

thoái hóa khớp gối nguyên phát ở bệnh viện Lão khoa Trung ương là khá cao, lên tới 51,79%, trong đó 35,71% số bệnh nhân có thiếu cơ nặng. Chỉ số khối cơ thể (BMI) < 18,50 kg/m² có liên quan với thiếu cơ ở nhóm đối tượng này. Chẩn đoán sớm thiếu cơ cần được ưu tiên ở người bệnh cao tuổi thoái hóa khớp gối nguyên phát có chỉ số khối cơ thể < 18,50 kg/m².

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chen L.-K., Woo J., Assantachai P., et al.** (2020). Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 Consensus Update on Sarcopenia Diagnosis and Treatment. *J Am Med Dir Assoc*, 21(3), 300-307.e2.
2. **Mayhew A.J., Amog K., Phillips S., et al.** (2019). The prevalence of sarcopenia in community-dwelling older adults, an exploration of differences between studies and within definitions: a systematic review and meta-analysis. *Age Ageing*, 48(1), 48–56.
3. **Aslan S.G., Saraçoğlu M., Genç H., et al.** (2018). SAT0577 Evalatuion of sarcopenia multidimensionally in patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 77(Suppl 2), 1142–1143.
4. **Altman R.D.** (1987). Criteria for the classification of osteoarthritis of the knee and hip. *Scand J Rheumatol Suppl*, 65, 31–39.
5. **Kim H.-T., Kim H.-J., Ahn H.-Y., et al.** (2016). An analysis of age-related loss of skeletal muscle mass and its significance on osteoarthritis in a Korean population. *Korean J Intern Med*, 31(3), 585–593.
6. **Kohn M.D., Sassoon A.A., and Fernando N.D.** (2016). Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin Orthop*, 474(8), 1886–1893.
7. **Lee S.Y., Ro H.J., Chung S.G., et al.** (2016). Low Skeletal Muscle Mass in the Lower Limbs Is Independently Associated to Knee Osteoarthritis. *PLoS One*, 11(11), e0166385.
8. **Srikanth V.K., Fryer J.L., Zhai G., et al.** (2005). A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(9), 769–781.

KHẢO SÁT TỶ LỆ GEN KHÁNG COLISTIN (MCR) Ở CÁC VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT THƯỜNG GẶP PHÂN LẬP TỪ MÔI TRƯỜNG TẠI CÁC CƠ SỞ CHĂN NUÔI BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR

Phạm Quốc Đô¹, Lê Hữu Dũng², Nguyễn Thị Thanh Mai³, Lê Thị Nga⁴, Nguyễn Thị Thanh Hà¹, Lê Văn Chương⁵

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Hiện nay vi khuẩn đường ruột kháng carbapenem đang gia tăng trên toàn cầu khiến việc điều trị gặp nhiều khó khăn. Colistin được coi là kháng sinh cứu cánh cuối cùng thường sử dụng phối hợp nhằm tăng hiệu quả điều trị. Tuy nhiên, việc phát hiện các plasmid có khả năng di truyền ngang kháng colistin (MCR) dẫn đến nguy cơ lây lan gen kháng nhanh chóng. **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang, phân lập và nuôi cấy 119 chủng vi khuẩn đường ruột thường gặp từ phân, đất và nước thải tại 10 trang trại chăn nuôi Lợn và Gà miền Nam Việt Nam nhằm khảo sát tỷ lệ gen MCR bằng kỹ thuật multiplex PCR với mỗi tự thiết kế phát hiện cùng lúc 7 biến thể khác nhau của gen này. **Kết quả:** Tỷ lệ vi khuẩn đường ruột mang gen MCR là 34,5%, trong đó E. coli

23,5%, K. pneumoniae 9,2%, Enterobacter spp. và Salmonella spp. chiếm 1,8%, chưa tìm thấy gen kháng ở Serratia marcescens, Citrobacter spp. Hơn 97,5% gen MCR-1, có 1 chủng mang 2 gen MCR-1 và MCR-3. **Kết luận:** Điều này cho thấy, trong môi trường từ các cơ sở chăn nuôi có sử dụng thức ăn công nghiệp, MCR tồn tại trong nhiều loài vi khuẩn khác nhau với 2 gen phổ biến là MCR-1 và MCR-3. Đây có thể được xem là nguồn chứa lớn các gen kháng colistin ít được quan tâm, có thể gây ra mối nguy tiềm tàng đối với sức khỏe con người.

Từ khóa: Họ vi khuẩn đường ruột; Colistin; MCR gen; Multiplex PCR

SUMMARY

THE RATE OF MOBILE COLISTIN RESISTANCE GENE (MCR) IN COMMON ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM THE ENVIRONMENT AT LIVESTOCK ESTABLISHMENTS BY MULTIPLEX PCR

Background: Currently, Enterobacteriaceae that are resistant to carbapenems are rapidly increasing, and antibiotic therapy is complicated. Colistin is a last-resort antibiotic that is used to boost the effectiveness of treatments. The risk of the rapid spread of resistance genes comes from the discovery of transversely genetic plasmids of the mobilized colistin resistance (MCR). **Method:** To determine the

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch

³Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

⁴Viện Y tế Công cộng Thành phố Hồ Chí Minh

⁵Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Lê Văn Chương

Email: chuongmedtech@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.10.2022

Ngày phản biện khoa học: 13.12.2022

Ngày duyệt bài: 27.12.2022

frequency of MCR genes by the method of a cross-sectional study carried out in 10 pig and chicken farms in the South of Vietnam, isolating, and growing 119 Enterobacteriaceae strains from feces, soil, and wastewater samples. Seven different variants of MCR gene were detected by the PCR multiplex method, which was a self-designed primers. **Result:** A total of 34.5% of Enterobacteriaceae in the study expressed the MCR gene, including 23.5% for *E. coli*, 9.2% for *K. pneumoniae*, 1.8% for *Enterobacter* spp, and no resistance genes were detected in *Serratia marcescens* or *Citrobacter* spp. More than 97.5% of MCR-1 genes are present, and one carries both MCR-1 and MCR-3. **Discussion and conclusion:** The study shows that MCR is present in a wide range of Enterobacteriaceae with 2 common genes: MCR-1 and MCR-3. In the environment of feeding facilities employing industrial feed, there is a high level of colistin resistance, which could be dangerous to human health.

Keywords: Enterobacteriaceae; Colistin; MCR gene; multiplex PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đối với các nhiễm trùng nghiêm trọng gây nên bởi vi khuẩn đường ruột kháng carbapenem (CRE), việc điều trị thường bị hạn chế, buộc phải dùng phối hợp với các kháng sinh khác [1].

Colistin hay polymyxin E được lựa chọn như một kháng sinh cứu cánh cuối cùng. Việc gia tăng sử dụng Colistin dẫn đến nguy cơ đề kháng Colistin. Trước 2015, các cơ chế kháng polymyxin được báo cáo hầu hết là qua các đột biến nhiễm sắc thể, tức các gene kháng thuốc nội tại, cụ thể là *phoPQ*, *pmrAB*, và *mgrB*.

Cuối 2015, cơ chế kháng colistin thông qua plasmid đầu tiên được quy định bởi gen MCR-1 đã được xác định trên plasmid IncI2 từ *E. coli* và *K. pneumoniae* trên động vật tại Trung Quốc, cung cấp bằng chứng cho sự lây lan gen kháng thuốc từ động vật sang người và sự di truyền ngang giữa các chủng khác nhau của một loài vi khuẩn [3]. Cho đến nay, hơn 9 biến thể khác (MCR-2 đến MCR-10) được tìm thấy cũng như sự gia tăng đáng kể gen này ở các loài vi khuẩn khác nhau và được báo cáo ở hơn 47 quốc gia, khiến vấn đề càng trở nên nghiêm trọng và báo động [4]. Colistin cũng được sử dụng rộng rãi như thuốc điều trị cũng như dự phòng trong thú y. Cụ thể, được trộn cùng với thức ăn trong chăn nuôi lợn và gia cầm để ngăn ngừa nhiễm trùng do các vi khuẩn gram âm đường tiêu hóa gây ra [5].

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm cập nhật tỷ lệ lưu hành cũng như kiểm tra sự xuất hiện của biến thể mới tại Việt Nam bằng việc mở rộng đối tượng nghiên cứu trên họ vi khuẩn đường ruột, thông qua các phương pháp mới trong xác định kiểu hình kháng colistin, cũng như tối ưu hóa kỹ

thuật multiplex PCR trong việc phát hiện cùng lúc các biến thể MCR khác nhau.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Các chủng vi khuẩn đường ruột thường gặp: *E. coli*, *K. pneumoniae* và các *Enterobacteria* spp. được phân lập từ mẫu phân, đất và nước thải tại các trang trại chăn nuôi Lợn và Gà tại Đồng Nai và Long An. Khảo sát các gen kháng colistin: MCR-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu. Nghiên cứu thực hiện tại Bộ môn vi sinh, Khoa Y, Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh từ tháng 12/2019 đến tháng 12/2020.

2.3. Thiết kế nghiên cứu. Nghiên cứu mô tả cắt ngang và thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.4. Cỡ mẫu. Áp dụng công thức tính cỡ mẫu Ước tính tỷ lệ lưu hành

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

Trong đó: *n* là lượng mẫu tối thiểu, ở mức tin cậy 95%, $\alpha=0.05$ và $Z_{1-\alpha/2} = Z_{0.975} = 1.96$. *P* là tỉ lệ hiện mắc ước tính dựa vào nghiên cứu: Genic environment of colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* in *Escherichia coli* from one pig farm in China, 2019. Tỉ lệ vi khuẩn đường ruột kháng colistin là 50.76% [6]. *d* là độ chính xác tuyệt đối mong muốn 15%, mức tin cậy 95%. Tính toán được *n*=43 là cỡ mẫu tối thiểu nghiên cứu. Mẫu được chọn theo phương pháp ngẫu nhiên. Chọn 10 trang trại tại các khu vực cách xa >5km về địa lý, sau đó thu thập ngẫu nhiên 5 mẫu phân, 3 mẫu đất và 2 mẫu nước tại các khu vực quanh chuồng trại (bán kính 100m) theo hướng dẫn kiểm soát nhiễm khuẩn từ chủ trang trại.

2.5. Kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu

Thu thập mẫu. Mẫu phân được lấy bằng cách phết hậu môn của động vật bằng que tăm bông vô trùng. Mẫu đất và nước theo quy trình VietGAHP và GMP (QCVN 24-2009). Sau khi thu thập, các lọ đựng mẫu được để trong các thùng bảo quản ở nhiệt độ 1-5°C, được chuyển đến phòng thí nghiệm và cấy phân lập trong vòng 24 giờ.

Phân lập và định danh vi khuẩn. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường EMB và MC, là môi trường chọn lọc dùng cho họ vi khuẩn đường ruột Gram âm đồng thời ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương và cung cấp một chỉ thị màu phân biệt giữa vi khuẩn lên men lactose ở nhiệt độ 35 - 37°C từ 18-24 giờ. Các khuẩn lạc có kiểu hình đặc trưng của Enterobacteriaceae sẽ được phân lập và định danh bằng các thử nghiệm sinh vật hóa học dựa

theo hướng dẫn Kỹ thuật vi sinh của Bộ Y tế. Sau đó, xác nhận ngẫu nhiên một số mẫu bằng giải trình tự 16S RNA. Chúng được lưu trong BHI chứa 15-20% Glycerol ở -60°C.

Xác định kiểu hình kháng colistin bằng phương pháp vi pha loãng. Cây chuyển chủng vi khuẩn lên môi trường thạch Violet Red Bile (VRB) môi trường chuyên dụng cấy cho vi khuẩn trong đất, nước, chứa kháng sinh colistin 0,5 µg/mL nhằm chọn lọc các vi khuẩn đường ruột có khả năng kháng colistin, để ủ ấm 35 - 37°C từ 18-24 giờ.

Kiểu hình đề kháng với colistin của các chủng phân lập sàng lọc được xác định thông qua việc xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) với colistin bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong dung dịch theo khuyến cáo của Viện tiêu chuẩn phòng thí nghiệm và lâm sàng (CLSI) M07- A11 M100-30th Edition 2020 và Ủy ban châu Âu về thử nghiệm độ nhạy cảm kháng sinh (EUCAST). Sử dụng chủng chuẩn E. coli ATCC-25922 để làm mẫu đối chứng.

Kháng sinh colistin sulfate được xác định nồng độ theo CoA nhà cung cấp, sau đó pha loãng theo công thức C1V1=C2V2 trong dung dịch CAMHB với dãy nồng độ giảm dần 64; 32; 16; 8; 4; 2 và 1. Cho 50 µL dung dịch kháng sinh đã pha lên mỗi giếng. Huyền phù dung dịch vi khuẩn được chuẩn bị trực tiếp từ khuẩn lạc vi khuẩn mọc trên môi trường TSA. Pha huyền dịch vi khuẩn thuần chủng trong canh thang CAMHB với nồng độ khoảng 0,5 Mc Farland 10⁸ tế bào/mL. Cho 50 µL huyền phù dịch vi khuẩn vào 50 µL dung dịch kháng sinh trong các khay 96 giếng đã được chuẩn bị sẵn. Ủ khay này trong 16 - 20 giờ ở 37±2°C. Đọc kết quả bằng cách soi dưới ánh đèn để xác định, giếng có vi khuẩn mọc là giếng có xuất hiện cặn ở đáy giếng và huyền dịch trong giếng bị đục, còn giếng không có cặn và không bị đục là giếng vi khuẩn không mọc. Giá trị MIC được sử dụng để chọn lọc kiểu hình kháng colistin của vi khuẩn họ đường ruột từ 2 µg/mL trở lên.

Xác định kiểu gen MCR bằng multiplex PCR

Tách chiết DNA: DNA được tách chiết bằng phương pháp nhiệt, sau đó được đo OD xác định độ tinh sạch A260/A280.

Thiết kế mồi: Truy cập cơ sở dữ liệu NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Lấy trình tự các gen mục tiêu MCR-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 dưới dạng FASTA. Sử dụng phần mềm Bioedit để ClustalW để căn chỉnh sự tương đồng các gen. Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) để thiết kế các primer tương ứng. Chạy Blast

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) để kiểm tra tính đặc hiệu mồi. Dùng OligoAnalyzer 3.0 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyser>) để phân tích đặc điểm của mồi. Các mồi được thiết kế cùng lúc có thể phát hiện được 2 gen ở những đoạn trình tự tương đối phù hợp với nhau. Đây là điểm đặc biệt trong nghiên cứu nhằm tối ưu hoá việc phát hiện cùng lúc các biến thể khác nhau có trình tự tương đối giống nhau trong cùng một phản ứng PCR. Bằng quy trình trên, nghiên cứu thiết kế 2 mồi là MCR-3/7 với kích thước sản phẩm 324 bp và MCR-4 với kích thước sản phẩm 516 bp. Các mồi còn lại sử dụng theo nghiên cứu tham khảo.

Phản ứng PCR: Thể tích 20 µL có chứa GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Mỹ) (Bao gồm: 2X Green GoTaq Reaction Buffer pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl₂) 10 µL; mỗi loại mồi 20 µM với; 10 ng DNA mạch khuôn, còn lại nước cất.

Chu trình nhiệt: Nhiệt độ 94°C trong 4 phút; 30 chu kỳ với nhiệt độ 94°C trong 5 giây, 59 °C trong 20 giây; 1 chu kỳ 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C.

Điện di sản phẩm: Gel được chuẩn bị với 2% (w/v) agarose trong dung dịch đệm 1X TAE (Tris-Acetic-EDTA) với độ pH = 8,0. 1 µL thuốc nhuộm cho vào 5 µL dung dịch PCR phản ứng. Gel được chạy ở 120V trong vòng 25 phút và sau đó được nhuộm với ethidium bromide trong 5 phút, rửa sạch với nước trong 10 phút. Hình ảnh gel được chụp lại dưới đèn UV của máy đọc gel. Kích thước băng gel sẽ đổi chiều với kích thước điểm đánh dấu đã biết trước.

Xác nhận bằng giải trình tự: Sản phẩm PCR có kích thước phù hợp với sản phẩm của mồi tương ứng được giải trình tự gen mục tiêu, đối chiếu kết quả blast trên NCBI để xác nhận.

2.6. Phân tích và xử lý số liệu. Dữ liệu được xử lý bằng SPSS Version 26.0.1: Các phép kiểm định chi bình phương hoặc Fisher để phân tích mối liên quan các biến.

2.7. Đạo đức nghiên cứu. Nghiên cứu được xét duyệt và thông qua bởi Bộ môn Di truyền - Trường ĐH Khoa học tự nhiên TP. Hồ Chí Minh. Mẫu nghiên cứu được thu thập dưới sự đồng ý của chủ trang trại một cách tự nguyện. Mẫu sau khi lấy được bảo quản, vận chuyển và xét nghiệm theo đúng các qui định về an toàn sinh học.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn

Bảng 1. Tỷ lệ định danh vi khuẩn

Tên chủng vi khuẩn	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Escherichia coli L(+)	60	50,5%
Klebsiella pneumoniae	42	35,3%
Serratia marcescens	10	8,4%
Enterobacter spp.	5	4,2%
Citrobacter spp.	1	0,8%
Salmonella spp	1	0,8%
Tổng cộng	119	100%

Trong tổng 95/100 mẫu phẩm nuôi cấy có sự

Bảng 2. Tỷ lệ chủng vi khuẩn sàng lọc trên môi trường VRB 0,5 ug/mL colistin

Chủng vi khuẩn	Có khuẩn lạc		Không mọc		Tổng số	
	Tần số (n)	Tỷ lệ	Tần số(n)	Tỷ lệ	Tần số(n)	Tỷ lệ
Escherichia coli L(+)	51	53,1%	9	39,1%	60	50,5%
Klebsiella pneumoniae	29	30,2%	13	56,5%	42	35,3%
Serratia marcescens	10	10,4%	0	0%	10	8,4%
Enterobacter spp.	4	4,2%	1	4,4%	5	4,2%
Citrobacter spp.	1	1%	0	0%	1	0,8%
Salmonella spp	1	1%	0	0%	1	0,8%
	96	80,8%	23	19,2%	119	100%

Kết quả sau khi cấy trên môi trường VRB chứa colistin có nồng độ 0,5 ug/mL cho thấy, có 96/119 chủng vẫn có khuẩn lạc, chiếm tỷ lệ khoảng 81%, ở cả 6 loài vi khuẩn được phân lập. Trong đó, cao nhất là E. coli với 51/96 mẫu (53%), thấp nhất là Citrobacter spp. và Salmonella spp. 1/96 (0,8%). Có 23/119 chủng không mọc được trên môi trường sàng lọc này, chiếm khoảng 19%.

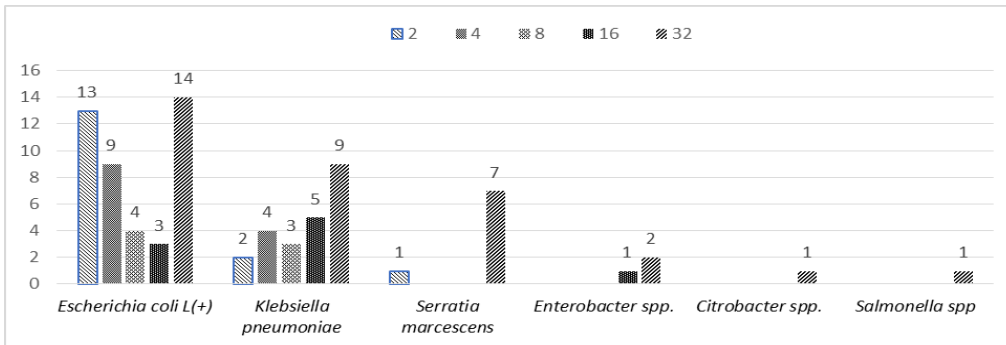
hiện diện của vi khuẩn đường ruột, thu được 119 chủng với 6 loài. Trong đó, chiếm tỷ lệ cao nhất là E. coli (50,5%), K. pneumoniae (35,3%), Serratia marcescens (8,4%), khoảng 6% các loài còn lại bao gồm: Enterobacter spp. (4,2 %); thấp nhất Citrobacter spp. (0,84%) và Salmonella spp. (0,84 %).

3.2. Kết quả kiểu hình kháng colistin

Kết quả sàng lọc kiểu hình bằng 0,5 ug/mL colistin

Kết quả sàng lọc kiểu hình phương pháp vi pha loãng. Thực hiện xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) bằng phương pháp vi pha loãng trên 96 chủng có mọc trên môi trường VRB 0,5 ug/mL.

Dựa theo tiêu chuẩn EUCAST về ngưỡng breakpoint đối với họ vi khuẩn đường ruột. Ngưỡng nhạy cảm <2 ug/mL, ngưỡng kháng ≥ 2 ug/mL.



Hình 1. Phân bố các chủng vi khuẩn có kiểu hình kháng ở mức MIC khác nhau

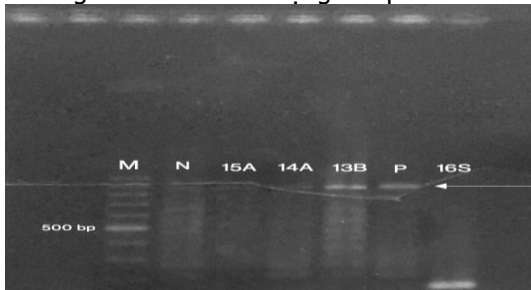
Các chủng E. coli trong nghiên cứu có kiểu hình kháng colistin ở tất cả mức nồng độ MIC khác nhau, tỷ lệ cao nhất nằm ở mức 2 ug/mL (13/43, 30%) và mức 32 ug/mL (14/43, 33%). Thấp nhất ở mức 16 ug/mL (3/43, 7%). K. pneumoniae có 23 chủng kiểu hình kháng, tỷ lệ kiểu hình cao nhất ở MIC 32 ug/mL (9/23, 39%), thấp nhất ở 2 ug/mL (2/23, 9%). Serratia marcescens có 8 chủng kiểu hình kháng, tỷ lệ cao nhất ở mức 32 ug/mL, (7/8, 88%), thấp nhất 1 chủng kháng ở 2 ug/mL (1/8, 13%). Enterobacter spp. Có 3 chủng có kiểu hình

kháng, ở mức 32 ug/mL có (2/3, 67%). Trong nghiên cứu này, Citrobacter có 1 chủng có kiểu hình kháng mức 32 ug/mL. Salmonella spp có 1 mẫu duy nhất có kiểu hình kháng ở MIC 32 ug/mL (Hình 1).

3.3. Kết quả kiểu gen

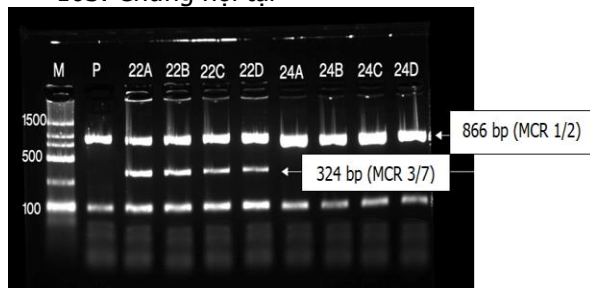
Kết quả single PCR (Hình 2): Gen MCR 1/2 của mẫu 13B (L2P3) được khuếch đại đặc hiệu, thể hiện qua băng DNA tương đối rõ, không có băng phụ, kích thước đúng với kích thước chứng dương P (866 bp) từ nghiên cứu của tác giả Chuong L.V, 2017 [8]. Như vậy, nồng

độ các thành phần và điều kiện chu trình nhiệt của phản ứng đơn mỗi sẽ được áp dụng trong phản ứng đa mỗi mPCR để phát hiện cùng lúc các gen khảo sát khác, sau đó được tối ưu hoá phản ứng nhằm thu chất lượng sản phẩm tốt nhất.



Hình 2. Kết quả điện di single PCR

M: Thang bladder DNA 100 bp
 N: Chứng âm
 15A, 14A, 13B: Chủng vi khuẩn
 P : Chứng dương
 16S: Chứng nội tại



Hình 3. Kết quả điện di phản ứng Gradient PCR
Kết quả multiplex PCR (Hình 3): Để tối

Bảng 3. Tỷ lệ phân bố và mối liên quan giữa các chủng và kết quả mPCR

Chủng vi khuẩn	Kết quả mPCR		Tổng số (n,%)	P*
	MCR	Không phát hiện		
Escherichia coli L(+)	28 (23,5%)	32 (26,9%)	60 (50,4%)	0.02
Klebsiella pneumoniae	11 (9,2%)	31 (26,1%)	42 (35,3%)	
Serratia marcescens	0	10 (8,4%)	10 (8,4%)	
Enterobacter spp.	1 (0,8%)	4 (3,4%)	5 (4,2%)	
Citrobacter spp.	0	1 (0,8 %)	1 (0,8%)	
Salmonella spp.	1 (0,8%)	0	1 (0,8%)	
Tổng số	41 (34,5%)	78 (65.5%)	119 (100%)	

Trong 119 chủng vi khuẩn được phân lập, có 34,5 % chủng mang gen MCR, trong đó tỷ lệ mang gen kháng của E. coli cao nhất 28/119 (23,5%), tiếp theo là K. pneumoniae 11/119 (9,2%), Enterobacter spp. và Salmonella spp cùng là 1/119 (0,8%), chưa phát hiện gen MCR trên Serratia marcescens và Citrobacter spp.

*Kiểm định Fisher Exact P=0.02 (Sig. <5%) với Cramer' V = 0.335

IV. BÀN LUẬN

Các mẫu phẩm được cấy trên môi trường

ưu hoá phản ứng PCR đa mỗi, nghiên cứu giữ nguyên các điều kiện phản ứng của PCR đơn mỗi, chỉ tiến hành thiết lập phản ứng PCR gradient để xác định nhiệt độ bắt cặp để cho sản phẩm tối ưu nhất. Biên độ gradient từ 56°C, 57°C, 58°C, 59°C tương ứng ở 2 mẫu PCR-22 (A, B, C, D) và PCR-24 (A, B, C, D).

Bốn mẫu PCR-22 đều xuất hiện 2 băng rõ, không băng phụ, 1 băng có kích thước tương ứng với Chứng dương và kích thước mỗi MCR1/2 (866 bp) giống nhau ở 4 nhiệt độ. 1 băng có kích thước nằm ở giữa khoảng 200-500 bp, băng rõ nhất ở mẫu PCR-22A (ở nhiệt độ 56°C) so với 3 mẫu ở 3 nhiệt độ còn lại, có khả năng tương ứng với mỗi MCR 3/7 (321 bp). Nghiên cứu thực hiện giải trình tự gen sản phẩm của chủng này để xác định gen kháng. Ở 4 mẫu PCR-24, đều xuất hiện 1 băng rõ, không có băng phụ, có kích thước tương ứng với chứng dương và kích thước của mỗi MCR 1/2 (866 bp). Nghiên cứu tiến hành thử nghiệm phản ứng PCR đa mỗi theo nồng độ các thành phần, chu trình nhiệt như phản ứng đơn mỗi, ở nhiệt độ bắt cặp 56°C trong điều kiện tối ưu nhất để hạn chế các hiện tượng nhiễu trong phản ứng mPCR. Trong tất cả 96 chủng thực hiện mPCR, nghiên cứu ghi nhận 41/96 (42,7%) chủng có hiện diện gen kháng là MCR 1/2 chiếm tỷ lệ 42,7% và 55/96 mẫu âm tính với các gen khảo sát chiếm 57,3%. Trong đó, có 1 chủng PCR-22 (mã phẩm L3N1) chứa đồng thời 2 gen MCR 1/2 và MCR 3/7 chiếm tỷ lệ 1/96 (1,04%).

thạch EMB, MC, hầu hết là các khuẩn lạc lên men đường lactose, phù hợp với vi hệ đường ruột của gia súc, gia cầm. Kết quả 95/100 mẫu có vi khuẩn đường ruột hiện diện cho thấy họ vi khuẩn hiện diện trong môi trường là khá cao. Mặc dù sử dụng phương pháp thủ công, tuy nhiên là phương pháp được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm vi sinh ở Việt Nam với độ chính xác cao. Chúng tôi cũng tiến hành định danh lại bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA để xác nhận cũng như định danh dưới

loài cho một số chủng vi khuẩn với kết quả phù hợp so với ban đầu. Kết quả cho thấy *E. coli* chiếm cao nhất (50,5%), *K. pneumoniae* (35,3%). Đặc biệt, trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và định danh được một số chủng khác của họ vi khuẩn đường ruột như *Serratia marcescens* (8,4%), *Enterobacter spp.* (4,2%); *Citrobacter spp.* (0,84%) và *Salmonella spp.* (0,84%).

Các mẫu phẩm thu thập được cấy trên môi trường thạch VRB, môi trường chuyên dụng để nuôi cấy vi khuẩn phân lập từ nước và đất, chứa kháng sinh colistin 0,5 µg/mL nhằm chọn lọc kiểu hình các vi khuẩn đường ruột có khả năng kháng colistin. Kết quả 81% đều lên khuẩn lạc ở môi trường này. Tỷ lệ này nghiên cứu của chúng tôi tương đương với nghiên cứu của

Huang và cộng sự tại Trung Quốc [9]. Tác giả đã thu được 4089 chủng *E. coli* từ 4888 mẫu phân gia súc, gia cầm (83,7%). Có 82% chủng kháng colistin và 18% chủng nhạy và, trong đó MIC ở nồng độ 32 µg/mL chiếm tỉ lệ cao nhất với 35%, thấp nhất ở nồng độ MIC 8 µg/mL chiếm 7%.

Trong tổng số 119 chủng được khảo sát có 41/119 (34,5%) vi khuẩn mang gen kháng colistin MCR-1/2, trong đó 1 chủng mang gen MCR-3/7. Theo các nghiên cứu trước, gen MCR-1 khá phổ biến trên các chủng vi khuẩn ở gia súc và gia cầm. Ghi nhận lần đầu tại Trung Quốc năm 2015 ở vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn và sản phẩm từ thịt lợn với tỉ lệ mang gen là 15-20%. Năm 2016, trong nghiên cứu của Surbhi Malhotra-Kumar [10] cho thấy sự gia tăng của gen MCR-1 với tỉ lệ phát hiện là 37,5%. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện gen MCR-1/2 với tỉ lệ 34,5% là khá tương đồng.

Tỉ lệ kháng colistin ở các chủng *E. coli* mang gen MCR-1 là 23,5% trong nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với nghiên cứu của Huang và cộng sự [9] Tác giả đã tìm thấy tỉ lệ kháng colistin ở *E. coli* phân lập từ động vật với tỉ lệ 18,7%, trong đó tỉ lệ kháng ở gà trong trang trại là 14%. So với phân lập từ lợn và gà, tỉ lệ kháng colistin ở *E. coli* từ bò rất thấp 0,9% có thể liên quan đến việc sử dụng thuốc này không thường xuyên trên trang trại bò sữa.

Điều tương đối mới trong nghiên cứu này là tỉ lệ *K. pneumoniae* mang gen kháng colistin chiếm đến 9,2%. Là chủng vi khuẩn thường ít được khảo sát trong các nghiên cứu trước đây. Mặc khác, các chủng vi khuẩn khác như *Serratia marcescens*, *Citrobacter spp.* không mang gen kháng. Điều này có thể đặt ra mối quan tâm về sự liên hệ chuyển gen ngang giữa *E. coli* với *K. pneumoniae* trong môi trường cao hơn so với các

chủng vi khuẩn cùng họ khác.

Nghiên cứu đã phát hiện được 1 chủng *E. coli* mang đồng thời 2 gen MCR-1 và MCR-3. Đây là ưu điểm quan trọng nhất của phản ứng mPCR khi thiết lập việc khảo sát đồng thời các gen khác nhau, cũng như tiện để để khảo sát đặc điểm di truyền của những chủng này. Tuy nhiên để bàn luận về việc sự tồn tại đồng thời của nhiều gen kháng kháng sinh có làm thay đổi tính nhạy cảm kháng sinh hay không thì cần có các nghiên cứu sâu hơn và với số lượng mẫu lớn hơn.

V. KẾT LUẬN

Việc ứng dụng kỹ thuật multiplex PCR với mỗi tự thiết kế là hoàn toàn khả thi trong việc thiết lập một phản ứng để khảo sát cùng lúc nhiều gen và biến thể mới liên quan nhằm phát hiện nhanh và chính xác gen kháng colistin tồn tại trong các vi khuẩn phân lập được từ môi trường và có thể mở rộng xác định gen MCR cho các vi khuẩn gây bệnh, ứng dụng trong việc chẩn đoán và điều trị trên lâm sàng.

Tỉ lệ vi khuẩn họ đường ruột mang gen MCR kháng colistin trong nghiên cứu này là 34,5%. Trong đó, có mối liên hệ giữa tỉ lệ kiểu gen với từng loài: *E. coli* cao nhất (23,5%), *K. pneumoniae* (9,2%), *Enterobacter spp.* (0,8%), và *Salmonella spp.* (0,8%), chưa phát hiện gen MCR trên *Serratia marcescens* và *Citrobacter spp.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Falagas M. E., Karageorgopoulos D. E., Nordmann P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 2011 Jun; pp. 653-66.
2. Liu Y. Y., Wang Y., Walsh T. R., et al., 'Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study', *Lancet Infect. Dis.*, vol. 16, no. 2, Feb. 2016, pp. 161-168.
3. Meletis G., Skoura L., 'Polymyxin Resistance Mechanisms: From Intrinsic Resistance to MCR Genes', *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, vol. 13, no. 3, Nov. 2018, pp. 198-206.
4. Kempf I., Fleury M. A., Drider D., et al., 'What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe?', *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 42, no. 5. Nov. 2013, pp. 379-383.
5. Wang Z., Fu Y., Schwarz S., et al., 'Genetic environment of colistin resistance genes mcr-1 and mcr-3 in *Escherichia coli* from one pig farm in China', *Vet. Microbiol.*, vol. 230, no. December 2018, pp. 56-61.
6. Chuong L.V., Prachayasittikul V., Ayudhya C.I.N., et al., 'Multiplex PCR scheme for variant plasmid mediated class C β-lactamase typing', *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 32, no. 3, Mar. 2018, p. e22298.

7. Huang X., Yu L., Chen X., et al., 'High Prevalence of Colistin Resistance and mcr-1 Gene in Escherichia coli Isolated from Food Animals in China', Front. Microbiol., vol. 8, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.3389/FMICB.2017.00562.

8. Malhotra-Kumar S., Xavier B. B., Das A.J., et al., 'Colistin resistance gene mcr-1 harboured on a multidrug resistant plasmid', Lancet Infect. Dis., vol. 16, no. 3, Mar. 2016, pp. 283–284.

ẢNH HƯỞNG TỚI THỊ LỰC CỦA CÁC TỔN THƯƠNG VỔNG MẠC ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TẠI BỆNH VIỆN GIAO THÔNG VẬN TẢI HÀ NỘI

Đinh Thị Thanh Vân^{1,2}, Nguyễn Thị Thu Trang³,
Lã Thị Quyên², Hoàng Thị Thu Hà⁴, Hoàng Thị Phúc¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phân tích ảnh hưởng tới giảm thị lực của các tổn thương võng mạc đái tháo đường tại bệnh viện Giao thông vận tải Hà Nội. **Đối tượng và phương pháp:** 259 bệnh nhân đái tháo đường tại bệnh viện Giao thông Vận tải Hà Nội, được đo thị lực và chụp ảnh đáy mắt năm 2022. **Kết quả:** Khả năng mắt có thị lực thấp ở nhóm có xuất tiết cứng là 11,69 so với nhóm không có; nhóm có xuất tiết mềm là 5,43 so với không có; ở giai đoạn tăng sinh là 24,8 so với giai đoạn không tổn thương với $p < 0,05$. **Kết luận:** Xuất tiết cứng, xuất tiết mềm và giai đoạn tăng sinh là những yếu tố làm tăng khả năng mắt có thị lực thấp ở bệnh nhân đái tháo đường.

Từ khóa: tổn thương võng mạc đái tháo đường, thị lực

SUMMARY

EFFECT ON VISUAL IMPAIRMENT OF DIABETIC RETINOPATHY LESIONS IN GENERAL HOSPITAL OF TRANSPORTATION IN HANOI

Objective: To analyse the effect on visual impairment of diabetic retinopathy lesions at General Hospital of Transportation in Hanoi. **Method:** 259 patients with diabetes in the General Hospital of Transportation in Hanoi were performed visual acuity test and retinal photography in 2022. **Result:** The odds of getting severe visual impairment in the hard exudate group is 11.69 that of group without hard exudate; in the soft exudate group is 5.43 that of group without soft exudate; in the proliferative retinopathy group is 24.8 that of no retinopathy group with all p -value < 0.05 . **Conclusion:** hard exudate, soft exudate and proliferative retinopathy stage were associated factors increase the likelihood of severe visual impairment.

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Giao thông Vận tải Hà Nội

³Trường Đại học Y Dược Thái Bình

⁴Bệnh viện Mắt Trung ương

Chịu trách nhiệm chính: Đinh Thị Thanh Vân

Email: drthanhvan@gmail.com

Ngày nhận bài: 18.10.2022

Ngày phản biện khoa học: 12.12.2022

Ngày duyệt bài: 26.12.2022

Keywords: diabetic retinopathy, visual impairment

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh võng mạc đái tháo đường (VMĐTĐ) đang dần trở thành nguyên nhân gây mù lòa thứ 2, trở thành vấn đề y tế và xã hội nghiêm trọng. Tổn thương võng mạc trong các giai đoạn VMĐTĐ có những đặc trưng riêng, dẫn tới suy giảm thị lực của mắt bị bệnh. Việc phát hiện và theo dõi định kỳ bệnh lý này, trong đó đánh giá tổn thương bằng hình ảnh chụp đáy mắt cùng với xác định mức độ suy giảm thị lực giúp chẩn đoán và điều trị bệnh kịp thời [1]. Tại Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về bệnh VMĐTĐ, nhưng chủ yếu thực hiện tại bệnh viện tuyến trung ương hoặc tuyến tỉnh, khi bệnh nhân tới khám ở giai đoạn muộn [1], [2], [3]. Bên cạnh đó vẫn còn thiếu các phân tích ảnh hưởng tới thị lực của tổn thương võng mạc.

Để tìm hiểu về đặc điểm giảm thị lực và các tổn thương võng mạc qua hình ảnh chụp đáy mắt ở nhóm bệnh nhân được theo dõi ở tuyến cơ sở tại nội thành Hà Nội, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu: *Phân tích một số đặc điểm liên quan đến bệnh võng mạc đái tháo đường tại bệnh viện Giao thông vận tải Hà Nội.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: 259 bệnh nhân có chẩn đoán đái tháo đường tại Bệnh viện Giao thông Vận tải Hà Nội. Thời gian nghiên cứu: từ tháng 01 đến 08/2022.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Được chẩn đoán xác định bị bệnh ĐTĐ cả 2 type.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Về toàn thân: bệnh nhân quá già yếu, khó hợp tác; bệnh nhân có bệnh toàn thân nặng, phụ nữ có thai.

- Tại mắt:

+ Bệnh nhân bị đục nhiều môi trường trong suốt của mắt ở mức độ cản trở soi đáy mắt (sẹo