

# ĐẶC ĐIỂM KIỂU GEN CỦA CÁC CHỦNG *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ĐA KHÁNG THUỐC Ở BỆNH NHÂN VÀ MÔI TRƯỜNG KHOA HỒI SỨC TÍCH CỰC BỆNH VIỆN BỆNH NHIỆT ĐỚI TRUNG ƯƠNG

Trần Thị Hải Ninh<sup>1</sup>, Nguyễn Quốc Phương<sup>1,2</sup>, Lê Thị Hội<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hoa<sup>3</sup>, Nguyễn Vũ Trung<sup>4</sup>, Nguyễn Văn Kính<sup>1,2</sup>

## TÓM TẮT

Xác định đặc điểm kiểu gen của các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc ở bệnh nhân và môi trường Khoa Hồi sức tích cực là rất cần thiết để áp dụng các biện pháp điều trị phù hợp, đồng thời xác định được nguồn lây truyền của vi khuẩn để kiểm soát nhiễm khuẩn hiệu quả.

**Mục tiêu:** Xác định đặc điểm kiểu gen của các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

**Đối tượng và phương pháp:** Mẫu bệnh phẩm đờm, phân, nước tiểu và mù vết thương (nếu có) thu thập từ bệnh nhân và mẫu bệnh phẩm thu thập từ môi trường khu vực quanh giường bệnh. Nghiên cứu tiền cứu, mô tả cắt ngang, sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) để giải trình tự toàn bộ bộ gen của các chủng *K. pneumoniae*.

**Kết quả:** Từ 832 chủng *K. pneumoniae* thu thập đã xác định được 68 STs của *K. pneumoniae* với sự nổi trội của ST15 (34%) và ST16 (20%). Các gen kháng thuốc gặp phổ biến là blaNDM (54,45%), blaOXA (46,51%), blaKPC (45,07%), blaCTX (51,80%), blaSHV (98,44%), blaTEM (52,16%). Ghi nhận sự xuất hiện thường xuyên của các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc trên bệnh nhân và/hoặc môi trường Khoa Hồi sức tích cực trong toàn bộ thời gian nghiên cứu.

**Kết luận:** Có sự phân bố một số STs đặc trưng riêng của *K. pneumoniae* tại địa điểm nghiên cứu. Số lượng các gen kháng thuốc gặp phổ biến khá nhiều.

**Từ khóa:** *K. pneumoniae* đa kháng thuốc, đặc điểm kiểu gen, giải trình tự gen thế hệ mới.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự xuất hiện và lây lan của các chủng vi khuẩn *K. pneumoniae* đa kháng thuốc đang là mối đe dọa lớn đối với sức khỏe bệnh nhân (BN), đặc biệt những BN nặng ở Khoa Hồi sức tích cực (HSTC). Nhiều nghiên

cứu cho thấy, sự lan truyền của các vi khuẩn đa kháng thuốc ở BN tại các khoa HSTC có liên quan đến môi trường. Điều này đặt ra nhu cầu cấp thiết cần tìm hiểu sâu hơn về đặc điểm kiểu gen của các chủng vi khuẩn này để từ đó áp dụng các biện pháp điều trị phù hợp, đồng thời xác định được nguồn lây truyền của vi khuẩn để kiểm soát nhiễm khuẩn hiệu quả, mang lại kết quả điều trị tốt hơn cho BN và ngăn chặn sự lây lan của các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc. Giải trình tự gen thế hệ mới (Next Genome Sequencing, NGS) là một công nghệ tiên tiến, có thể cung cấp nhiều thông tin bao gồm định danh chính xác vi khuẩn, xác định chính xác đặc điểm kháng kháng sinh, kiểu gen, độc lực và nguồn lây truyền của các vi khuẩn [1]. Vì vậy, nghiên cứu này được triển khai nhằm xác định

1. Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương

2. Trường Đại học Y Hà Nội

3. Bệnh viện Phổi Trung ương

4. Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 16/5/2022

Ngày phản biện xong: 25/5/2022

Ngày duyệt đăng: 15/6/2022

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Trần Thị Hải Ninh, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương

Điện thoại: 0915373732. E-mail: dr.hainhinh@gmail.com.

đặc điểm kiểu gen của các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc ở BN và môi trường tại Khoa Hồi sức tích cực, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Phương pháp:** Nghiên cứu tiền cứu, mô tả cắt ngang.

**Địa điểm, thời gian nghiên cứu:** Khoa HSTC, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương; tháng 7/2017 đến tháng 01/2018. Khoa HSTC của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương cơ sở Giải Phóng có 4 buồng hồi sức với 16 giường: hồi sức 1 (giường 1 đến giường 5), hồi sức 2 (giường 6 đến giường 8), hồi sức 3 (giường 9 đến giường 11), hồi sức 4 (giường 12 đến giường 16).

**Đối tượng nghiên cứu:** Bệnh phẩm đờm, phân, nước tiểu và mủ vết thương (nếu có) thu thập từ BN và mẫu bệnh phẩm thu thập từ môi trường khu vực quanh giường bệnh.

**Cỡ mẫu, cách chọn mẫu:** Chọn mẫu toàn bộ. Tất cả BN nhập Khoa HSTC trong thời gian nghiên cứu, đáp ứng được đủ các tiêu chuẩn chọn vào sẽ được thu tuyển vào nghiên cứu. Tất cả BN  $\geq 18$  tuổi, nhập viện Khoa HSTC trong thời gian từ tháng 7/2017 - 01/2018, được tư vấn tham gia nghiên cứu. Khi BN hoặc người đại diện hợp pháp của BN (trường hợp BN không thể tự đưa ra quyết định) đồng ý tham gia nghiên cứu, BN sẽ được thu thập 4 loại bệnh phẩm gồm đờm, phân, nước tiểu và mủ vết thương (nếu có) tại các thời điểm vào khoa 1 lần/tuần trong quá trình nằm tại khoa và khi ra khỏi khoa. Mẫu môi trường được thu thập 1 tháng/lần trong thời gian nghiên cứu tại các vị trí xung quanh giường bệnh (thành giường, tay nắm cửa buồng bệnh, bề mặt các thiết bị chăm sóc BN như máy thở, máy theo dõi, máy hút đờm,...).

**Nội dung nghiên cứu:** Sự phân bố các Sequence Types (STs) của các chủng *K. pneumoniae* trong nghiên cứu; các gen kháng thuốc; cây phát sinh loài; sự xuất hiện của các chủng *K. pneumoniae* tại Khoa HSTC theo thời gian nghiên cứu.

**Kỹ thuật, công cụ và quy trình thu thập số liệu:** Bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (CHROMagar™ ESBL, CHROMagar™ mSuperCARBA™, CHROMagar™ VRE,

BioMérieux, Marcy L'Étoile CHROMagar, France). Nếu có khuẩn lạc mọc, sẽ được nhuộm gram và định danh tự động trên hệ thống MALDI-TOF MS (Bruker Diagnostics, Bremen, Germany), làm kháng sinh đồ tự động trên hệ thống Vitek 2 COMPACT (Vitek 2, BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) nhằm xác định các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc (kháng với  $\geq 3$  kháng sinh được thử kháng sinh đồ). Các chủng vi khuẩn phân lập được sẽ được tiến hành giải trình tự toàn bộ bộ gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trên hệ thống máy Illumina HiSeq X10 (Illumina Inc., San Diego, USA).

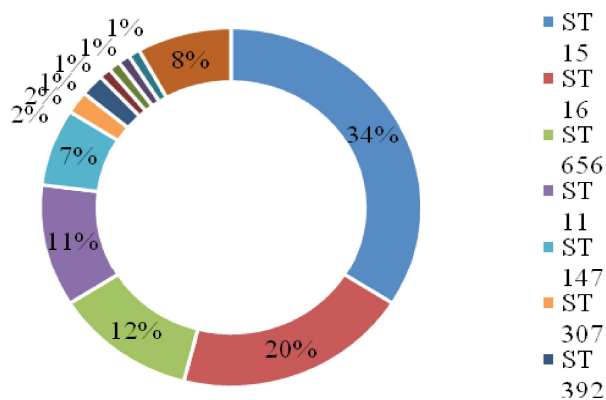
**Xử lý và phân tích số liệu:** Số liệu được thu thập theo bệnh án nghiên cứu được thiết kế sẵn, được phân tích và xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 và STATA với các thuật toán ứng dụng.

**Đạo đức nghiên cứu:** Nghiên cứu được Hội đồng y đức của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương thông qua.

### KẾT QUẢ

832 chủng *K. pneumoniae* phân lập được từ bệnh phẩm thu thập từ 196 BN và 150 mẫu môi trường được chuẩn hóa và đủ tiêu chuẩn để thực hiện giải trình tự gen.

#### Phân bố các Sequence Types (STs) của *K. pneumoniae*



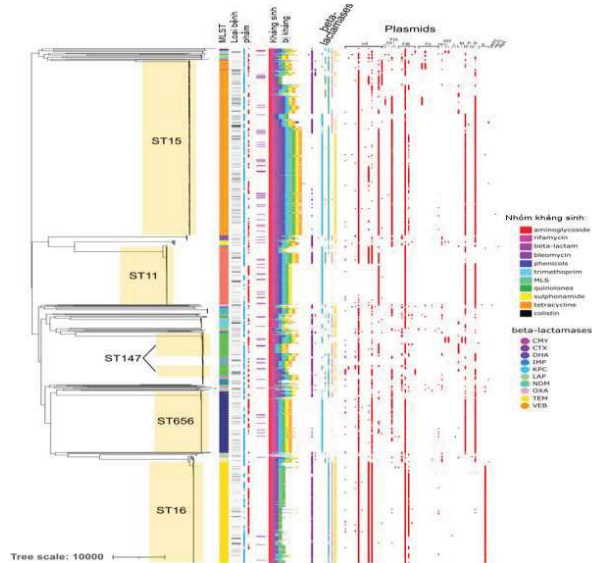
**Biểu đồ 1.** Phân bố các Sequence Types (STs) của *K. pneumoniae* (n = 832)

**Nhận xét:** Ghi nhận 68 STs của *K. pneumoniae* với sự nổi trội của ST15, ST16.

#### Cây phát sinh loài của *K. pneumoniae*

**Biểu đồ 2.** Cây phát sinh loài của *K. pneumoniae* tương ứng với các kháng sinh bị kháng, các beta-lactamase và các loại plasmid (n = 832)

Chú thích cột dữ liệu: Cột đầu tiên bên trái: Dữ



liệu trình tự đa điểm (Multilocus sequence type - MLST); 4 cột tiếp theo: Loại bệnh phẩm (bệnh phẩm của BN và bệnh phẩm môi trường); Cột tiếp theo: Xác nhóm kháng sinh đã bị kháng; Cột tiếp theo: Xác betalactamase; Cột tiếp theo: Các nhóm plasmid.

**Nhận xét:** Cây phát sinh loài cho thấy, đa số các chủng được phát hiện trong nghiên cứu (84%) đều thuộc 5 STs chủ yếu là ST15, ST16, ST656, ST11 và ST147. Việc đề kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng như việc mang các gen beta-lactamase và mang các nhóm plasmid là đặc điểm tương đối đồng nhất của các dòng vi khuẩn (linage) thuộc về cùng một ST.

**Gen kháng thuốc của các chủng vi khuẩn *K. pneumoniae***

**Bảng 1.** Các gen kháng thuốc của chủng vi khuẩn *K. pneumoniae*

Gen kháng thuốc Beta-lactamase	<i>K. pneumoniae</i> (n = 832)	
	n	%
<b>Class C:</b>		
EC	0	0,00
ACT	0	0,00
CMY	1	0,12
DHA	15	1,80

Gen kháng thuốc Beta-lactamase	<i>K. pneumoniae</i> (n = 832)	
	n	%
<b>Class A:</b>		
LAP	90	10,82
CARB	0	0,00
PER	0	0,00
TEM	434	52,16
SHV	819	98,44
VEB	2	0,24
CTX	431	51,80
KPC	375	45,07
<b>Class D:</b>		
OXA	387	46,51
<b>Class B:</b>		
IMP	1	0,12
NDM	453	54,45

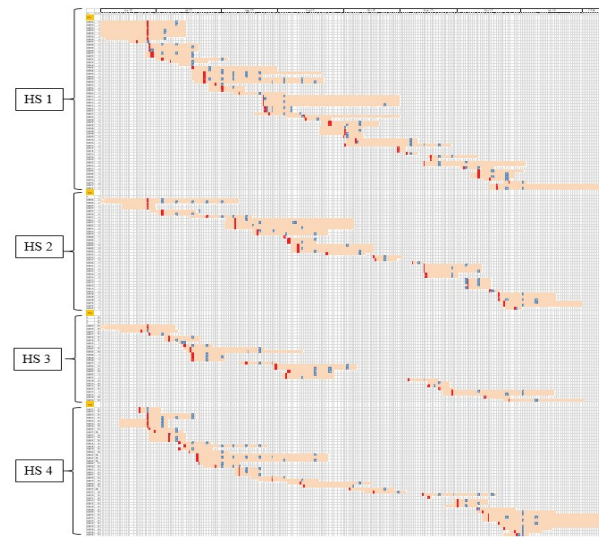
Màu xám: Gen sinh ESBL.

Màu vàng: Gen sinh carbapenemase.

**Nhận xét:** Số lượng các gen kháng thuốc gặp phổ biến khá nhiều, bao gồm *bla*NDM, *bla*OXA, *bla*KPC, *bla*CTX, *bla*SHV, *bla*TEM.

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

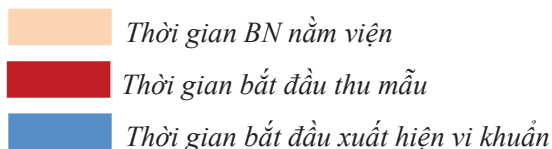
**Biểu đồ 3.** Sự xuất hiện các chủng *K. pneumoniae*



theo thời gian (n = 832)

Trục tung: cột 1: Số phòng hồi sức; cột 2: Mã số BN; cột 3: Số giường.

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



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

## BÀN LUẬN

Sự phân bố các STs của *K. pneumoniae* cho thấy sự nổi trội của một số lineages đặc trưng riêng và phổ biến ở nhiều nơi tại Việt Nam. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận 68 STs của *K. pneumoniae* với sự nổi trội của 5 STs, trong đó hàng đầu là ST15 (34%) và ST16 (30%). Báo cáo năm 2017 về kết quả giải trình tự gen các chủng *K. pneumoniae* tại Bệnh viện Chợ Rẫy cũng ghi nhận, 2 STs phổ biến nhất là ST15 và ST16 [2]. Trong báo cáo này, Tada Tatsuya đã nhận định có thể ST15 và ST16 đã lan tràn rộng rãi ở nhiều cơ sở y tế tại Việt Nam. Việc giải trình tự gen các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc tại nhiều cơ sở y tế giúp đưa ra dữ liệu đánh giá sự lây truyền của những vi khuẩn này ở cấp độ quốc gia, từ đó có chiến lược can thiệp phù hợp, hạn chế sự lây lan của các vi khuẩn này.

Ứng dụng kỹ thuật NGS nhằm xác định các gen kháng thuốc kháng sinh của các loài vi khuẩn đang được triển khai rộng rãi nhằm giúp xác định chính xác cơ chế đề kháng kháng sinh của các vi khuẩn. Đối với các chủng *K. pneumoniae*, số lượng các gen kháng thuốc gặp phổ biến khá nhiều, bao gồm *bla*NDM (54,45%), *bla*OXA (46,51%), *bla*KPC (45,07%), *bla*CTX (51,80%), *bla*SHV (98,44%), *bla*TEM (52,16%). Cơ chế đề KKS của các chủng *K. pneumoniae* bao gồm đề kháng tự nhiên và đề kháng mắc phải. Các chủng vi khuẩn này đều mang gen *bla*SHV trên nhiễm sắc thể và có khả năng đề

kháng tự nhiên với các kháng sinh nhóm penicillin [3]. Đối với các đề kháng mắc phải, thường là do lây truyền qua plasmid từ những *Enterobacteriaceae* khác ở đường ruột [4]. Chính vì vậy, mỗi cơ sở y tế cần có dữ liệu trình tự gen các chủng *K. pneumoniae* tại cơ sở của mình để hiểu rõ về sự lây truyền các gen kháng thuốc thông qua plasmid từ đó đề ra chiến lược sử dụng kháng sinh phù hợp cũng như những giải pháp để hạn chế sự lây truyền các gen này.

Cây phát sinh loài *K. pneumoniae* trong nghiên cứu cho thấy, đa số (84%) các chủng được phát hiện đều thuộc 5 STs chủ yếu là ST15, ST16, ST656, ST11 và ST147. Việc đề kháng với mỗi nhóm kháng sinh cụ thể cũng như việc mang các gen beta-lactamase và mang các nhóm plasmid không tương thích là đặc điểm tương đối đồng nhất của các dòng vi khuẩn (linage) thuộc về cùng một ST. Điều này gợi ý đây là sự lây truyền của các clone chứ không phải là sự đa dạng loài. David S. nghiên cứu về tình hình dịch bệnh do *K. pneumoniae* kháng carbapenem tại các nước châu Âu thu thập hơn 1700 chủng tại 244 bệnh viện thuộc 32 quốc gia cho thấy, 477 trong 682 chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem (69,9%) cũng chỉ thuộc về 4 linage với các STs phổ biến là ST11, ST15, ST101 và ST258/512 [5]. Nghiên cứu cũng đưa ra kết luận, việc thu nhận các gen carbapenemase là nguyên nhân chính dẫn đến vi khuẩn kháng các kháng sinh nhóm carbapenem và có sự lây truyền theo các clone.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy thường xuyên có sự xuất hiện các vi khuẩn *K. pneumoniae* đa kháng thuốc tại BN và/hoặc môi trường Khoa HSTC trong gần như toàn bộ thời gian nghiên cứu. Tuy nhiên, tại buồng hồi sức số 3, có khoảng thời gian tương đối dài (40 ngày) không ghi nhận sự xuất hiện của các chủng vi khuẩn này. Sự xuất hiện gián đoạn của *K. pneumoniae* trong thời gian nghiên cứu cho thấy, có thể một trong các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn thường quy đang được thực hiện tại Khoa HSTC của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương đã có hiệu quả trong việc hạn chế sự xuất hiện và lây lan của các chủng *K. pneumoniae* đa kháng. Vì vậy, cần có các đánh giá sâu hơn về từng vụ dịch cụ thể do vi khuẩn đa kháng thuốc gây ra tại bệnh viện để có thể chỉ ra các biện pháp can thiệp hiệu quả.

## KẾT LUẬN

*K. pneumoniae* có 68 STs với sự nổi trội của ST15 (34%) và ST16 (30%); các gen kháng thuốc gặp phổ biến là blaNDM (54,45%), blaOXA (46,51%), blaKPC (45,07%), blaCTX (51,80%), blaSHV (98,44%), blaTEM (52,16%); thường xuyên có sự xuất hiện các vi khuẩn *K. pneumoniae* đa kháng thuốc trên BN và/hoặc môi trường Khoa HSTC trong toàn bộ thời gian nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Behjati, S., P.S.J.A.o.D.i.C.-E. Tarpey and Practice. (2013). What is next generation sequencing? 98(6):236-238.
2. Tada, T., M. Tsuchiya, K. Shimada, et al. (2017). Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. BMC infectious diseases. 17(1):1-7.
3. Wang, G., G. Zhao, X. Chao, et al. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. 17(17):6278.
4. Wyres, K.L., M.M. Lam and K.E. Holt. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nature Reviews Microbiology. 18(6):344-359.
5. David, S., S. Reuter, S.R. Harris, et al. (2019). Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. Nature microbiology. 4(11):1919-1929.

### DETERMINING THE GENOTYPE CHARACTERISTICS OF MULTIDRUG-RESISTANT *K. PNEUMONIAE* IN PATIENTS AND THE ICU ENVIRONMENT AT NATIONAL HOSPITAL FOR TROPICAL DISEASES

#### Summary

Determining the genotype characteristics of multidrug-resistant *K. pneumoniae* in patients and the ICU environment is essential to apply appropriate treatment, and at the same time identify the source of the bacteria's transmission to effectively control infection.

**Objectives:** Determine genotype characteristics of multi-drug resistant *K. pneumoniae* by Next Generation Sequencing techniques.

**Subjects and methods:** Sputum, feces, urine and wound pus (if any) collected from the patients and samples collected from the environment around the hospital bed. Prospective, cross-sectional study, using the NGS technique to sequence the whole genome of *K. pneumoniae* strains in the study.

**Results:** From 832 *K. pneumoniae* strains collected, 68 STs were identified with the predominance of ST15 (34%) and ST16 (20%). The most common resistance genes were blaNDM (54.45%), blaOXA (46.51%), blaKPC (45.07%), blaCTX (51.80%), blaSHV (98.44%), blaTEM (52.16%). Notable the frequent occurrence of multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains in the patient and/or the ICU environment during the entire study period.

**Conclusions:** There are some unique STs of *K. pneumoniae* at the study site. The number of common drug resistance genes is quite large.

**Keywords:** Multidrug resistance *K. pneumoniae*, genotype characteristics, Next Genome Sequencing.