatic injury". *Surg Infect (Larchmt)*, 14(3), pp.275-282.
54. Ibrahim H. Emad, Ward Suzanne, Sherman Glenda, Kolef H. Marin (2000), "A comparative analysis of patients with early-onset vs late-onset nosocomial pneumonia in the ICU setting". *Chest*, 117(5), pp.1434-1442.
55. Ikeda S, Tsuboi E, Ono R, Ishikawa S (2010), "Flexible bronchofiberscope". *Jpn J Clin Oncol*, 40(9), e55-64.
56. Imberti R, Cusato M, Villani P, Carnevale L, Iotti G A, Langer M, et al. (2010), "Steady-state pharmacokinetics and BAL concentration of colistin in critically ill patients after IV colistin methanesulfonate administration". *Chest*, 138(6), pp.1333-1339.
57. Janda J M, Abbott S L (2007), "16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls". *J Clin Microbiol*, 45(9), pp.2761-2764.
58. Jean Baldus Patel (2001), "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogene Identification in the Clinical Laboratory". *The Journal of Molecular Diagnostics*, 6(4), pp.313-321.
59. Jeng K, Yang S, Won H, Gaydos C A, Hsieh Y H, Kecojevic A, et al. (2012), "Application of a 16S rRNA PCR-high-resolution melt analysis assay for rapid detection of Salmonella Bacteremia". *J Clin Microbiol*, 50(3), pp.1122-1124.
60. Johanson W G, Pierce K A, Sanford P Y, and Thomas D G (1972), "Nosocomial Respiratory Infections with Gram-Negative Bacilli - The Significance of Colonization of the Respiratory Tract ". *Annals of Internal Medicine*, 77(5), pp.701-706.
61. Kalil A C, Metersky M L, Klompas M, Muscedere J, Sweeney D A, Palmer L B, 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". *Clin Infect Dis*, 63(5), e61-111.
62. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S (2015), "MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogene identification from positive blood cultures". *Int J Med Microbiol*, 305(4-5), pp.469-479.
 63. Kollef H. Martin and Kollef E. Katherine (2005), "Antibiotic utilization and outcomes for patients with clinically suspected ventilator-associated pneumonia and negative quantitative BAL culture results". *Chest*, 128(4), pp.2706-2713.
 64. Kollef H. Martin, Harz Von Benjamin, Prentice Donna (1997), "Patient transport from intensive care increases the risk of developing ventilator-associated pneumonia". *Chest*, 112(3), pp.765-773.
 65. Lam J Y, Wu A K, Ngai D C, Teng J L, Wong E S, Lau S K, et al. (2011), "Three cases of severe invasive infections caused by *Campylobacter rectus* and first report of fatal *C. rectus* infection". *J Clin Microbiol*, 49(4), pp.1687-1691.
 66. Lam M M, Clarridge J E, 3rd, Young E J, Mizuki S (2007), "The other group G *Streptococcus*: increased detection of *Streptococcus canis* ulcer infections in dog owners". *J Clin Microbiol*, 45(7), pp.2327-2329.
 67. Lau K.P. Susanna, Teng L.L. Jade and Woo C.Y. Patrick (2013), *Bacterial Identification Based on Universal Gene Amplification and Sequencing.*, Springer,, New York, pp.483 - 509
 68. Lau S K, McNabb A, Woo G K, Hoang L, Fung A M, Chung L M, et al. (2007), "Catabacter hongkongensis gene. nov., sp. nov., isolated from blood cultures of patients from Hong Kong and Canada". *J Clin Microbiol*, 45(2), pp.395-401.
 69. Lau S K, Woo P C, Woo G K, Fung A M, Wong M K, Chan K M, et al. (2004), "Eggerthella hongkongensis sp. nov. and eggerthella sinensis sp. nov., two

- novel Eggerthella species, account for half of the cases of Eggerthella bacteremia". *Diagn Microbiol Infect Dis*, 49(4), pp.255-263.
70. Leekha S, Standiford H C (2011), "Empiric antimicrobial therapy for Gram-negative sepsis: back to the future". *Crit Care Med*, 39(8), pp.1995-1996.
71. Loonen A J, Jansz A R, Stalpers J, Wolffs P F, van den Brule A J (2012), "An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(7), pp.1575-1583.
72. Luna C M, Aruj P, Niederman M S, Garzon J, Violi D, Prignoni A, et al. (2006), "Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia". *Eur Respir J*, 27(1), pp.158-164.
73. Lung M, Codina G (2012), "Molecular diagnosis in HAP/VAP". *Curr Opin Crit Care*, 18(5), pp.487-494.
74. Maksum R (2011), "Antibiotic sensitivity pattern of bacterial pathogens in the intensive care unit of Fatmawati Hospital, Indonesia". *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(1), pp.39-42.
75. McGovern Murphy F, Raymond M, Menard P A, Bejar-Ardiles K R, Carignan A, Lesur O (2014), "Ventilator-associated pneumonia and endotracheal tube repositioning: an underrated risk factor". *Am J Infect Control*, 42(12), pp.1328-1330.
76. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. (2008), "Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria". *J Clin Microbiol*, 46(6), pp.1946-1954.
77. Mignard S, Flandrois J P (2006), "16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment". *J Microbiol Methods*, 67(3), pp.574-581.

78. Mwanri (2014), "Multi-drug resistant organisms and patients' risk factors in the intensive care unit of King Fahad Hofuf hospital, Saudi Arabia". *International Journal of Health and Psychology Research*, 2(1), pp.8-25.
79. Nhu N T, Lan N P, Campbell J I, Parry C M, Thompson C, Tuyen H T, et al. (2014), "Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* as the major cause of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients at an infectious disease hospital in southern Vietnam". *J Med Microbiol*, 63(Pt 10), pp.1386-1394.
80. Patel R (2015), "MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases". *Clin Chem*, 61(1), pp.100-111.
81. Paterson D L, Bonomo R A (2005), "Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update". *Clin Microbiol Rev*, 18(4), pp.657-686.
82. Patrick C Y (2000), "Identification of *Mycobacterium neoaurum* Isolated from a Neutropenic Patient with Catheter-Related Bacteremia by 16S rRNA Sequencing". *Journal of clinical Microbiology*, 38(9), pp.3515–3517.
83. Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P (2010), "Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia". *Antimicrob Agents Chemother*, 54(11), pp.4914-4916.
84. Pugin J (1991), "Diagnosis of Ventilator-associated Pneumonia by Bacteriologic Analysis of Bronchoscopic and Nonbronchoscopic "Blind" Bronchoalveolar Lavage Fluid". *Am Rev Respir Dis*. 1991 May;143(5 Pt 1):1121-9, 143(5pt1), pp.1121-1129.
85. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supakul P, Wachapong S, Mahotarn K, Brennan P J (2006), "A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens". *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48(3), pp.319-328.
86. Phu V D, Nadjm B, Duy N H A, Co D X, Mai N T H, Trinh D T, et al. (2017), "Ventilator-associated respiratory infection in a resource-restricted setting: impact and etiology". *J Intensive Care*, 5(69), pp.1-9..

87. Phu V D, Wertheim H F, Larsson M, Nadjm B, Dinh Q D, Nilsson L E, et al. (2016), "Burden of Hospital Acquired Infections and Antimicrobial Use in Vietnamese Adult Intensive Care Units". *PLoS One*, 11(1), e0147544.
88. Qiulong Y (2016), "Metagenomic Analysis of Sputum Microbiome as a Tool toward Culture-Independent Pathogene Detection of Patients with Ventilator-associated Pneumonia". *AJRCCM Articles in Press*, 594(5), pp.4-12.
89. Radji M, Fauziah S, Aribinuko N (2011), "Antibiotic sensitivity pattern of bacterial pathogens in the intensive care unit of Fatmawati Hospital, Indonesia". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), pp.39-42.
90. Rello J (1999), "Variations in etiology of ventilator-associated pneumonia across four treatment sites implications for antimicrobial prescribing practices". *Am J Respir Crit Care Med.*, 160(2), pp.608-613.
91. Rello J, Diaz E, Rodriguez A (2005), "Etiology of ventilator-associated pneumonia". *Clin Chest Med*, 26(1), pp.87-95.
92. Rousee J M, Bermond D, Piemont Y, Tournoud C, Heller R, Kehrl P, et al. (2002), "Dialister pneumosintes Associated with Human Brain Abscesses". *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), pp.3871-3873.
93. Ruiz M (2000), "Diagnosis of Pneumonia and Monitoring of Infection Eradication". *Drugs*, 60(6), pp.1289-1302.
94. Sanchez-Nieto M.J, Torres A, Garcia-Cordoba F (1998), "Impact of invasive and noninvasive quantitative culture sampling on outcome of ventilator associated pneumonia a pilot study". *Am J Respir Crit Care Med*, 157(2), pp.371–376.
95. Schultz M B, Pham Thanh D, Tran Do Hoan N, Wick R R, Ingle D J, Hawkey J, et al. (2016), "Repeated local emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single hospital ward". *Microb Geneom*, 2(3), e000050.
96. Snel Berend, Bork Peer, Huynen. A Martijn. (1999), "Genome phylogeny based on gene content". *Nature genetics*, 21(1), pp.108–110.

97. Stratton Y-W T a C W (2013), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, Springer, New York, pp.355 - 364.
98. Sun J R, Yan J C, Yeh C Y, Lee S Y, Lu J J (2007), "Invasive infection with *Streptococcus iniae* in Taiwan". *J Med Microbiol*, 56(Pt 9), pp.1246-1249.
99. Susanna K.P. Lau J L L T, and Patrick C.Y. Woo (2013), *Bacterial Identification Based on Universal Gene Amplification and Sequencing*, Springer, New York, pp.483 - 509.
100. Tang Y W (2009), "Duplex PCR Assay Simultaneously Detecting and Differentiating *Bartonella quintana*, *B. henselae*, and *Coxiella burnetii* in Surgical Heart Valve Specimens". *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), pp.2647-2650.
101. Tatsuya T, Tohru M-A, Yasuyuki K, Norio O, Nozomi T, Nguyen Viet Hung, Doan Mai Phuong, Truong Anh Thu, Nguyen Gia Binh, Nguyen Quoc Anh, Tran Thi Thanh Nga, Pham Hong Truong, Phan Thi Xuan, Le Thi Anh Thu, Nguyen Truong Son and Teruo Kirikae, Tatsuya T (2013), "Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam ". *BMC Infectious Diseases*, 13(251), pp.2-6.
102. Teng J L, Yeung M Y, Yue G, Au-Yeung R K, Yeung E Y, Fung A M, et al. (2011), "In silico analysis of 16S rRNA gene sequencing based methods for identification of medically important aerobic Gram-negative bacteria". *J Med Microbiol*, 60(Pt 9), pp.1281-1286.
103. Tobin M J (2013), *Principles and practice of Mechanical Ventilation* McGraw-Hill, New York, pp.1091-1122.
104. Trouillet J-L (1998), "Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria". *Am J Respir Crit Care Med*, 157(2), pp.531-539.
105. Vincent (2009), "International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units". *JAMA*, 302(21), pp.2323-2329.

106. Vincent J-L (1995), "The Prevalence of Nosocomial Infection in Intensive Care Units in Europe". *JAMA*, 274(8), pp.639-644.
107. Wilson K.H B R, Frothingham. R and Wilson. J.A.P (1991), "Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium". *The Lancet*, 338, pp.474-475.
108. Wimberley N (1979), "A Fiberoptic Bronchoscopy Technique to Obtain Uncontaminated Lower Airway Secretions for Bacterial Culture". *American Review Of Respiratory Disease*, 119, pp.337-343.
109. Woo P C, Chung L M, Teng J L, Tse H, Pang S S, Lau V Y, et al. (2007), "In silico analysis of 16S ribosomal RNA gene sequencing-based methods for identification of medically important anaerobic bacteria". *J Clin Pathol*, 60(5), pp.576-579.
110. Woo P C, Teng J L, Wu J K, Leung F P, Tse H, Fung A M, et al. (2009), "Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria". *J Med Microbiol*, 58(Pt 8), pp.1030-1036.
111. Woo P C, Teng J L, Yeung J M, Tse H, Lau S K, Yuen K Y (2011), "Automated identification of medically important bacteria by 16S rRNA gene sequencing using a novel comprehensive database, 16SpathDB". *J Clin Microbiol*, 49(5), pp.1799-1809.
112. Woo P C, Tse H, Chan K M, Lau S K, Fung A M, Yip K T, et al. (2004), "'Streptococcus milleri' endocarditis caused by Streptococcus anginosus". *Diagn Microbiol Infect Dis*, 48(2), pp.81-88.
113. Woo P C Y, Leung K W, Wong S S Y, Chong K T K, Cheung E Y L, Yuen K Y (2002), "Relatively Alcohol-Resistant Mycobacteria Are Emerging Pathogens in Patients Receiving Acupuncture Treatment". *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), pp.1219-1224.
114. Woo P C Y, Ng K H L, Lau S K P, Yip K t, Fung A M Y, Leung K w, et al. (2003), "Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant

- Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles". *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), pp.1996-2001.
115. Woo P C Y, Tam D M W, Lau S K P, Fung A M Y, Yuen K Y (2004), "Enterococcus cecorum Empyema Thoracis Successfully Treated with Cefotaxime". *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 919-922.
 116. Xia L P, Bian L Y, Liu Y, Tang A L, Ye W Q (2015), "16S rRNA gene sequencing is a non-culture method of defining the specific bacterial etiology of ventilator-associated pneumonia". *Int J Clin Exp Med*, 8(10), pp.18560-18570.
 117. Yang X, Wang X, Liang Z, Zhang X, Wang Y, Wang Z (2014), "The use of 16S rDNA sequencing in species diversity analysis for sputum of patients with ventilator-associated pneumonia". *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 26(5), pp.294-299.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Bảng thu thập số liệu

BẢNG THU THẬP SỐ LIỆU

Số:.....

I. Hành chánh:

1. Họ và tên:.....năm sinh:....., giới: nam 1, nữ 0
2. Số nhập viện:...../ 2014
3. Địa chỉ:.....
4. Ngày giờ nhập viện: giờ:....., ngày:....., tháng:....., năm:.....
5. Ngày giờ nhập SSDB: giờ:....., ngày:....., tháng:....., năm:.....
6. Ngày giờ ĐNKQ: giờ:....., ngày:....., tháng:....., năm:.....

II. Lý do chính nhập viện:

III. Chẩn đoán lúc nhập sẵn sóc đặc biệt:.....

IV. Tiền sử bệnh:.....

V. Tình trạng lúc nhập SSDB:

1. Sinh hiệu: Mạch:..... L/P; HA:.../.....mmHg; HATB=.....mmHg; SPO₂:..... %;
T^o:.....^oC; ĐH:.....mg/dL; Creatinin:...mg/dL; Na⁺:...mEq/L; K⁺:.....mEq/l;
Hct:.....%; BC:..... /mm³; pH:.....; PaO₂:.....; PaCO₂:.....; HCO₃⁻:.....;
AaDO₂:.....; FiO₂:.....;GCs:.....
2. Thang điểm Apache-II:.....

VI. Diễn tiến điều trị:

1. Dùng thuốc an thần dẫn cơ lúc đang thở máy:

Có dùng thuốc an thần dẫn cơ (Nếu có hỏi phần tiếp theo)	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Nếu có dùng liên tục hay ngắt quãng	Liên tục	1	<input type="checkbox"/>
	Ngắt quãng	0	
Midazolam	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Seduxen	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Fentanyl	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Norcuron	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Propofol	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Suxamethonium	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Khác:			

2. Dùng thuốc dạ dày: có 1; không 2 - Nếu có, loại dùng:

Ức chế bơm proton	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Ức chế H2	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Kháng acid	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Sucralfate	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

3. Đặt lại nội khí quản:

Đặt lại nội khí quản	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Nếu có: số lần	Một lần	1	<input type="checkbox"/>
	Hai lần	2	
	Ba lần	3	
	Bốn lần	4	

VII. Đánh giá bệnh nhân trước khi nội soi phế quản tại giường

Ngày thứ mấy sau thở máy -----:

1. Triệu chứng VP trên lâm sàng:

- Nhiệt độ kẹp ở nách:°C

- Tăng tiết đàm:

Tăng tiết đàm	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Band:	1+	1	<input type="checkbox"/>
	2+	2	
	3+	3	

- Bạch cầu máu:/mm³

- Ran ở phổi:

Ran nổ	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Ran ẩm	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Ran rít	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Ran ngáy	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

Ran ứ đọng	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

- Thâm nhiễm phổi:

Phổi phải	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Phổi trái	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

- Nếu phổi phải:

Thùy trên	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Thùy giữa	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Thùy dưới	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Một bên phổi	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

- Nếu phổi trái:

Thùy trên	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Thùy dưới	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Một bên phổi	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

2. Kháng sinh đang sử dụng: có 1 ; không 0

- Nếu có, loại dùng:

Imipenem	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Meropenem	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Colistin	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Cephaloperazone/sulbactam	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Piperacilline/Tazobactam	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Cephalosporine 4	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Cephalosporine 3	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Ticar/Acid Clavulanic	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Levofloxacin	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Moxifloxacin	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Ciprofloxacin	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Aminoglycoside	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Khác:.....			

- Số ngày điều trị kháng sinh trước đó:.....ngày.

3. Theo dõi bệnh nhân soi phế quản:

<i>Thời gian(p)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
Mạch (L/P)							
HA(mmHg)							
SPO ₂ (%)							
<i>Thời gian(p)</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>	<i>14</i>
Mạch (L/P)							
HA(mmHg)							
SPO ₂ (%)							

4. Mô tả sang thương:

- Niêm mạc khí phế quản:

Màu sắc niêm mạc	Hồng	1	<input type="checkbox"/>
	Nhợt	2	
Bề mặt niêm mạc	Trơn láng	1	<input type="checkbox"/>
	Xước đỏ	2	
	Sùi	3	
Chảy máu	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Khác:.....			

- Màu sắc đờm:

Màu sắc đờm	Trắng	1	<input type="checkbox"/>
	Vàng	2	
	Xanh	3	
	Khác	4	

- Vị trí lấy bệnh phẩm:

Phổi phải	Thùy trên	1	<input type="checkbox"/>
	Thùy giữa	2	
	Thùy dưới	3	
Phổi trái	Thùy trên	1	<input type="checkbox"/>
	Thùy dưới	2	

5. Theo dõi biến chứng sau soi phế quản tại giường:

Biến chứng	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

- Nếu có, hỏi tiếp loại biến chứng:

Chảy máu	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Tràn khí dưới da	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Tràn khí trung thất	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Khác:.....			

VIII. Kết quả cấy đàm định lượng và kháng sinh đồ:

1. Đếm số khuẩn lạc:

$\geq 10^4$ đơn vị tạo khuẩn lạc/ml	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
$< 10^4$ đơn vị tạo khuẩn lạc/ml	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	

2. Định danh VK:

3. Kết quả kháng sinh đồ 1:

Tên VK:.....

Kháng sinh	S	I	R	Kháng sinh	S	I	R	Kháng sinh	S	I	R
Amikacin				Ceftriaxon				Levofloxacin			
Ampicillin				Ciprofloxacin				Meropenem			
Ampi/sul				Colistin				Moxifloxacin			
Azithromycin				Clindamycin				Netilmicin			
Cefepim				Doxycillin				Oxacillin			
Cefoperazon				Ertapenem				Piper/tazo			
Cefo/sul				Gentamycin				Ticar/clavu			
Ceftazidim				Imipenem				Vancomycin			

4. Kết quả kháng sinh đồ 2:

Tên VK:.....

Kháng sinh	S	I	R	Kháng sinh	S	I	R	Kháng sinh	S	I	R
Amikacin				Ceftriaxon				Levofloxacin			
Ampicillin				Ciprofloxacin				Meropenem			
Ampi/sul				Colistin				Moxifloxacin			
Azithromycin				Clindamycin				Netilmicin			
Cefepim				Doxycillin				Oxacillin			
Cefoperazon				Ertapenem				Piper/tazo			
Cefo/sul				Gentamycin				Ticar/clavu			
Ceftazidim				Imipenem				Vancomycin			

IX. Kết quả kháng sinh đồ MIC:

AMIKACIN:µg/ml

COLISTIN:µg/ml

IMIPENEM:µg/ml

LEVOFLOXACIN:µg/ml

MEROPENEM:µg/ml

SULBACTAM:µg/ml

X. Giải trình tự 16S rRNA:**XI. Giải trình tự tìm gen kháng thuốc:****XII. Kết quả điều trị:**

Hết sốt	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Giảm tiết đàm	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Bạch cầu máu bình thường	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
X-quang ngực hết thâm nhiễm	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Giảm tiêu thụ oxy	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Cai được máy thở	Có	1	<input type="checkbox"/>
	Không	0	
Ra khỏi khoa	Xuất thường	1	<input type="checkbox"/>
	Chuyển khoa	2	
	Chuyển viện	3	
	Xuất nặng	4	
	Tử vong	5	

Ngày giờ ra khỏi khoa SSDB: giờ:....; gày:....; tháng:....; năm:.....

Tổng số ngày nằm SSDB:.....

Chẩn đoán lúc ra khỏi khoa:

Phụ lục 2. Phiếu đồng ý tham gia nghiên cứu

Kính thưa quý ông, bà là thân nhân của bệnh nhân....., tuổi:, đang điều trị tại khoa Sản Súc Đặc Biệt, bệnh viện Nhân Dân Gia Định, tại giường:.....

Chúng tôi sẽ tiến hành nội soi phế quản tại giường cho người thân của quý ông, quý bà để lấy đàm. Nhằm phục vụ trong việc chẩn đoán chính xác và điều trị tốt nhất cho người bệnh.

Chúng tôi cố gắng hết sức làm giảm tối đa những nguy hại của thủ thuật nội soi cho người bệnh.

Thủ thuật này phía gia đình người bệnh hoàn toàn không phải trả bất kỳ chi phí gì cho tiền công làm thủ thuật.

Chúng tôi rất mong sự đồng ý của quý người nhà của người bệnh. Chân thành biết ơn quý ông, bà rất nhiều.

BV. Nhân Dân Gia Định, ngày.....thángnăm.....

Thân nhân người bệnh

Người nghiên cứu

BS. TRẦN MINH GIANG

Phụ lục 3: Bản thông tin dành cho đối tượng nghiên cứu và chấp thuận tham gia nghiên cứu

Tên nghiên cứu:.. **NGHIÊN CỨU TÁC NHÂN VI KHUẨN GÂY VIÊM PHỔI THỞ MÁY VÀ GENE KHÁNG THUỐC BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ**

Nhà tài trợ: không

Nghiên cứu viên chính: Ths.BS Trần Minh Giang

Đơn vị chủ trì: Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

(Bản Thông tin dành cho đối tượng nghiên cứu và chấp thuận tham gia nghiên cứu cần phải có ít nhất những thông tin dưới đây. Có thể có thêm các thông tin khác, tùy theo từng nghiên cứu).

I.THÔNG TIN VỀ NGHIÊN CỨU

Mục đích và tiến hành nghiên cứu

- Viêm phổi thở máy là viêm nhu mô phổi xảy ra từ ngày thứ 02 của thở máy trở đi. Viêm phổi thở máy là nguyên nhân chính làm cho người bệnh phải thở máy kéo dài, tốn kém nhiều tiền và công sức của nhân viên y tế và người nhà. Viêm phổi thở máy cũng là nguyên nhân chính làm cho người bệnh tử vong. Chính vì vậy mà xác định chính xác nguyên nhân gây ra viêm phổi thở máy là rất quan trọng. Vì vậy chúng tôi mới tiến hành nghiên cứu này trên người nhà của quý bệnh nhân nhằm mục tiêu tìm chính xác nguyên nhân gây ra bệnh viêm phổi thở máy. Để từ đó chúng tôi có các quyết định tốt nhất trong điều trị cho người bệnh.

- Nghiên cứu sẽ được tiến hành như sau: người bệnh nằm điều trị tại khoa săn sóc đặc biệt sau 02 ngày thở máy có kèm theo sốt, đàm vàng trào ra ống đặt ở đường thở, chụp X-quang phổi bác sĩ xác định có viêm phổi. Các triệu chứng này trước khi gắn ống thở (thở máy) thì không có. Nếu người nhà của quý vị có các triệu chứng kể trên tôi sẽ tiến hành nội soi phế quản tại giường cho người bệnh. Thủ thuật này là

chúng tôi dùng ống soi mềm luồn qua ống thở vào tới phổi của người bệnh để chúng tôi hút đàm. Thủ thuật này kéo dài khoảng 5 phút. Thông thường chúng tôi lấy đàm cho người bệnh bằng cách dùng ống nhựa mềm cũng luồn qua ống thở rồi nối với máy hút áp lực âm để hút đàm cho người bệnh. Tiêu chuẩn để chúng tôi loại ra khỏi nghiên cứu như sau: Bệnh nhân < 18 tuổi, đã có viêm phổi thở máy xảy ra trước 48 giờ, bệnh nhân bị nhồi máu cơ tim trong 24 giờ đầu, rối loạn nhịp tim nguy hiểm chưa kiểm soát được, tiểu cầu dưới $60.000/mm^3$, phụ nữ có thai cũng như người bệnh ghép tạng và người bệnh bị suy giảm miễn dịch mắc phải. Nghiên cứu này chúng tôi dự kiến kéo dài trong 12 tháng để tuyển chọn đủ số ca bệnh.

- Số người sẽ tham gia vào nghiên cứu: chúng tôi dự kiến sẽ tuyển chọn 220 người vào nghiên cứu.
- Bản chất và mức độ tham gia của những người tham gia nghiên cứu: tất cả những người bệnh tham gia nghiên cứu và những người bệnh không tham gia nghiên cứu đều được chăm sóc và điều trị đúng theo phác đồ của khoa. Mỗi người bệnh chỉ tham gia tối đa là một lần trong một lần nhập viện vào khoa Sản Súc Đặc Biệt.

Các nguy cơ và bất lợi:

- Liệu có những nguy cơ nào? Nguy cơ trong lúc làm thủ thuật nội soi phế quản tại giường bao gồm: giảm oxy trong lúc nội soi, chảy máu trong phổi, thủng phổi. Tuy nhiên trong 8 năm thủ thuật này được làm tại khoa Sản Súc Đặc Biệt chúng tôi chưa ghi nhận có trường hợp nào xảy ra các biến chứng vừa kể trên. Người bệnh thở máy liên tục trong lúc soi, việc giảm oxy của người bệnh trong lúc soi gần như hoàn toàn được tránh khỏi. Chúng tôi điều chỉnh áp lực hút vừa đủ để hút được đàm và hút rất nhẹ nhàng để tránh chảy máu trong phổi. Chúng tôi không làm sinh thiết trong phổi vì vậy nguy cơ làm thủng phổi gần như hoàn toàn không xảy ra.
- Những lợi ích có thể có đối với người tham gia: chúng tôi tiến hành hút sạch đàm trong lúc soi phế quản cho người bệnh. Tác nhân gây viêm phổi tìm được là chính xác, giúp cho bác sĩ điều trị cho người bệnh chọn đúng thuốc, đúng liều lượng cho

người bệnh. Mặt khác giúp cho bác sĩ điều trị phán đoán được phần nào mức độ nguy hiểm của viêm phổi.

- Những người tham gia có thể mong đợi những lợi ích gì? Bác sĩ điều trị của người bệnh biết được chính xác vi khuẩn gây bệnh. Đồng thời biết được vi khuẩn phát hiện được kháng với kháng sinh thử nghiệm ở nồng độ bao nhiêu. Từ đó bác sĩ điều trị của người bệnh chọn đúng kháng sinh và đúng liều lượng để dùng cho người bệnh. Nhằm mục đích diệt được tối đa vi khuẩn gây viêm phổi, giúp người bệnh mau hết viêm phổi.

- Chi phí/chi trả cho đối tượng: chúng tôi không chi trả đồng nào cho người nhà của người bệnh được tham gia nghiên cứu.

- Những khoản sẽ được chi trả trong nghiên cứu: Người nhà không cần phải chi trả cho thủ thuật nội soi này. Người nhà cũng không phải chi trả cho việc làm xét nghiệm giải trình tự để định danh vi khuẩn cũng như tìm gen kháng thuốc của vi khuẩn. Người nhà cũng không phải chi trả cho tiền làm kháng sinh đồ định lượng nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh đối với vi khuẩn. Tuy nhiên người nhà phải chi trả cho tiền định danh và làm kháng sinh đồ khuếch tán cho bệnh viện. Vì đây là phương pháp thường qui hàng ngày. Các xét nghiệm thường qui khác để phục vụ cho công tác điều trị hàng ngày người nhà phải chi trả cho bệnh viện. Tiền ăn, tiền giường, tiền đồ dùng tiêu hao, tiền thuốc và dịch truyền hàng ngày người nhà phải chi trả cho bệnh viện.

- Chi phí đi lại và ăn uống của người nhà bệnh nhân là tự túc. Các ngày nghỉ của người nhà để nuôi người bệnh chúng tôi không bù đắp cho việc mất thu nhập này.

Bồi thường/điều trị khi có tổn thương liên quan đến nghiên cứu:

- Người tham gia được điều trị miễn phí trong trường hợp xảy ra biến chứng do nội soi phế quản tại giường.

Người liên hệ

- Họ tên, số điện thoại người cần liên hệ:

Sự tự nguyện tham gia

- Người tham gia được quyền tự quyết định, không hề bị ép buộc tham gia
- Người tham gia có thể rút lui ở bất kỳ thời điểm nào mà không bị ảnh hưởng gì đến việc điều trị/chăm sóc mà họ đáng được hưởng.
- Trong trường hợp là người vị thành niên, suy giảm trí tuệ hoặc mất khả năng, việc lấy bản chấp thuận tham gia từ người đại diện hợp pháp.

Tính bảo mật

- Công bố rõ việc mô tả các biện pháp để giữ và đảm bảo tính bảo mật của các bản ghi liên quan đến người tham gia

II. CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tôi đã đọc và hiểu thông tin trên đây, đã có cơ hội xem xét và đặt câu hỏi về thông tin liên quan đến nội dung trong nghiên cứu này. Tôi đã nói chuyện trực tiếp với nghiên cứu viên và được trả lời thỏa đáng tất cả các câu hỏi. Tôi nhận một bản sao của Bản Thông tin cho đối tượng nghiên cứu và chấp thuận tham gia nghiên cứu này. Tôi tự nguyện đồng ý tham gia.

Chữ ký của người tham gia:

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Chữ ký của người làm chứng hoặc của người đại diện hợp pháp (nếu áp dụng):

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Chữ ký của Nghiên cứu viên/người lấy chấp thuận:

Tôi, người ký tên dưới đây, xác nhận rằng bệnh nhân/người tình nguyện tham gia nghiên cứu ký bản chấp thuận đã đọc toàn bộ bản thông tin trên đây, các thông tin này đã được giải thích cặn kẽ cho Ông/Bà và Ông/Bà đã hiểu rõ bản chất, các nguy cơ và lợi ích của việc Ông/Bà tham gia vào nghiên cứu này.

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Phụ lục 4: Quy trình nội soi phế quản tại giường

Chỉ định: thực hiện nội soi phế quản tại giường khi: lâm sàng bệnh nhân sốt $\geq 38^{\circ}\text{C}$, hoặc $\leq 36,5^{\circ}\text{C}$; tăng tiết đàm hoặc đàm đổi màu qua nội khí quản hoặc qua khai khí quản; tăng tiêu thụ oxy kèm hoặc bạch cầu máu $\geq 12000/\text{mm}^3$ hay $\leq 4000/\text{mm}^3$, hoặc thâm nhiễm lan tỏa trên X quang ngực hay thâm nhiễm tiến triển trên X quang ngực.

Sử dụng ống soi: dùng ống soi mềm LF-TP, chiều dài cần soi 60cm, hệ thống quang học: trường quan sát 900, nhìn xa 50cm; đường kính ngoài đầu tận 5,1 mm, đường kính ngoài ống 5,2 mm, đường kính trong kênh hút 2,6mm; gập góc lên hoặc xuống 1200; hãng Olympus; Nhật Bản.

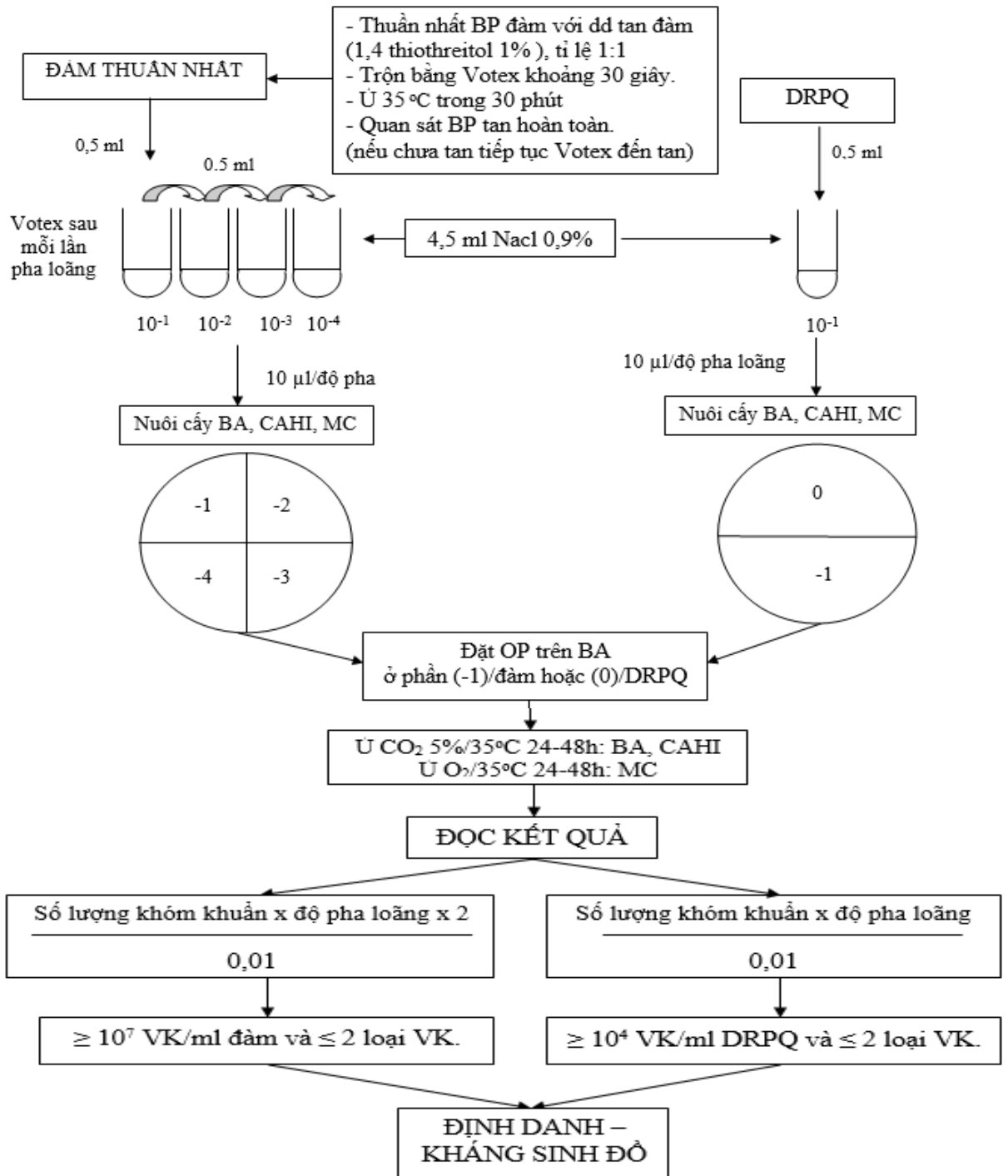
Chuẩn bị máy soi: người phụ trách sẵn vô khuẩn lên xe thủ thuật, dùng kèm vô khuẩn kẹp 10 miếng gạc nhỏ, ba cốc vô khuẩn, hai đôi găng phẫu thuật, một ống tiêm 10cc, hai ống tiêm 3cc, một ngáng miệng, một lọ đựng đàm vô khuẩn dk-3465 Unomedical, Đan Mạch. Tất cả để vào sẵn vô khuẩn. Một típ xylocaine jelly 2% vô khuẩn, 30 gram, hãng Astrazeneca, Thụy Điển; một ống midazolam 5mg/2ml; fentanyl 0,1mg/ 2ml và hoặc suxamethonium 100mg/2ml cho vào ngăn tủ xe thủ thuật. Người phụ rót đầy ba cốc riêng lẻ theo thứ tự nước cất, cydezim, cidex; lấy máy soi từ trong tủ, lắp pin, thử đèn; đặt máy soi lên sẵn vô khuẩn. Người phụ hút sạch đàm trong khí quản và vùng hầu họng.

Chuẩn bị phim X quang ngực: tất cả các phim x quang ngực của bệnh nhân được đọc bởi bác sĩ chuyên khoa chẩn đoán hình ảnh. Phim X quang được gắn vào đèn đọc phim, chúng tôi xem xét kỹ lưỡng vị trí cần tiếp cận để tiến hành làm thủ thuật lấy bệnh phẩm. Các trường hợp tổn thương khu trú ở một thùy phổi trên X quang ngực thẳng. Chúng tôi tiến hành soi phế quản vào vị trí của thùy phổi nghi ngờ tổn thương đó để lấy bệnh phẩm. Trong trường hợp tổn thương nhiều hơn một thùy phổi hoặc cả hai bên phổi, vị trí lấy đàm được ưu tiên là thùy dưới. Trong trường hợp tổn thương trên X quang không rõ ràng, chúng tôi quyết định làm thủ thuật rửa phế quản phế nang ở tiểu phế quản phân thùy dưới bên phải.

Chuẩn bị bệnh nhân: tất cả bệnh nhân được sử dụng an thần và hoặc dẫn cơ, nằm đầu cao $\geq 30^\circ$ trừ trường hợp chống chỉ định. Dùng monitor hãng Nihon kohden bsm-4103k, Nhật Bản theo dõi liên tục điện tâm đồ, SpO₂, và ghi nhận huyết áp mỗi phút qua huyết áp động mạch xâm lấn hoặc đo huyết áp tự động ở cánh tay không phải gắn đo độ bão hòa oxy theo mạch đập. Nếu bệnh nhân tỉnh, chúng tôi tiến hành tiêm tĩnh mạch midazolam 2,5mg và fentanyl 0,05mg và hoặc 50mg suxamethonium, đặt ngáng miệng.

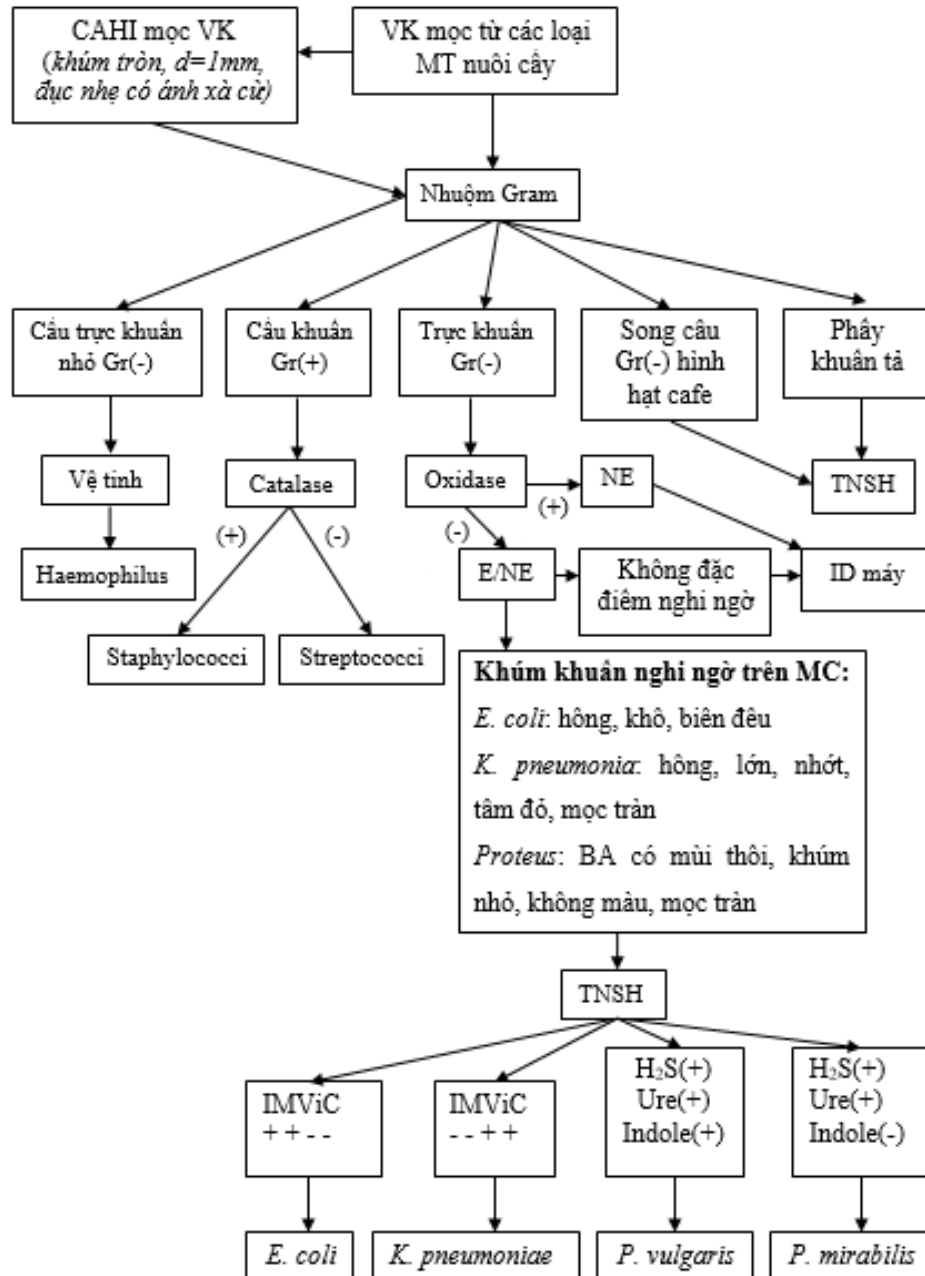
Tiến hành nội soi phế quản tại giường: tác giả là người trực tiếp thực hiện nội soi phế quản tại giường phải đội nón, mang khẩu trang phẫu thuật, rửa tay, mặc áo choàng và mang găng vô khuẩn. Dùng gạc thấm nước cất lau sạch cần soi và gắn đầu dây hút đàm vào máy soi, hút nhẹ tráng kênh sinh thiết bằng nước cất vô khuẩn 4-5 lần, bôi trơn cần ống soi bằng xylocaine jelly 2% vô khuẩn. Người soi quan sát bệnh nhân, điện tâm đồ liên tục, SpO₂, và huyết áp. Người phụ chuyển chế độ thở kiểm soát có hỗ trợ, chỉnh phân áp oxy hít vào lên 100%. Sát khuẩn đầu ống nội khí quản nơi đưa ống soi vào bằng cồn 900, sau đó được lau sạch đầu nối ống nội khí quản bằng gạc vô khuẩn, quan sát bệnh nhân và màng hình theo dõi trong suốt quá trình soi. Báo cho người soi biết ngay khi có các triệu chứng báo động: SpO₂ < 90%, bệnh nhân tím tái, HA tụt và nhịp tim tăng > 20%, hoặc nhịp tim chậm < 50 nhịp/phút. Người soi đưa ống soi vào ống nội khí quản, quan sát khí quản, phế quản góc, các lỗ phế quản phân thùy. Người soi quan sát thật kỹ lưỡng niêm mạc khí phế quản và ghi nhận màu sắc niêm mạc như: xước đỏ, sùi, chảy máu, chít hẹp. Đưa ống soi tới vị trí tổn thương nghi ngờ trên X quang ngực, cố định ống soi. Nối một đầu dây của lọ hút đàm vào đầu nối của ống nội soi, đầu còn lại nối vào dây hút đàm của bình hút áp lực âm một chiều, tiến hành rửa phế quản phế nang, mỗi lần bơm 5-10 ml nước muối sinh lý vô khuẩn, tổng lượng nước muối sinh lý bơm vào cho một lần soi không quá 120 ml, hút sạch dịch rửa. Ngừng thủ thuật khi bệnh nhân có các triệu chứng báo động. Kết thúc cuộc soi và khám lại bệnh nhân ghi nhận những biến chứng cấp tính, bàn giao bệnh lại cho bác sĩ điều trị, ghi tường trình thủ thuật.

Phụ lục 5: Quy trình cấy định lượng đờm và dịch rửa phế quản phế nang tại khoa Vi Sinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định



Chú thích: Bp: bệnh phẩm; dd: dung dịch; DRPQ: dịch rửa phế quản; VK: VK.

Phụ lục 6: Quy trình định danh VK tại khoa vi sinh bệnh viện Nhân Dân Gia Định



Phụ lục 7: Biện luận kết quả kháng sinh đồ theo CLSI 2014

Bảng 1: Biện luận kết quả kháng sinh đồ đối với *Pseudomonas aeruginosa*:

Kháng sinh	Tiêu chuẩn biện luận đường kính vòng vô khuẩn (mm)			Tiêu chuẩn biện luận MIC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)		
	S	I	R	S	I	R
Imipenem	≥ 19	16 - 18	≤ 5	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem	≥ 19	16 - 18	≤ 5	≤ 2	4	≥ 8
Colistin	≥ 11	-	≤ 0	≤ 2	4	≥ 8
Polimyxin B	≥ 12	-	≤ 1	≤ 2	4	≥ 8

Bảng 2. Biện luận kết quả kháng sinh đồ đối với *Acinetobacter spp*:

Kháng sinh	Tiêu chuẩn biện luận đường kính vòng vô khuẩn (mm)			Tiêu chuẩn biện luận MIC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)		
	S	I	R	S	I	R
Imipenem	≥ 16	14 - 5	≤ 1	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≥ 16	14 - 15	≤ 3	≤ 4	8	≥ 16
Colistin				≤ 2	-	≥ 4
Polimyxin B				≤ 2	-	≥ 4

Bảng 3. Biện luận kết quả kháng sinh đồ đối với *Enterobacteriaceae spp*:

Kháng sinh	Tiêu chuẩn biện luận đường kính vòng vô khuẩn (mm)			Tiêu chuẩn biện luận MIC ($\mu\text{g/dl}$)		
	S	I	R	S	I	R
Imipenem	≥ 23	20 - 22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	≥ 23	20 - 22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4

Bảng 4. Biện luận kết quả kháng sinh đồ đối với *Burkholderia cepacia*:

Kháng sinh	Tiêu chuẩn biện luận đường kính vòng vô khuẩn (mm)			Tiêu chuẩn biện luận MIC ($\mu\text{g/dl}$)		
	S	I	R	S	I	R
Meropenem	≥ 20	20-22	≤ 15	≤ 4	8	≥ 16

Bảng 5. Biện luận kết quả kháng sinh đồ đối với *Non-Enterobacteriaceae: Pseudomonas spp*; trực khuẩn Gr (-) khó mọc, không lên men đường.

Kháng sinh	Tiêu chuẩn biện luận đường kính vòng vô khuẩn (mm)			Tiêu chuẩn biện luận MIC ($\mu\text{g/dl}$)		
	S	I	R	S	I	R
Imipenem	-	-	-	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	-	-	-	≤ 4	8	≥ 16
Colistin	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8
Polimyxin B	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8

Phụ lục 8: Phương pháp phát hiện gene kháng thuốc

Dịch ly trích DNA từ chủng VK thuần được dùng làm khuôn mẫu cho kỹ thuật PCR phát hiện các gen kháng thuốc.

Trình tự các đoạn mồi được trình bày tại bảng sau:

Tên mồi	Trình tự (5' – 3')	Chiều dài đoạn mồi (bp)	Chiều dài sản phẩm PCR (bp)
SHV-1545	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	20	790
SHV-1546	GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	20	
TEM-757	GCGGAACCCCTATTTG	16	964
TEM-686	ACCAATGCTTAATCAGTGAG	20	
IMP-2635	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	22	232
IMP-2636	GGTTTAAAYAAAACAACCACC	20	
SPM-2637	AAAATCTGGGTACGCAAACG	20	271
SPM-2638	ACATTATCCGCTGGAACAGG	20	
OXA-2641	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	20	438
OXA-2642	CGAATGCGCAGCACCAG	17	
BIC-2643	TATGCAGCTCCTTTAAGGGC	20	537
BIC-2644	TCATTGGCGGTGCCGTACAC	20	
NDM-2647	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	20	621
NDM-2648	CGGAATGGCTCATCACGATC	20	
KPC-2645	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	20	798
KPC-2646	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	20	

Thiết kế phản ứng PCR phát hiện gene SHV

– Công thức pha mix cho 1 mẫu

Thành phần	Thể tích (µl)
Nước	15
Q5 HS HiFi Master Mix	25
SHV-1545	2,5
SHV-1546	2,5
DNA mạch khuôn	5

– Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR

+ 1 chu kỳ: 98°C 30 giây

+ 40 chu kỳ gồm: 98 °C 10 giây, 60 °C 30 giây, 72 °C 40 giây

+ 1 chu kỳ: 72 °C 5 phút

+ 1 chu kỳ: 4°C giữ cho đến khi dùng.

Thiết kế phản ứng PCR phát hiện gene TEM

– Công thức pha mix cho 1 mẫu

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước	15
Q5 HS HiFi Master Mix	25
TEM-757	2,5
TEM-686	2,5
DNA mạch khuôn	5

– Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR

+ 1 chu kỳ: 98°C 30 giây

+ 40 chu kỳ gồm: 98 °C 10 giây, 58 °C 30 giây, 72 °C 30 giây

+ 1 chu kỳ: 72 °C 5 phút

+ 1 chu kỳ: 4°C giữ cho đến khi dùng.

Thiết kế phản ứng multiplex PCR phát hiện gene IMP, SPM và OXA

– Công thức pha mix cho 1 mẫu

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước	5
Phusion U Multiplex Master Mix	25
IMP-2635	2,5
IMP-2636	2,5
SPM-2637	2,5
SPM-2638	2,5
OXA-2641	2,5
OXA-2642	2,5
DNA mạch khuôn	5

– Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR

+ 1 chu kỳ: 98°C 30 giây

+ 40 chu kỳ gồm: 98 °C 10 giây, 55 °C 30 giây, 72 °C 30 giây

+ 1 chu kỳ: 72 °C 5 phút

+ 1 chu kỳ: 4°C giữ cho đến khi dùng.

Thiết kế phản ứng multiplex PCR phát hiện gene BIC, NDM và KPC

– Công thức pha mix cho 1 mẫu

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước	5
Phusion U Multiplex Master Mix	25
BIC-2643	2,5
BIC-2644	2,5
NDM-2647	2,5
NDM-2648	2,5
KPC-2645	2,5
KPC-2646	2,5
DNA mạch khuôn	5

– Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR

+ 1 chu kỳ: 98°C 30 giây

+ 40 chu kỳ gồm: 98 °C 10 giây, 60 °C 30 giây, 72 °C 40 giây

+ 1 chu kỳ: 72 °C 5 phút

+ 1 chu kỳ: 4°C giữ cho đến khi dùng.

Phát hiện sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên thạch agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 0,5X.

Cài đặt dòng điện: 150V – 400mA, thời gian chạy: 30 – 40 phút

Nhuộm thạch bằng GelRed và chụp ảnh với hệ thống KETA M (hãng Wealtec)

Các sản phẩm PCR lên đúng kích thước được cắt băng, tinh sạch gel và giải trình tự. Trình tự thu nhận được sẽ đối chiếu với ngân hàng gene.

Số liệu được cập nhật và quản lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

Đối chiếu trình tự trên ngân hàng gene bằng phần mềm blast search.

Phụ lục 9: Phác đồ điều trị VPTM tại bệnh viện Nhân dân Gia Định

I. PHẠM VI ÁP DỤNG PHÁC ĐỒ: khoa bệnh nặng có thở máy

II. ĐẠI CƯƠNG:

VP thở máy là viêm nhu mô phổi xảy ra sau 48h trên bệnh nhân thở máy qua NKQ hoặc KKQ.

Là nguyên nhân hàng đầu gây tăng tỉ lệ tử vong tại các khoa bệnh nặng có thở máy đặc biệt là khoa ICU[1] .

III. DỊCH TỄ :

Tỉ lệ VPTM tại ICU BV NDGD 30% (2011) [2]

Tỉ lệ VPTM tại ICU BVCR 27% (2001) [3] , 32% (2005) [4] , 20% (2010) [5]

IV. TÁC NHÂN GÂY BỆNH:

a. Vi khuẩn: *Acinetobacter baumannii* (69,3%); *Klebsiella* spp (11,5%); *Enterobacter* spp (11,5%); *Pseudomonas aeruginosa* (7,7%); *E.coli* [1] ; *Staphylococcus aureus*.

b. Vi nấm:

V. CHẨN ĐOÁN: dựa vào dấu hiệu nhiễm khuẩn toàn thân, thâm nhiễm mới hoặc nặng lên trên phim XQ phổi và bằng chứng vi sinh học của viêm nhu mô phổi

1. Tiêu chuẩn lâm sàng: Thâm nhiễm mới, lan tỏa hoặc tiến triển trên X quang ngực kèm ≥ 2 tiêu chuẩn:

- $T_0 \geq 38,5$ oC, hoặc $\leq 36,5$ oC.
- Tăng tiết đàm hoặc đàm đổi màu.
- Tăng tiêu thụ oxy.
- BC máu $\geq 12000/mm^3$ hay $\leq 4000/mm^3$.
- CRP và/hay PCT tăng cao

2. Bằng chứng vi sinh: dịch tiết phế quản đường hô hấp dưới

- Soi, nhuộm gram (≤ 30 phút)
- Hút đàm bằng lọ vô khuẩn: 10⁶ cfu/ml
- BAL: 10⁴ cfu/ml
- MIC nếu cần

3. Chẩn đoán phân biệt:

- Phù phổi cấp
- Tràn dịch màng phổi
- K phổi
- Nhồi máu phổi

VI. PHÁC ĐỒ ĐIỀU TRỊ:

A. Nguyên tắc điều trị:

- a. Soi-nhuộm gram-cấy đàm trước khi sử dụng kháng sinh
- b. Sử dụng kháng sinh sớm, áp dụng liệu pháp xuống thang
- c. Phối hợp kháng sinh

B. Điều trị triệu chứng: hạ sốt, long đàm, VLTL, bù đủ dịch

C. Điều trị nguyên nhân: phải lấy đàm trước khi dùng kháng sinh. Tùy thuộc tác nhân gây bệnh của từng khoa ICU, từng cơ địa bệnh nhân.

- Dựa vào kết quả nhuộm gram mà lựa chọn kháng sinh ban đầu. Áp dụng liệu pháp xuống thang.

a. Trục khuẩn gram âm: hướng nhiều tới tác nhân: *Klebsiella* spp; *Enterobacter* spp; *E.coli*; *Pseudomonas aeruginosa*.

- Kháng sinh chủ lực khởi đầu: có thể chọn một trong các kháng sinh sau:

o Nhóm Carbapenem

- Imipenem 0,5g, TTM trong 2 giờ, X 4 lần/ngày; có thể tăng lên 1g, TTM trong 3h X 3 lần/ngày (tối đa 50mg/kg/ngày)

- Meropenem 1g, TTM trong 3 giờ, X 3 lần/ngày (tối đa 6g/ngày)

- o Piperacillin/Tazobactam 4,5g, TTM trong 30 phút, X 3 lần/ngày (tối đa 4 lần/ngày)

- Kết hợp với:

o Nhóm aminoglycosis:

- Amikacin 0,5-0,75g, TTM trong 30 phút, X 1 lần/ngày (tối đa 15mg/kg/ngày)

- Neltimycin 2-3 mg/kg X lần/ngày

b. Cầu trục khuẩn gram âm: (gram-negative coccobacilli) khả năng nhiễm *Acinetobacter* spp

– Phối hợp kháng sinh như sau:

o Imipenem (Tienam) 1g truyền TM trong 3h X 3 lần/ngày (tăng lên tối đa 50mg/kg/ngày hoặc 4g/ngày) hoặc:

o Meropenem (Meronem) 1g truyền TM trong 3 giờ X 3 lần/ngày (tăng lên tối đa 6g/ngày)

KẾT HỢP với

o Colistin 2-3 MU truyền TM trong 30 phút X 3 lần/ngày hoặc

o Amikacin 0,5-0,75g, TTM trong 30 phút, X 1 lần/ngày (tối đa 15mg/kg/ngày), hoặc

o Neltimycin 2-3 mg/kg X 2 lần/ngày

c. Gram dương: nghĩ nhiều đến *Staphylococcus aureus*

– Vancomycin 1 g truyền TM trong 60 phút X 2 lần/ngày

• Khi có kết quả kháng sinh đồ: tùy thuộc vào đáp ứng lâm sàng của bệnh nhân, CTM, CRP, PCT, và X quang phổi

a. Áp dụng liệu pháp xuống thang: chọn lựa một trong các kháng sinh nhóm dưới, có thể đơn trị liệu; ngưng kháng sinh sau 5-7 ngày

b. Nếu kết quả kháng sinh đồ chỉ nhạy với kháng sinh đang dùng: Duy trì với kháng sinh đó từ 7-10 ngày

c. Nếu kết quả kháng sinh đồ là PDR (kháng tất cả kháng sinh): sử dụng phác đồ kháng sinh kết hợp với gợi ý bên dưới, thời gian kéo dài 14 ngày

• Colistin + Imipenem/ Meropenem TTM kéo dài

• Colistin + Sulbactam liều cao (6g/ngày)

• Colistin + Imipenem/ Meropenem + Sulbactam

• Colistin + Imipenem/ Meropenem + Rifampin.

d. Nếu tác nhân là Tụ cầu kháng vancomycin, *Enterococci* kháng vancomycin (VRS/ VRE):

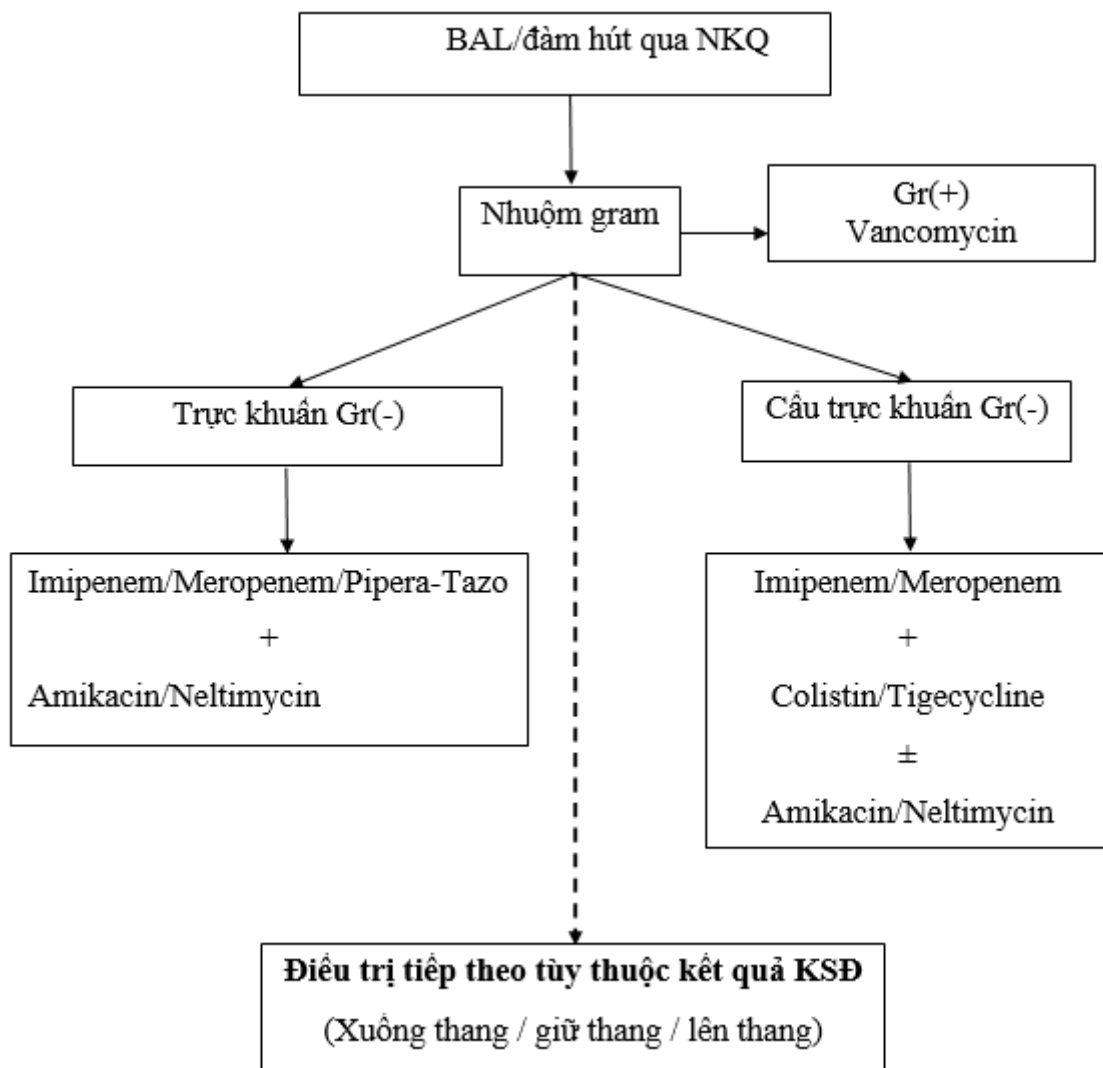
- Linezolid (600mg X 2 lần/ ngày)

D. Theo dõi bệnh nhân:

– Lâm sàng: các dấu hiệu nhiễm khuẩn toàn thân: To, M, HA. Theo dõi bệnh nhân thở máy: SPO₂, mức độ tiêu thụ oxy, PEEP, xoay trở chống loét, VLTL, phòng ngừa thuyên tắc phổi

– Cận lâm sàng: CTM, CRP, PCT, KMĐM, X quang ngực, hoặc CT ngực

VII. LƯU ĐỒ XỬ TRÍ KS BAN ĐẦU:



VIII. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ ĐÁP ỨNG ĐIỀU TRỊ:

– Lâm sàng: cải thiện các dấu hiệu nhiễm khuẩn toàn thân: giảm sốt, mạch không tăng, giảm mức độ tiêu thụ oxy, PEEP giảm, giảm hoặc không lệ thuộc máy thở

– Cận lâm sàng: bạch cầu máu, CRP và hoặc PCT giảm dần về trị số bình thường, cải thiện hình ảnh thâm nhiễm trên X quang ngực thẳng

IX. TIÊN LƯỢNG: VPTM là nhiễm trùng bệnh viện, có tiên lượng xấu.

X. PHÒNG NGỪA:

1. Cách ly: mỗi bệnh nhân có một phòng riêng, dụng cụ sử dụng riêng
2. Rửa tay: trước khi tiếp xúc bệnh nhân, trước khi rời khỏi giường bệnh
3. Nâng đầu giường bệnh: 30-45 độ
4. Hút đàm kín
5. Vệ sinh răng miệng (2-4h)
6. Dùng kháng sinh “trúng đích”, đủ liều, đúng thời gian

(Ghi chú: tất cả liều kháng sinh nêu trên áp dụng cho người có chức năng thận bình thường, cần giảm liều kháng sinh tương ứng với chức năng lọc cầu thận)

Phụ lục 10: Mối tương quan giữa định danh vi khuẩn theo kinh điển và giải trình tự gen 16S-rRNA (n = 76)

Kết quả cấy	Kết quả PGM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Aureimonas glaciistagni</i>
	<i>Burkholderia spp</i>
	<i>Corynebacterium striatum</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Enterococcus spp</i>
	<i>Erwinia psidii</i>
	<i>Gallibacterium anatis</i>
	<i>Gemella spp</i>
	<i>Granulicatella adiacens</i>
	<i>Granulicatella adiacens</i>
	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella singaporensis</i>
	<i>Lactobacillus spp</i>
	<i>Macrococcus caseolyticus</i>
	<i>Neisseria spp</i>
	<i>Neisseria subflava</i>
	<i>Pasteurella spp</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Shewanella profunda</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Shigella dysenteriae</i>
	<i>Spphingomonas echinoides</i>
	<i>Staphylococcus spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	<i>Streptococcus sinensis</i>
	<i>Streptococcus spp</i>
	<i>Vagococcus entomophilus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Aeromonas spp</i>
	<i>Burkholderia spp</i>
	<i>Corynebacterium spp</i>
	<i>Corynebacterium striatum</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Enterobacter mori</i>
	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Kosakonia spp</i>
	<i>Neisseria elongata</i>
	<i>Neisseria sicca</i>
	<i>Prevotella histicola</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Prevotella nanceiensis</i>
	<i>Prevotella ruminicola</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Rothia mucilaginosa</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus spp.</i>
	<i>Streptococcus spp.</i>
	<i>Veillonella denticariosi</i>
	<i>Veillonella parvula</i>
	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Alloprevotella rava</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
	<i>Granulicatella adiacens</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Neisseria elongata</i>
	<i>Neisseria spp</i>
	<i>Neisseria subflava</i>
	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>
	<i>Porphyromonas pasteri</i>
	<i>Prevotella buccae</i>
	<i>Prevotella histicola</i>
	<i>Prevotella jejuni</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Prevotella oris</i>
	<i>Prevotella pallens</i>
	<i>Prevotella saccharolytica</i>
	<i>Prevotella veroralis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus constellatus</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Streptococcus spp</i>
	<i>Veillonella spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Corynebacterium spp</i>
	<i>Enterococcus spp</i>
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
	<i>Escherichia spp</i>
	<i>Gemella spp</i>
	<i>Haemophilus spp</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>
	<i>Klebsiella spp</i>
	<i>Lactobacillus spp</i>
	<i>Nocardia spp</i>
	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
	<i>Prevotella spp</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Shigella spp</i>
	<i>Spphingomonas spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Stenotrophomonas spp</i>
	<i>Streptococcus spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Actionobacillus lignieresii</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Aeromonas spp</i>
	<i>Aeromonas taiwanensis</i>
	<i>Alloprevotella rava</i>
	<i>Corynebacterium striatum</i>
	<i>Enterococcus spp</i>
	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	<i>Haemophilus spp</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Morococcus cerebrocus</i>
	<i>Neisseria subflava</i>
	<i>Prevotella baroniae</i>
	<i>Prevotella buccae</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Prevotella nanceiensis</i>
	<i>Prevotella spp</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Alloprevotella rava</i>
	<i>Burkholderia spp</i>
	<i>Catonella morbi</i>
	<i>Diaphorobacter spp</i>
	<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Neisseria spp</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Serratia liquefaciens</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Veillonella spp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
	<i>Chryseobacterium spp</i>
	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Neisseria subflava</i>
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Vagococcus entomophilus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Prevotella salivae</i>
	<i>Prevotella spp</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Spphingopyxis spp</i>
	<i>Spphigomonas spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus spp</i>
	<i>Streptococcus spp</i>
	<i>Veillonella spp</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus coagulans</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Calothrix desertica</i> <i>Neisseria spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Rhodospirillum oryzae</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Calothrix desertica</i> <i>Neisseria spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Rhodospirillum oryzae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Alloprevotella rava</i> <i>Gallibacterium anatis</i> <i>Haemophilus spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Psychrobacter spp</i> <i>Solimonas spp</i> <i>Stenotrophomonas spp</i> <i>Streptococcus spp</i>
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Fusobacterium gonidiaformans</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pophyromonas endodontalis</i> <i>Prevotella falâm sàngeni</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Prevotella histicola</i>
	<i>Prevotella nanceiensis</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Spphingopyxis spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Burkholderia spp</i>
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella variicola</i>
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Stenotrophomonas spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Heamophilus spp</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella variicola</i>
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
	<i>Prevotella spp</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Enterococcus spp</i>
	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>
	<i>Vagococcus entomophilus</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Prevotella jejuni</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Lactobacillus spp</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Gallibacterium anatis</i>
	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	<i>Haemophilus spp</i>
	<i>Porphyromonas pasteri</i>
	<i>Staphylococcus spp</i>
	<i>Streptococcus spp</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Burkholderia spp</i>
	<i>Novosphingobium spp.</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Sinobaca qinghaiensis</i>
	<i>spphingopyxis spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter spp</i>
	<i>Prevotella nanceiensis</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Pseudomonas spp</i> <i>Veillonella spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Chryseobacterium spp</i> <i>Neisseria subflava</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Lactobacillus spp</i> <i>Prevotella jejuni</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Burkholderia spp</i> <i>Haemophilus aegyptius</i> <i>Haemophilus spp</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Haemophilus aegyptius</i> <i>Haemophilus spp</i>
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Prevotella spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Veillonella spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Haemophilus spp</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>paraphrohaemolyticus</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Tannerella forsythia</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Atopobium rimae</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Haemophilus aegyptius</i> <i>Porphyromonas pasteri</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Clostridium algoriphilum</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>Veillonella spp</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Chryseobacterium spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacteroides pyogenes</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella spp</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Prevotella nanceiensis</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Prevotella loescheii</i> <i>Prevotella nanceiensis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Corynebacterium striatum</i> <i>Veillonella spp</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Veillonella spp</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Burkholderia spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Staphylococcus spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Burkholderia spp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Diaphorobacter spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>prevotella maculosa</i>
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Prevotella baroniae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Burkholderia spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Alloprevotella rava</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Corynebacterium spp</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Burkholderia spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Elizabethkingia spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Burkholderia spp</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter spp</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Burkholderia spp</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus spp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter spp</i>
Negative	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Corynebacterium striatum</i> <i>Pseudomonas spp</i>
Negative	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Cylindrosppermum alatospporum</i>
Negative	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Prevotella paludivivens</i>
Negative	<i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Pseudomonas spp</i>
Negative	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

Kết quả cấy	Kết quả PGM
Negative	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Burkholderia spp</i>
Negative	<i>Burkholderia spp</i>
Negative	<i>Corynebacterium striatum</i>

Phụ lục 12. Liệt kê và định nghĩa các biến số:

BIẾN SỐ NỀN				
Tên biến	Loại biến	Số giá trị	Nội dung	Cách đo
<i>Giới tính</i>	Biến nhị giá	2 1.nam 0.nữ	1.Nam 0.Nữ	Ghi nhận từ hồ sơ
<i>Tuổi</i>	Biến định lượng	92	Từ 18 đến 110	Tuổi = 2014- năm sinh của bệnh nhân
<i>Lý do chính nhập viện</i>	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.Khó thở 2.Hôn mê 3.NTNT 4.Đau ngực 5.Sốt 6.Khác	Ghi nhận lý do nhập viện từ hồ sơ
<i>Bệnh nền</i>	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.THA 2.COPD 3.Di chứng TBMMN 4.ĐTĐ2 5.Lao phổi cũ 6.Suy thận mạn 7.K giai đoạn cuối	Ghi nhận phần tiền căn bệnh

			8.Khác	
Thang điểm Apache-II	Biến định lượng	72	Từ 0 đến 71	- Tính trực tiếp từ clincalc thông qua: tuổi, và 15 yếu tố khác
BIẾN SỐ ĐỘC LẬP				
Tên biến	Loại biến	Số giá trị	Nội dung	Cách đo
Sử dụng thuốc an thần dẫn cơ	Biến nhị giá	2	1: Có 0: không	- Có: ít nhất một lần sử dụng sau đặt NKQ và suốt thời gian thở máy - Không: không ghi nhận
Cách dùng	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.Liên tục 2.Ngắt quãng	- Liên tục: khi dùng bơm tiêm tự động kéo dài hơn 6 giờ - Ngắt quãng: tiêm tĩnh mạch từng ống một
Loại dùng	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.Midazolam 2.Seduxen 3.Fentanyl 4.Norcuron 5.Propofol 6.Suxamethonium	- Có: có sử dụng một hay nhiều loại - Không: không sử dụng loại thuốc đó

			7.Khác	
Dùng thuốc dạ dày	Biến nhị giá	2	1: Có 0: Không	- Có: khi có sử dụng cả đường miệng và tĩnh mạch - Không: không có sử dụng
Loại dùng	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.Ức chế bơm proton 2.Ức chế H2 3.Kháng axít 4.Sucralfate	- Có: khi có sử dụng một hay nhiều loại - Không: không có sử dụng
Đặt lại NKQ	Biến nhị giá	2	1: có 0: không	- Có: khi có đặt lại NKQ do: tắc, gập, tuột, xì, bệnh nhân tự rút - Không: khi không đặt lại NKQ
Số lần	Biến thứ tự	4	Nhỏ nhất là 1 Lớn nhất là 4	
Ngày xuất hiện VPTM	Biến định lượng	87	Từ 3 đến 90	Ngày xác định VPTM trên LÂM SÀNG
Kháng sinh đang dùng	Biến nhị giá	2 1: có	1.Cefo/Sul 2.Levofloxacin	- Có: khi có sử dụng một hay

		0: không	3.Imipenem 4.Ciprofloxacin 5.Moxifloxacin 6.Cepha 3 7.Meropenem 8.Aminoglycosid 9.Ticar/Clavu 10.Cefa 4 11.Colistin 12.Vancomycin 13. Am/Sul	nhiều loại kháng sinh - Không: không có sử dụng
Số ngày dùng kháng sinh	Định lượng	90	Từ 1-90	Tổng số ngày dùng kháng sinh nội viện
Biến chứng NSPQ	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.Chảy máu 2.Tràn khí dưới da 3.Tràn khí trung thất 4.Khác	- Có: khi có xảy ra một hay nhiều biến chứng - Không: không ghi nhận biến chứng nào
BIẾN SỐ PHỤ THUỘC				
Kết quả cấy đàm định lượng	Biến nhị giá	2 1: dương 0: âm	1. $\geq 10^4$ đơn vị tạo khuẩn lạc/ml 2. $< 10^4$ đơn vị tạo khuẩn lạc/ml	- Dương: $\geq 10^4$ đơn vị tạo khuẩn lạc/ml - Âm: $< 10^4$ đơn vị

				tạo khuẩn lạc/ml
<i>Định danh VK theo kinh điển</i>	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1. <i>Acinetobacter</i> 2. <i>Klebsiella</i> 3. <i>Enterobacter</i> 4. <i>Pseudomonas</i> 5. <i>E.Coli</i> 6. <i>Staphylococcus</i> 5.Khác	Kết quả định danh VK từ phòng vi sinh
<i>Kháng sinh đồ bằng đĩa khuếch tán</i>	Biến nhị giá	2 1: nhạy 0: kháng	1.Amikacin 2.Ampi/Sul 3.Cefepim 4.Cefoperazone 5.Cefo/Sul 6.Ceftazidim 7.Ceftriaxon 8.Ciprofloxacin 9.Colistin 10.Ertapenem 11.Gentamycin 12.Imipenem 13.Levofloxacin 14.Meropenem 15.Moxifloxacin 16.Nelitimycin 17.Piper/Tazo	- Nhạy: kết quả kháng sinh đồ cho biết nhạy với một hay nhiều loại kháng sinh - Kháng: kết quả kháng sinh đồ kháng với một hay nhiều loại kháng sinh

			18.Ticar/Clavu	
Kháng sinh đồ định lượng MIC	Biến định lượng	256	µg/ml	Điểm cắt của vòng vô khuẩn khi tiếp giáp với que ETEST
Giải trình tự 16S-rRNA thế hệ mới	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1. <i>Acinetobacter</i> 2. <i>Klebsiella</i> 3. <i>Enterobacter</i> 4. <i>Pseudomonas</i> 5. <i>E.Coli</i> 6. <i>Staphylococcus aureus</i> 5.Khác:	Kết quả giải trình tự đối chiếu trên NCBI
Gen đột biến	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.TEM 2.KPC 3.NDM1 4.SPM 5.SHV 6. IMP 7. OXA 8. BIC 6.khác:	Kết quả giải trình tự đối chiếu trên NCBI
Kết quả điều trị	Biến nhị giá	2 1: có 0: không	1.Thành công 2.Thất bại	- Thành công: hết sốt, ↓ tiết đàm, BC máu bình thường, x. quang ngực

				không còn thâm nhiễm - Thất bại: các dấu hiệu nhiễm khuẩn vẫn còn sau đợt điều trị kháng sinh
--	--	--	--	--

Ghi chú: ampi/sul: ampicillin – sulbactam; cefo/sul: cefoperazone – sulbactam; cefaIII: cephalosporin thế hệ 3; cefa IV: cephalosporin thế hệ 4; piper/tazo: piperacillin – tazobactam; ticar/claavu: ticarcillin – clavulanic acid.

Phụ lục 13: Danh sách bệnh nhân tham gia nghiên cứu

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
1	Võ Thị	N	1935	46890/2014
2	Trần Quang	K	1942	51448/2014
3	Nguyễn Văn	L	1953	53212/2014
4	Hà Hữu	N	1926	52520/2014
5	Đình Công	T	1968	53436/2014
6	Nguyễn Huy	L	1931	54730/2014
7	Lê Văn	D	1959	54332/2014
8	Vũ Tuấn	L	1938	53324/2014
9	Nguyễn Thị	C	1926	55324/2014
10	Trần	T	1934	54186/2014
11	La Thị Ngọc	H	1948	54165/2014
12	Nguyễn Thị	T	1924	54024/2014
13	Lữ Vinh	T	1965	54197/2014
14	Trần Thị	K	1930	54237/2014
15	Lê Bá	C	1946	54191/2014
16	Ngô Tá	T	1944	51149/2014
17	Nguyễn Văn	H	1952	55103/2014
18	Võ Bá	T	1944	49749/2014
19	Hoàng Kim	K	1944	55921/2014
20	Lê Thị	M	1944	56824/2014
21	Võ Thị	N	1935	46890/2014
22	Nguyễn Dương	N	1939	56924/2014
23	Huỳnh	H	1930	57231/2014
24	Nguyễn Văn	Đ	1946	56052/2014

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
25	Nguyễn Tấn	T	1976	57042/2014
26	Ngô Kim	N	1930	56670/2014
27	Trần Thị Thu	H	1934	57729/2014
28	Nguyễn Thị	R	1936	55594/2014
29	Trần Thị	K	1932	58246/2014
30	Nguyễn Hồng	C	1985	58571/2014
31	Đinh Thị	D	1940	57872/2014
32	Nguyễn Kim	T	1922	56284//2014
33	Trần Thị	H	1948	58516/2014
34	Nguyễn Thanh	P	1999	58785/2014
35	Huỳnh Văn	M	1939	56010/2014
36	Đinh Thị Thu	V	1970	55591/2014
37	Hạ	L	1928	58217/2014
38	Đặng Thị Thu	T	1937	58266/2014
39	Phạm Thị	R	1932	59823/2014
40	Đặng Văn	P	1944	59784/2014
41	Phạm Văn	T	1982	60449/2014
42	Phạm Thị	H	1955	60254/2014
43	Nguyễn Dương	N	1936	56924/2014
44	Võ Bá	T	1944	49749/2014
45	Nguyễn Thị	B	1926	60026/2014
46	Lê Hữu	P	1927	59369/2014
47	Trương Kim	H	1951	59311/2014
48	Nguyễn Văn	M	1992	60783/2014
49	Lê Văn	T	1948	61415/2014
50	Nguyễn Hữu	H	1924	60882/2014
51	Nguyễn Văn	P	1929	60977/2014

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
52	Phạm Thị Kim	C	1942	61720/2014
53	Trần Thị	L	1954	61850/2014
54	Phùng Thị	B	1927	61626/2014
55	Phạm Văn	T	1982	60449/2014
56	Nguyễn Thị Thu	D	1937	61961/2014
57	Huỳnh Thị	T	1937	61931/2014
58	Nguyễn Xuân	L	1966	62201/2014
59	Cao Thị	T	1927	62599/2014
60	Huỳnh Văn	L	1929	61701/2014
61	Nguyễn Thị Thu	D	1937	61961/2014
62	Nguyễn Thị	M	1941	63361/2014
63	Nguyễn Thị	H	1921	63181/2014
64	Nguyễn Tấn	L	1955	62277/2014
65	Dương Đình	Q	1958	63861/2014
66	Nguyễn Ngọc	T	1930	63870/2014
67	Lâm Kỳ	A	1959	63331/2014
68	Trần Thị	T	1937	64219/2014
69	Nguyễn Thị	T	1928	63763/2014
70	Dư Lộc	T	1939	64188/2014
71	Lê Thị Mỹ	L	1971	64558/2014
72	Nguyễn Thị	N	1928	63797/2014
73	Nguyễn Thị Xuân	M	1941	106/2015
74	Nguyễn Thị	M	1955	479/2015
75	Nguyễn Thị	T	1928	63763/2014
76	Trần Thị	L	1921	65162/2014
77	Nguyễn Thị	Y	1954	1447/2015
78	Vũ Văn	K	1933	143/2015

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
79	Trần Quang	D	1924	62395/2014
80	Lê Kỳ	T	1951	2224/2015
81	Đỗ Văn	T	1951	65068/2014
82	Nguyễn Thị	L	1933	1215/2015
83	Nguyễn Thế	K	1967	65015/2014
84	Nguyễn Văn	Q	1960	1471/2015
85	Nguyễn Đức	C	1957	872/2015
86	Đặng Ngọc	A	1949	1063/2015
87	Phạm Thị	H	1930	2692/2015
88	Võ Thị	B	1931	2272/2015
89	Võ Thị	H	1961	1069/2015
90	Nguyễn Thị	L	1931	1067/2015
91	Nguyễn Thị	L	1933	7215/2015
92	Nguyễn	D	1935	2322/2015
93	Đặng Ngọc	A	1949	1063/2015
94	Trần Thị	M	1921	2012/2015
95	Trần Hữu	B	1941	3854/2015
96	Trần Văn	H	1988	3849/2015
97	Nguyễn văn	P	1963	3915/2015
98	Trần Thị	L	1926	4803/2015
99	Đặng Thị Thu	T	1937	58266/2014
100	Dương Văn	H	1972	5007/2015
101	Đào Thanh	B	1967	4789/2015
102	Phạm Thị	A	1969	4639/2015
103	Nguyễn Thế	T	1955	3720/2015
104	Trần Ngọc	H	1932	4621/2015
105	Nguyễn Anh	T	1961	5628/2015

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
106	Thái Thị	B	1948	4851/2015
107	Đình	K	1935	5487/2015
108	Tăng Thị	N	1934	5857/2015
109	Phan Văn	S	1949	5171/2015
110	Trương Thị	H	1937	5822/2015
111	Nguyễn Hoa	N	1930	7464/2015
112	Nguyễn Thị	Đ	1925	2309/2015
113	Phạm Thị Hồng	H	1957	7223/2015
114	Lưu Thị Kim	L	1950	7287/2015
115	Đỗ Thị	S	1934	2259/2015
116	Trần Thị	H	1937	7580/2015
117	Bùi Văn	K	1944	7235/2015
118	Nguyễn Minh	T	1965	7887/2015
119	Lê Thị	P	1960	7955/2015
120	Lê Văn	T	1930	7912/2015
121	Nguyễn Văn	H	1952	8695/2015
122	Đặng	L	1931	8302/2015
123	Châu Thị	L	1928	6054/2015
124	Nguyễn Thị	Đ	1933	7834/2015
125	Trần Thị	L	1938	7783/2015
126	Mai Thị	N	1932	7721/2015
127	Trần Thị	L	1953	9968/2015
128	Vương	K	1933	8314/2015
129	Đặng	L	1931	8302/2015
130	Lương Thị thanh	V	1940	12005/2015
131	Huỳnh Thế	M	1947	10662/2015
132	Nguyễn Thị	H	1964	10100/2015

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
133	Nguyễn Văn	B	1913	12608/2015
134	Võ Văn	T	1958	12422/2015
135	Nguyễn Quang	A	1940	9087/2015
136	Trần Thị	P	1984	10923/2015
137	Võ Thị	B	1931	8339/2015
138	Dương	H	1934	12614/2015
139	Lương Thị Thanh	V	1940	12005/2015
140	Đinh Thị Thu	V	1970	55591/2014
141	Nguyễn Quang	H	1929	12206/2015
142	Phạm Anh	D	1951	13011/2015
143	Nguyễn Thị	T	1935	14907/2015
144	Nguyễn Lê	H	1960	14569/2015
145	Trần Ngọc	X	1924	15319/2015
146	Lê Thị	B	1920	8092/2015
147	Cao	X	1937	15351/2015
148	Đinh Văn	R	1953	8062/2015
149	Đinh	P	1948	17137/2015
150	Hoàng Văn	T	1937	17964/2015
151	Mai Văn	T	1948	17572/2015
152	Phạm Thanh Hoàng	Đ	1997	17695/2015
153	Ngô Thị	D	1926	17791/2015
154	Đinh Văn	R	1953	8062/2015
155	Mai Thị	N	1932	7721/2015
156	Trần Thị	C	1930	15220/2015
157	Phạm Thị	H	1946	18671/2015
158	Lê Thị	T	1948	15542/2015
159	Nguyễn Văn	L	1944	20472/2015

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
160	Nguyễn Văn	L	1942	19414/2015
161	Nguyễn Văn	H	1959	21319/2015
162	Thạch Thị	M	1954	20639/2015
163	Đoàn Thị	T	1920	19363/2015
164	Võ Thị	B	1932	17130/2015
165	Phan Việt	H	1949	21025/2015
166	Lữ Văn	A	1967	24636/2015
167	Huỳnh Thị	N	1932	22964/2015
168	Bùi Văn	T	1955	24393/2015
169	Lý Đức	Đ	1945	25416/2015
170	Nguyễn thị	P	1933	23895/2015
171	Trần Thị Tuyết	N	1945	27337/2015
172	Mai Thị	P	1942	27679/2015
173	Trần Văn	L	1932	22152/2015
174	Nguyễn thị	C	1930	26529/2015
175	Trần Văn	C	1922	26416/2015
176	Trần thị	N	1932	23894/2015
177	Lê Thị	T	1925	27513/2015
178	Võ Thành	L	1995	27645/2015
179	Nguyễn văn	B	1961	24536/2015
180	Nguyễn thị Nguyệt	T	1956	17812/2015
181	Trần Văn	H	1984	27954/2015
182	Nguyễn thị	T	1937	27972/2015
183	Nguyễn Thị	C	1939	26667/2015
184	Phạm Văn	T	1950	28567/2015
185	Hoàng Thị	C	1922	29291/2015
186	Nguyễn Văn	Q	1963	29764/2015

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
187	Phạm Thị	Q	1943	304481/2015
188	Nguyễn Thị	O	1940	27810/2015
189	Đặng Thanh	V	1953	28061/2015
190	Nguyễn Văn	N	1933	29999/2015
191	Tôn Thị	N	1929	30006/2015
192	Nguyễn Thị	C	1932	28340/2015
193	Trần Minh	K	1920	31312/2015
194	Phạm Thị	Q	1943	30448/2015
195	Nguyễn Thị	C	1932	28346/2015
196	Nguyễn Thị	T	1942	30412/2015
197	Phạm Văn	V	1960	33211/2015
198	Cao	T	1957	31370/2015
199	Vũ Tiến	L	1942	27860/2015
200	Nguyễn Thượng	K	1943	35646/2015
201	Tiêu Văn	T	1934	33642/2015
202	Phạm Thị Thu	T	1959	34187/2015
203	Nguyễn Bá	A	1917	33864/2015
204	Lê Văn	C	1945	33841/2015
205	Nguyễn Thị	T	1915	33048/2015
206	Lê	T	1926	33696/2015
207	Trần Văn	C	1955	36083/2015
208	Trần Nguyễn Anh	N	1985	34757/2015
209	Nguyễn Thượng	K	1943	35646/2015
210	Trần Thị	A	1930	34839/2015
211	Nguyễn Thị	H	1930	36292/2015
212	Nguyễn Thị Thúy	N	1968	37689/2015
213	Nguyễn Thị	H	1957	35176/2015

STT	Họ và tên		Năm sinh	Số nhập viện
214	Hà Văn	T	1942	34472/2015
215	Đình Văn	P	1928	37733/2015
216	Trần Quang	M	1982	36991/2015
217	Quách Văn	B	1956	36220/2015
218	Nguyễn Thị	T	1942	30419/2015
219	Phạm Thị Ngọc	A	1957	39648/2015
220	Nguyễn Thị	X	1930	36390/2015

Danh sách này đã được xác nhận bởi Phòng Kế Hoạch Tổng Hợp bệnh viện Nhân Dân Gia Định.

Trưởng Phòng Kế Hoạch Tổng Hợp

BSCK II: Hồ Văn Hàn