

PHÁT HIỆN VI KHUẨN *ENTEROBACTERIACEAE* SINH ENZYM CARBAPENEMASE BẰNG KỸ THUẬT ỨC CHẾ KHÁNG SINH CARBAPENEM CẢI TIẾN

BS. HOÀNG XUÂN QUẢNG, ThS. NGUYỄN MINH HẢI
KTV. NGUYỄN VĂN THƠM, KTV. VƯƠNG SĨ CHUNG

Học viện Quân y

Phản biện khoa học: (1) PGS.TS. LÊ THU HỒNG
(2) PGS.TS. KIỀU CHÍ THÀNH

TÓM TẮT: Trong quá trình hợp tác với Khoa Vi khuẩn II và Trung tâm Nghiên cứu kháng thuốc (Viện Truyền nhiễm quốc gia Nhật Bản) về nghiên cứu phát hiện vi khuẩn sinh enzyme carbapenemase trong các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* có tỉ lệ đa kháng cao ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã thử nghiệm phương pháp “ức chế carbapenem cải tiến” để phát hiện vi khuẩn sinh carbapenemase. **Kết quả:** Hiệu quả phát hiện cao, tiến hành đơn giản, ít tốn kém. Thử nghiệm này đã được CLSI thẩm định và đã được công nhận chính thức năm 2017 với tên thử nghiệm mCIM. Phát hiện sớm các chủng vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase giúp các bác sĩ lâm sàng tiên lượng được mức độ kháng thuốc; từ đó, đề ra kế hoạch điều trị phù hợp, nâng cao khả năng thành công trong điều trị. Ngoài ra, việc phát hiện các vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase giúp chúng ta sớm tiến hành các biện pháp ngăn chặn và phòng chống lan truyền tính kháng kháng sinh trong bệnh viện.

Từ khóa: Vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*, carbapenemase.

ABSTRACT: In cooperation with the Department of Microbiology II and the Research center for drug resistance (National Institute of Infectious Diseases of Japan) on the research and detection of bacteria producing the carbapenemase enzyme in bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family which had a high rate of multiple resistance in Vietnam, the research team tested the “improved carbapenem inhibition” method to detect carbapenemase-producing bacteria. **Results:** The efficiency of detection was a high, simple, and inexpensive operation. This test had been validated by CLSI and officially recognized in 2017 with the test name was mCIM. The early detection of strains of *Enterobacteriaceae* producing carbapenemase enzyme helped clinical physicians predict the level of drug resistance; from that, proposed appropriate treatment plans, upgraded the ability of treatment success. Besides, the detection of *Enterobacteriaceae* bacteria that produce the carbapenemase enzyme helped us to early take measures to prevent and prophylaxis of the spread of antibiotic resistance in hospitals.

Keywords: Bacteria of the *Enterobacteriaceae* family, carbapenemase.

Chịu trách nhiệm nội dung: BS. Hoàng Xuân Quảng, SĐT: 0913356569.

Ngày nhận bài: 15/01/2021; mời phản biện khoa học: 02/2021; chấp nhận đăng: 15/3/2021.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Vi khuẩn sinh enzyme carbapenemase thường là những chủng vi khuẩn đa kháng, kháng mở rộng, toàn kháng với kháng sinh, dẫn tới khó khăn trong điều trị, kéo dài thời gian nằm viện, tăng gánh nặng chi phí điều trị, tỉ lệ tử vong cao [1]. Trước đây, Bộ môn Khoa Vi sinh y học, Bệnh viện Quân y 103 áp dụng 2 phương pháp để xác định các chủng vi khuẩn *Enterobacteriaceae* kháng với kháng sinh thuộc nhóm carbapenem, là phương pháp kháng sinh đồ thường quy và phương pháp sử dụng kit Carba NP.

Phương pháp kháng sinh đồ: cần phải thử nghiệm với tất cả các kháng sinh thuộc nhóm carbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem...) thì mới có thể xác định chủng vi khuẩn

kháng, trung gian hay nhạy với từng loại, nên sẽ gây tốn kém. Thực tế, các phòng xét nghiệm vi sinh khó có thể thực hiện đồng thời với tất cả các kháng sinh trên. Theo Viện Các tiêu chuẩn xét nghiệm và lâm sàng Hoa Kỳ (Clinical and laboratory standard institute - CLSI), vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* kháng với kháng sinh imipenem, meropenem, ertapenem theo kỹ thuật kháng sinh đồ khi đo được đường kính vòng vô khuẩn xung quanh các khoanh giấy trên lần lượt tương ứng là ≤ 19 mm, ≤ 19 mm, ≤ 18 mm).

Phương pháp sử dụng kit thương mại Carba NP: là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, song việc thực hiện rất tốn kém. Vì vậy, không thể dùng thường quy được. Ngoài ra, việc thực hiện còn phụ thuộc lớn vào nhà cung cấp do đây là

mặt hàng chưa được sử dụng phổ biến.

Xuất phát từ lý do trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu thử nghiệm “ức chế carbapenem cải tiến” xác định các vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase; vi khuẩn sinh enzyme carbapenemase có khả năng kháng lại các kháng sinh thuộc nhóm carbapenem như imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem...

2. QUY TRÌNH KỸ THUẬT.

Hợp tác với Khoa Vi khuẩn II và Trung tâm Nghiên cứu kháng thuốc (Viện Truyền nhiễm quốc gia Nhật Bản) nghiên cứu về phát hiện vi khuẩn sinh enzyme carbapenemase trong các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* có tỉ lệ đa kháng cao ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã thử nghiệm phương pháp “ức chế carbapenem cải tiến” để phát hiện vi khuẩn sinh carbapenemase. Kết quả cho thấy hiệu quả phát hiện cao, tiến hành đơn giản, ít tốn kém. Thử nghiệm này được CLSI thẩm định và đã được công nhận chính thức năm 2017 với tên thử nghiệm mCIM.

2.1. Chỉ định:

Các vi khuẩn Gram âm thuộc họ *Enterobacteriaceae* không nhạy cảm với ít nhất một kháng sinh thuộc nhóm carbapenem.

2.2. Nguyên lý:

Kỹ thuật dựa trên nguyên lý kiểm tra khả năng sinh enzyme carbapenemase của chủng vi khuẩn cần thử bằng cách ủ chúng trong dung dịch Trypticase soy broth chứa khoanh giấy kháng sinh meropenem. Nếu vi khuẩn sinh enzyme carbapenemase thì kháng sinh có trong khoanh meropenem sẽ bị phân hủy. Sau đó, đặt khoanh giấy meropenem ở trên lên đĩa thạch Mueller - Hinton đã ria đều vi khuẩn nhạy cảm với meropenem (chủng chuẩn quốc tế *Escherichia coli* ATCC 25922).

Nếu kháng sinh trong khoanh meropenem đã bị phá hủy thì xung quanh khoanh giấy không có vòng vô khuẩn hoặc có vòng vô khuẩn đường kính ≤ 15 mm. Nếu chủng vi khuẩn thử không sinh enzyme carbapenemase thì xung quanh khoanh giấy meropenem sẽ có vòng vô khuẩn đường kính ≥ 19 mm (vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 bị ức chế bởi meropenem). Trường hợp vòng vô khuẩn đường kính 16-18 mm thì vi khuẩn có thể kháng bởi các cơ chế khác.

2.3. Chuẩn bị:

- Vi khuẩn: chủng vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* cần thử, mọc trên môi trường dinh dưỡng trong khoảng 18-24 giờ tuổi; chủng đối chứng là vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922, 18-24 giờ tuổi.

- Thạch Muller - Hinton.
- Môi trường Trypticase soy broth.
- Khoanh giấy meropenem 10 μ g.

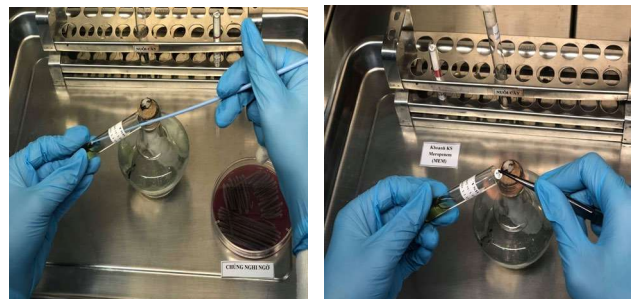
- Ống nghiệm chứa nước muối 0,9% vô trùng.

- Các thiết bị, dụng cụ trong phòng xét nghiệm khác: tủ ấm, tủ an toàn sinh học cấp II, máy đo độ đục, tấm bông vô trùng, que cấy vô trùng 1 μ l và 10 μ l, đèn cồn, thước đo. Trong đó, thiết bị chính thực hiện kỹ thuật là tủ ấm, máy đo độ đục, tủ an toàn sinh học cấp II.



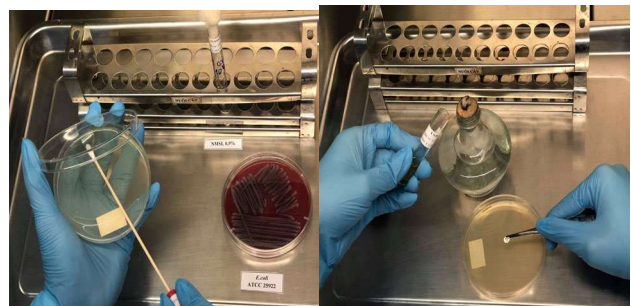
Hình 1. Dụng cụ cần thiết thực hiện kỹ thuật.

2.4. Các bước tiến hành:



Hòa loãng đầy 1 loop 1 μ l vi khuẩn cần kiểm tra vào Trypticase soy broth

Bổ sung khoanh giấy meropenem 10 μ g



Ria cấy huyền dịch vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 lên trên đĩa thạch Mueller Hinton

Đặt khoanh giấy meropenem lên đĩa Muller-Hinton đã ria đều *E. coli* ATCC 25922

Hình 2. Tóm tắt quy trình thử nghiệm cải tiến phát hiện vi khuẩn sinh carbapenemase (mCIM).

- Bước 1: lấy 1 loop 1 μ l đầy vi khuẩn cần kiểm tra hòa đều vào ống chứa 2 ml Trypticase soy broth.

- Bước 2: lấy 1 khoanh giấy kháng sinh meropenem đưa vào ống chứa 2 ml Trypticase soy broth và vi khuẩn, ủ ở 35°C trong 4 giờ.

- Bước 3: pha huyền dịch vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 nhạy cảm với meropenem nồng độ 10^8 vi

khuẩn/ml; ria cấy huyền dịch lên trên đĩa thạch Mueller Hinton.

- Bước 4: đặt khoanh giấy meropenem đã ủ ở bước 2 lên đĩa thạch Mueller Hinton (ép khoanh giấy vào thành ống để loại bỏ dịch thừa).

- Bước 5: ủ đĩa thạch Mueller Hinton ở 35°C/18-24 giờ.

2.5. Cách đánh giá kết quả:

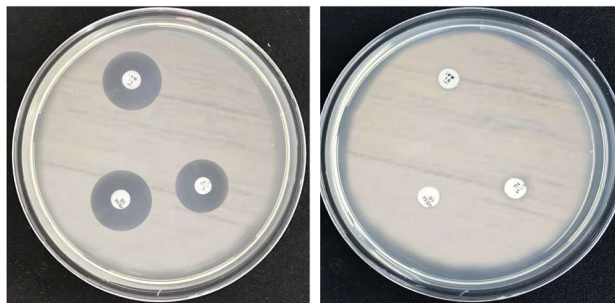
Đo đường kính vòng vô khuẩn xung quanh khoanh giấy kháng sinh meropenem, phiên giải kết quả như sau:

- Dương tính (vi khuẩn sinh enzyme carbapenemase): khi đường kính vòng vô khuẩn xung quanh khoanh meropenem ≤ 15 mm.

- Âm tính (vi khuẩn không sinh enzyme carbapenemase): khi đường kính vòng vô khuẩn xung quanh khoanh meropenem ≥ 19 mm.

- Không xác định (vi khuẩn có thể đề kháng theo cơ chế khác): khi đường kính vòng vô khuẩn quanh khoanh meropenem từ 16-18 mm.

Đo đường kính vòng vô khuẩn (d) xung quanh khoanh giấy meropenem:



Vi khuẩn không sinh carbapenemase
($d \geq 19$ mm)

Vi khuẩn sinh carbapenemase
($d \leq 15$ mm)

Hình 3. Đo đường kính vòng vô khuẩn (d) xung quanh khoanh giấy meropenem đánh giá kết quả.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.

Trong gần 1.400 chủng *Enterobacteriaceae* thu thập được từ năm 2017 đến năm 2020, lưu giữ tại Bộ môn - Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện Quân y 103, sử dụng kỹ thuật cải tiến này, nhóm nghiên cứu phát hiện được 241 chủng vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase. Một phần các chủng này đã được chúng tôi gửi sang Viện Truyền nhiễm quốc gia Nhật Bản để giải trình tự toàn bộ hệ gen và đã xác nhận được các gen sinh carbapenemase.

Trên lâm sàng, phát hiện sớm các chủng vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase có ý nghĩa rất quan trọng. Các thầy thuốc lâm sàng sẽ có căn cứ khoa học để tiên lượng được mức độ kháng thuốc của vi khuẩn; từ đó, đề ra kế hoạch

điều trị phù hợp, nâng cao khả năng thành công trong điều trị. Ngoài ra, việc phát hiện các vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase giúp cho ngành y tế và cộng đồng sớm tiến hành các biện pháp hữu hiệu ngăn chặn và phòng chống lan truyền tính kháng kháng sinh của vi khuẩn trong bệnh viện.

Bộ môn - Khoa Vi sinh, Bệnh viện Quân y 103 là cơ sở đầu tiên trong cả nước áp dụng thành công kỹ thuật “ức chế carbapenem cải tiến” để xác định vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase từ năm 2017. Quá trình áp dụng, kỹ thuật “ức chế carbapenem cải tiến” để xác định vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase đã góp phần tích cực vào việc nâng cao chất lượng điều trị các trường hợp nhiễm vi khuẩn kháng thuốc, cứu sống người bệnh. Sau khi hợp tác nghiên cứu với Viện Truyền nhiễm quốc gia Nhật Bản, kỹ thuật này đã được công nhận và phổ biến chính thức trong tài liệu của CLSI (2017) với tên kỹ thuật là mCIM.

Đây là kỹ thuật mới với trang bị, hóa chất và các bước thực hiện khá đơn giản (gồm khoanh giấy kháng sinh meropenem và dung dịch Trypticase soy broth ủ với chủng vi khuẩn nghi ngờ sinh enzyme carbapenemase; chi phí vật chất chỉ khoảng 60.000 VNĐ/1 lần), kỹ thuật “ức chế carbapenem cải tiến” có giá thành thấp hơn nhiều lần so với với kit thương mại (sử dụng kit Carba NP chi phí khoảng 300.000 VNĐ/1 lần), nhưng vẫn cho kết quả nhanh và chính xác. Vì vậy, có thể triển khai rộng rãi ở các cơ sở có đủ điều kiện đáp ứng.

4. KẾT LUẬN.

Đã nghiên cứu thành công kỹ thuật “ức chế carbapenem cải tiến” phát hiện vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh enzyme với hiệu quả phát hiện cao, tiến hành đơn giản, ít tốn kém. Kỹ thuật đã được CLSI thẩm định và được công nhận chính thức năm 2017 với tên thử nghiệm mCIM..

Qua nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất áp dụng rộng rãi thường quy kỹ thuật này vào labo xét nghiệm giúp phát hiện nhanh và tiết kiệm chi phí với các trường hợp nghi ngờ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase. Đồng thời, phổ biến kỹ thuật “ức chế carbapenem cải tiến” phát hiện vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh enzyme carbapenemase đến các phòng xét nghiệm vi sinh có khả năng nuôi cấy và phân lập vi khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. CDC (2013), “Antibiotic resistance threats in the United States”. □