

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

HOÀNG THỊ BÍCH NGỌC

**XÁC ĐỊNH SỰ PHÂN BỐ VÀ
MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA
CÁC NHÓM *ESCHERICHIA COLI* GÂY TIÊU CHẢY
Ở TRẺ EM DƯỚI 5 TUỔI TẠI ĐỊA BÀN HÀ NỘI**

Chuyên ngành : Vi sinh y học

Mã số : 62 72 01 15

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2017

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI:
VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

Người hướng dẫn khoa học:

**PGS.TS. Hoàng Thị Thu Hà
GS.TS. Phùng Đắc Cam**

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Thị Tuyền
Đại học Y Hà Nội

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Đăng Hiền
Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Phản biện 3: PGS.TS. Hồ Bá Do
Học viện Quân y

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện họp tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại

- Thư viện Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương
- Thư viện Quốc gia

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoàng Thị Bích Ngọc, Nguyễn Thùy Trâm, Phùng Đắc Cam, Hoàng Thị Thu Hà (2014), “Xác định các nhóm *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi tại Bệnh viện Nhi Trung ương bằng kỹ thuật PCR”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, Tập XXIV, Số 8 (157), trang 280 - 288, Hà Nội.
2. Hoàng Thị Bích Ngọc, Đỗ Bích Ngọc, Phạm Diệu Quỳnh, Phùng Đắc Cam, Hoàng Thị Thu Hà (2015), “Tính kháng kháng sinh và mối liên quan phân tử các chủng Enteraggative *E. coli* phân lập từ trẻ tiêu chảy và trẻ không tiêu chảy bằng phương pháp Pulsed Field Gel Electrophoresis”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, Tập XXV, Số 8(168), trang 16 - 22, Hà Nội.
3. Hoàng Thị Bích Ngọc, Nguyễn Quốc Hùng, Phùng Đắc Cam, Hoàng Thị Thu Hà (2016), “Xác định các nhóm *Escherichia coli* gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi tại bệnh viện đa khoa Ba Vì”, *Tạp chí Y học thực hành*, Số 10(1024), trang 228 - 230, Hà Nội.

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AMC	Amoxicillin/clavulanic acid
AMP	Ampicillin
BVBV	Bệnh viện Đa khoa Ba Vì
CEP	Cephalothin
CHL	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
CXM	Cefuroxim
DAEC	Diffusely adherent <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> bám dính lan tỏa ở ruột)
DEC	Diarrhea <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i> gây tiêu chảy)
EAEC	Enteraggregative <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> bám dính kết tập ruột)
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> gây xuất huyết ruột)
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> xâm nhập ruột)
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> gây bệnh đường ruột)
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> sinh độc tố ruột)
KBV	Trẻ khỏe tại huyện Ba Vì
KHN	Trẻ khỏe tại quận Tây Hồ
LT	Heat-Labile-Toxin
MLST	Multi locus sequence typing (giải trình tự gen nhiều locus)
NAL	Nalidixic acid
NTƯ	Bệnh viện Nhi Trung ương
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis (điện di xung trường)
SXT	Trimethoprim/sulfamethoxazole
ST	Sequence typing (kiểu trình tự)
TET	Tetracyclin
VT	Verocytotoxin
VTEC	Verocytotoxin - producing <i>E. coli</i>

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chảy là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở trẻ em, đặc biệt các nước đang phát triển. Theo ước tính mỗi năm trên thế giới có khoảng 2 tỷ trường hợp tiêu chảy trong đó có khoảng 1,9 triệu trẻ dưới 5 tuổi tử vong do tiêu chảy. Tại Việt Nam, theo thống kê của Cục y tế dự phòng, năm 2009 Hà Nội vẫn có tới 104367 trường hợp tiêu chảy/năm cao nhất trong cả nước với tỷ lệ 1612,54/100000 dân.

Căn nguyên gây tiêu chảy rất đa dạng và *Escherichia coli* (*E. coli*) là căn nguyên quan trọng gây tiêu chảy thường gặp ở trẻ dưới 5 tuổi. Tỷ lệ *E. coli* gây tiêu chảy khác nhau ở mỗi quốc gia và thời điểm nghiên cứu, tại Việt Nam năm 2001 - 2002 *E. coli* gây tiêu chảy chiếm 22,5% căn nguyên gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi điều trị tại bệnh viện, tại Trung Quốc năm 2012 - 2013 nghiên cứu tại 4 bệnh viện tỷ lệ *E. coli* gây tiêu chảy chiếm 9,9% trong số các căn nguyên gây tiêu chảy.

Xác định mối liên quan giữa triệu chứng lâm sàng của bệnh tiêu chảy với căn nguyên gây tiêu chảy giúp định hướng căn nguyên gây bệnh để xử trí kịp thời. Những năm gần đây Enterotoxigenic *E. coli* (EAEC) là nhóm *E. coli* gây tiêu chảy mới nổi, chiếm tỷ lệ cao ở các nước đang phát triển như tại Ấn Độ EAEC chiếm 65,4% trong số các loại *E. coli* gây tiêu chảy. Việt Nam, EAEC chiếm 11,6% căn nguyên gây tiêu chảy của trẻ dưới 5 tuổi, năm 2011 xảy ra dịch tiêu chảy ở Đức đề cập đến vai trò của EAEC trong vụ dịch tiêu chảy này. Việc nghiên cứu căn nguyên gây tiêu chảy, mức độ kháng kháng sinh đặc biệt mối liên quan dịch tễ học phân tử có ý nghĩa quan trọng và cần thiết nhằm phục vụ tốt hơn cho công tác phòng và điều trị bệnh. Kỹ thuật điện di xung trường (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) đã được áp dụng khá rộng rãi để xác định mối liên quan dịch tễ học phân tử của các chủng vi khuẩn thông qua sự khác nhau của các đoạn kiểu gen. Gần đây kỹ thuật giải trình tự gen nhiều locus (Multilocus sequence typing - MLST) được đánh giá là kỹ thuật có mức độ phân loại tốt với

một số loại vi khuẩn như *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào sử dụng đồng thời hai kỹ thuật PFGE và MLST để xác định mối liên quan dịch tễ học phân tử của các chủng EAEC do vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “**Xác định sự phân bố và một số đặc điểm sinh học phân tử các nhóm *Escherichia coli* gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi tại địa bàn Hà Nội**” với 2 mục tiêu:

1. Xác định tỷ lệ, sự phân bố và một số yếu tố liên quan của các nhóm *Escherichia coli* gây tiêu chảy ở trẻ dưới 5 tuổi tại bệnh viện Nhi Trung ương và bệnh viện Đa khoa Ba Vì năm 2010 - 2012.
2. Mô tả một số đặc điểm sinh học phân tử của các chủng Enteroaggregative *E. coli* ở 2 bệnh viện nghiên cứu trên và trẻ không tiêu chảy tại huyện Ba Vì và quận Tây Hồ - Hà Nội 2010 – 2012.

❖ **Những đóng góp mới của luận án**

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam sử dụng kỹ thuật PFGE và MLST nghiên cứu mối liên quan dịch tễ học phân tử của các chủng EAEC, kết quả nghiên cứu cho thấy đối các chủng EAEC sử dụng kỹ thuật MLST có khả năng phân biệt tốt hơn PFGE.

Xác định được một số yếu tố liên quan tới tiêu chảy có EAEC ở trẻ tiêu chảy dưới 5 tuổi.

❖ **Cấu trúc luận án**

- Luận án 115 trang

- Đặt vấn đề: 2 trang, chương 1: Tổng quan (36 trang), chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (17 trang), chương 3: Kết quả nghiên cứu (32 trang), chương 4: Bàn luận (25 trang), kết luận (1 trang), kiến nghị (1 trang), những đóng góp mới của luận án (1 trang).

Trong luận án có 29 bảng, 15 biểu đồ, 17 hình.

Luận án có 127 tài liệu tham khảo, trong đó có 13 tài liệu tiếng Việt, 114 tài liệu tiếng Anh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tiêu chảy trên thế giới và Việt Nam

Thế giới vẫn còn gần 9 triệu trẻ chết mỗi năm, tỷ lệ tử vong ở trẻ dưới 5 tuổi do tiêu chảy đứng thứ hai (sau viêm phổi) chiếm 11%. Hơn 80% tỷ lệ tử vong xảy ra ở châu Phi và Đông Nam Á.

Khảo sát tình hình tiêu chảy Toàn quốc trong 10 năm (2004-2014), năm 2004 Việt Nam có 922832 trường hợp tiêu chảy, năm 2005 tăng lên cao nhất là 1012378 trường hợp, sau đó qua các năm có xu hướng giảm dần đến năm 2014 còn 566215 trường hợp.

1.2. Bệnh tiêu chảy

Tiêu chảy là tình trạng trẻ đi ngoài phân lỏng bất thường từ 3 lần trở lên trong 24 giờ, kèm theo trẻ có thể xuất hiện các triệu chứng như sốt, nôn, đau bụng. Tiêu chảy cấp là tiêu chảy dưới 14 ngày, tiêu chảy trên 14 ngày là tiêu chảy kéo dài.

Căn nguyên gây tiêu chảy rất đa dạng từ vi rút, vi khuẩn đến ký sinh trùng, nấm. Ở các nước đang phát triển căn nguyên vi khuẩn và ký sinh trùng chiếm tỷ lệ cao hơn. Triệu chứng lâm sàng của tiêu chảy đa dạng trẻ vật vã, kích thích quấy khóc hoặc li bì, hôn mê nếu mất nước nặng, buồn nôn hoặc nôn, khát nước. Tiêu chảy phân lỏng hoặc lẫn máu hoặc nhày máu. Điều trị tiêu chảy bằng bù nước và điện giải, kết hợp dùng kháng sinh nếu do vi khuẩn.

1.3. Tiêu chảy do *E. coli*

Tiêu chảy do *E. coli* là bệnh phổ biến trên thế giới đặc biệt ở trẻ em các nước đang phát triển. Tỷ lệ *E. coli* khác nhau tùy từng vùng địa lý. Châu Phi, vùng ngoại thành Sudan tiêu chảy do *E. coli* chiếm 48% ở trẻ dưới 5 tuổi tiêu chảy. Trung Quốc, nghiên cứu năm 2009 - 2013 trẻ dưới 5 tuổi tiêu chảy tại bệnh viện thì *E. coli* chỉ chiếm 5%. Năm 2011 nhiều nước châu Âu trong đó có Đức dịch tiêu chảy do *E. coli* O104:H4 xảy ra, có 3910 người mắc bệnh, 782 trường hợp có hội chứng tan huyết, urê huyết cao, trong đó 45 trường hợp tử vong.

Việt Nam, theo nghiên cứu của Nguyễn Vũ Trung, Bùi Thị Thu Hiền trên đối tượng trẻ dưới 5 tuổi tiêu chảy, tỷ lệ *E. coli* gây tiêu chảy chiếm trên 20%. Năm 2010-2012 nghiên cứu tác nhân gây tiêu chảy phân lập được ở trẻ em nhập viện tỉnh Thái Bình *E. coli* gây tiêu chảy chiếm 15%.

1.4. *E. coli* gây tiêu chảy (*Diarrhea E. coli: DEC*)

E. coli mang gen độc lực có khả năng gây tiêu chảy, dựa vào tính chất gây bệnh chia *E. coli* gây tiêu chảy thành các nhóm chính:

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC): *E. coli* gây bệnh đường ruột

Enteraggregative *E. coli* (EAEC): *E. coli* bám dính kết tập ruột

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC): *E. coli* gây xuất huyết ruột

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC): *E. coli* sinh độc tố ruột

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC): *E. coli* xâm nhập ruột

Diffusely adherent *E. coli* (DAEC): *E. coli* bám dính lan tỏa ở ruột

EPEC gây bệnh bằng bám dính tại chỗ và phá hủy vi nhung mao ruột làm nhung mao ruột ngắn dần. Yếu tố bám dính được mã hóa bởi gen *bfpA*, không phải tất cả các EPEC đều có yếu tố *bfp*. Những chủng EPEC có *bfp* là EPEC điển hình, chủng không có *bfp* là EPEC không điển hình. EPEC truyền yếu tố thụ thể Tir vào màng tế bào chủ. EPEC bám vào màng tế bào chủ thông qua yếu tố intimin được mã hóa bởi gen *eaeA*.

EAEC gây tiêu chảy cả ở người lớn và trẻ em. EAEC gây bệnh bằng cách bám lên bề mặt tế bào biểu mô ruột bằng các yếu tố bám dính được mã hóa bởi các gen *aggA*, *aafA*, *agg3*, *agg4*. Gen *aggR* điều hòa hoạt động của các gen mã hóa yếu tố bám dính. Gen *aap* mã hóa cho yếu tố phân tán, gen *aatA* mã hóa cho kênh vận chuyển các chất, gen *aaiC* mã hóa cho tiết protein. EAEC tiết chất nhày tạo màng sinh học (biofilm) lên bề mặt tế bào biểu mô. EAEC tiết độc tố tác động vào tế bào biểu mô ruột như độc tố EAST1 được mã hóa bởi gen *astA*, độc tố ShET1 mã hóa bởi gen *set1A*.

EHEC có thể gây hội chứng tan huyết, u rê huyết. EHEC bám, xâm nhập, gắn vào biểu mô ruột và gây tổn thương tại chỗ tương tự

như EPEC. EHEC tiết độc tố Stx1 và Stx2 phá hủy nhung mao ruột, mỗi chủng EHEC có Stx1 và/hoặc Stx2.

ETEC gây bệnh bằng cách bám vào tế bào biểu mô ruột và tiết độc tố. Có 2 loại độc tố chính là LT và ST, độc tố LT được mã hóa bởi cụm gen *eltAB* gồm 2 gen là *eltA* và *eltB*. Độc tố ST gồm ST-I (còn gọi STa) được mã hóa bởi gen *estA* và ST-II (STb) được mã hóa bởi gen *estB*. Một số chủng ETEC chỉ có độc tố LT hoặc chỉ có độc tố ST, nhưng có chủng có cả độc tố LT và ST.

EIEC xâm nhập vào trong tế bào biểu mô đại tràng, nhân lên trong tế bào làm tổn thương tế bào, sau đó xâm nhập vào đại thực bào, phá vỡ đại thực bào. Các gen *ial*, *ipaH* mã hóa cho yếu tố xâm nhập của EIEC.

DAEC mới được chú ý đến trong thời gian gần đây, DAEC có yếu tố bám Afa được mã hóa bởi gen *afa*, bao gồm các gen *afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD*, *afaE*, gen *afaBC*.

1.5. Các kỹ thuật xác định *E. coli* gây tiêu chảy

1.5.1. Các kỹ thuật thông thường

1.5.2. Các kỹ thuật sinh học phân tử

1.6. Kỹ thuật PFGE và MLST xác định mối liên quan dịch tễ học phân tử của các chủng *E. coli* gây tiêu chảy trên thế giới và Việt Nam

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 1

Trẻ mắc tiêu chảy đến khám, điều trị tại bệnh viện Nhi Trung ương và bệnh viện đa khoa Ba Vì.

Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 2

Các chủng vi khuẩn EAEC được xác định từ nhóm trẻ dưới 5 tuổi tiêu chảy tại bệnh viện Nhi Trung ương, bệnh viện Đa khoa Ba Vì và nhóm trẻ không mắc tiêu chảy tại huyện Ba Vì và quận Tây Hồ thành

phố Hà Nội có sức khỏe bình thường, được lấy mẫu phân xét nghiệm *E. coli* gây tiêu chảy.

Tiêu chuẩn chọn

- Trẻ dưới 5 tuổi, có địa chỉ cư trú tại Hà Nội với thời gian cư trú từ 3 tháng trở lên

- Trẻ mắc tiêu chảy: trẻ đi ngoài từ 3 lần trở lên trong 24 giờ, phân lỏng hoặc thay đổi tính chất bình thường của phân. Thời gian tiêu chảy là thời gian kể từ ngày đầu tiên trẻ bị tiêu chảy tới ngày thăm khám, trong khoảng thời gian đó có thể ngừng tiêu chảy trong 1 ngày. Không đưa vào nghiên cứu những trẻ đang dùng kháng sinh.

- Trẻ không mắc tiêu chảy: trẻ có sức khỏe bình thường, không mắc tiêu chảy ít nhất 1 tháng tính tới thời điểm lấy mẫu phân.

2.2. Thời gian nghiên cứu

Thời gian thu thập mẫu nghiên cứu từ tháng 1/2010 - 9/2012.

2.3. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang có kết hợp phân tích để xác định tỷ lệ và sự phân bố các loại *E. coli* gây tiêu chảy.

Nghiên cứu mô tả dựa trên dữ liệu phòng thí nghiệm vi sinh và sinh học phân tử về *E. coli* gây tiêu chảy.

2.4. Cỡ mẫu nghiên cứu

- *Cỡ mẫu cho mục tiêu 1:*

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

Trong đó n: cỡ mẫu tối thiểu, Z: hệ số tin cậy, α : độ tin cậy ($\alpha = 95\%$ thì $Z = 1,96$), d: giá trị sai lệch tuyệt đối (chọn $d = 0,05$), p: tỷ lệ có DEC ở trẻ tiêu chảy từ nghiên cứu trước, lấy $p = 0,225$. DE: Hệ số thiết kế, lấy $DE = 1,2$. Tính ra được cỡ mẫu tối thiểu là 347 trẻ mắc tiêu chảy. Trên thực tế chúng tôi đã lấy 360 trẻ mắc tiêu chảy được điều trị tại 2 bệnh viện vào diện nghiên cứu.

- *Cỡ mẫu cho mục tiêu 2:*

Từ phân của 360 trẻ tiêu chảy tại bệnh viện và 386 trẻ không tiêu chảy được chọn từ các lớp mẫu giáo, nhà trẻ xác định được 33 chủng EAEC để xác định đặc điểm sinh học phân tử và mối liên quan của các chủng bằng kỹ thuật PFGE. Lấy ngẫu nhiên 10 chủng EAEC từ 33 chủng EAEC trên (7 chủng từ trẻ có tiêu chảy và 3 chủng từ trẻ không tiêu chảy) để xác định đặc điểm sinh học phân tử và mối liên quan của các chủng bằng kỹ thuật MLST.

2.5. Phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu

2.5.1. Kỹ thuật thu thập mẫu phân của bệnh nhân tiêu chảy

2.5.2. Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập và thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh cho vi khuẩn *E. coli*

Mẫu phân được cấy trên môi trường Mac Conkey, ủ 35⁰C trong 18-24 giờ, xác định tính chất sinh vật hóa học của *E. coli*. Sau khi được xác định là EAEC bằng kỹ thuật PCR được thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh theo phương pháp khoan giấy khuếch tán trên môi trường thạch Muller Hinton với các kháng sinh: ampicillin (AMP) 10 µg, cephalothin (CEP) 30 µg, cefuroxim (CXM) 30 µg, amoxicillin/clavulanic acid (AMC) 20/10 µg, trimethoprim/sulfamethoxazol (SXT) 1,25/23,75 µg, chloramphenicol (CHL) 30 µg, tetracycline (TET) 30µg, nalidixic acid (NAL) 30 µg, ciprofloxacin (CIP) 5 µg.

2.5.3. Kỹ thuật PCR xác định *E. coli* gây tiêu chảy

Bảng 2.2. Các cặp mồi sử dụng xác định *E. coli* gây tiêu chảy

Mồi	Gen đích	Trình tự nucleotid (5'-3')	Cỡ sản phẩm (bp)
bfpA	<i>bfpA</i>	TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT TTTTGTTTTGTTGTATCTTTGTAA	367
eae	<i>eaeA</i>	CACACGAATAAACTGACTAAAATG AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT	376
LT	<i>eltB</i>	TCTCTATGTGCATACGGAGC CCATACTGATTGCCGCAAT	322
ST	<i>estA</i>	GCTAAACCAGTA ^G _A GGTCTTCAAAA CCCGGTACA ^G _A GCAGGATTACAACA	147
VT1	<i>vt1</i>	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130
VT2	<i>vt2</i>	ACCGTTTTTTCAGATTTT ^G _A CACATA TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT	298

- Tiêu chuẩn xác định loại *E. coli* gây tiêu chảy

EPEC có gen *bfpA* và *eaeA*. ETEC có gen *eltB* và/hoặc *estA*.

EHEC có gen *vt1* và/hoặc *vt2* khi có gen *eaeA* chẩn đoán EHEC điển hình. EIEC có gen *ial*. EAEC có gen *pCVD*. DAEC có gen *afaBC*.

2.5.4. Kỹ thuật PCR xác định các gen độc lực của EAEC

Bảng 2.3. Các cặp mồi sử dụng xác định gen độc lực của EAEC

Gen đích	Trình tự mồi (5'-3')	Cỡ sản phẩm (bp)
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254
<i>aggA</i>	TTAGTCTTCTATCTAGGG AAATTAATTCCGGCATGG	457
<i>aafA</i>	TGCGATTGCTACTTTATTAT ATTGACCGTGATTGGCTTCC	242
<i>aap</i>	CTTGGGTATCAGCCTGAATG AACCCATTCGGTTAGAGCAC	310
<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111

2.5.5. Phân tích mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật điện di xung trường PFGE

Chuẩn bị ADN vi khuẩn, cắt ADN vi khuẩn bằng enzyme giới hạn *XbaI*, sản phẩm cắt được điện di so sánh với nhau và so sánh với chủng chuẩn *S. braenderup* H9812 chạy song song làm thang chuẩn. Xác định mức độ tương đồng các chủng vi khuẩn EAEC bằng phần mềm GelCompar II để tạo cây phả hệ.

2.5.6. Phân tích đặc điểm sinh học phân tử bằng kỹ thuật giải trình tự gen nhiều locus MLST

Bảng 2.4. Các trình tự mỗi sử dụng trong kỹ thuật MLST đối với chủng *E. coli*

Gen	Trình tự mỗi (5'-3')	Cỡ sản phẩm (bp)
<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	584
<i>fumc</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC TCCCGGCAGATAAGCTGTGG	709
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	815
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878
<i>mdh</i>	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC CAGG TTCAGAACTCTCTCTGT	799
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	818
<i>recA</i>	CGCATTCGCTTTACCCCTGACC TCGT CGAAATCTACGGACCGGA	734

- Giải trình tự và phân tích trình tự các đoạn nội gen cần xác định của 7 gen bảo tồn: *adk* (536 bp), *fumC* (469 bp), *gyrB* (460 bp), *icd* (518 bp), *mdh* (452 bp), *purA* (478 bp), *recA* (510 bp) dựa phần mềm MLST Bionumeric 6.5.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tỷ lệ, sự phân bố và một số yếu tố liên quan các loại *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ dưới 5 tuổi tại bệnh viện Nhi Trung ương và bệnh viện Đa khoa Ba Vì năm 2010 - 2012

3.1.1. Một số đặc điểm chung của nhóm trẻ tiêu chảy

Trẻ đưa vào nghiên cứu chúng tôi quy ước chia nhóm tuổi như sau:

0 - 12 tháng: 1 tuổi, 13 - 24 tháng: 2 tuổi, 25 - 36 tháng: 3 tuổi.

37 - 48 tháng: 4 tuổi, 49 - 60 tháng: 5 tuổi.

0 - 24 tháng: trẻ dưới 2 tuổi, trên 24 tháng - 60 tháng: trẻ 3 - 5 tuổi.

Với 360 trẻ tiêu chảy đến khám, điều trị tại 2 bệnh viện trên địa bàn Thành phố Hà Nội là bệnh viện Nhi Trung ương và bệnh viện đa khoa Ba Vì thì nhóm dưới 2 tuổi chiếm 79,2%, nhóm trẻ 3 - 5 tuổi chiếm 20,8%. Có 142 trẻ nữ (39,4%) và có 218 trẻ nam (60,6%). Trong 360 trẻ tiêu chảy xác định được 55 chủng DEC chiếm tỷ lệ 15,3%.

3.1.2. Phân bố các nhóm *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ tiêu chảy có DEC

Bảng 3.2. Phân bố DEC ở từng bệnh viện (n=360)

Bệnh viện	Số trẻ tiêu chảy	Số lượng DEC	Đương tính (%)
Nhi Trung ương	159	32	20,1
Đa khoa Ba Vì	201	23	11,4

Kết quả cho thấy tỷ lệ phát hiện DEC tại bệnh viện Nhi Trung ương là 20,1% và bệnh viện Đa khoa Ba Vì là 11,4%.

Bảng 3.3. Tỷ lệ phát hiện các nhóm DEC ở trẻ tiêu chảy (n=360)

Nhóm DEC	Số lượng	Tỷ lệ %
EAEC	24	6,7
EPEC	15	4,2
EHEC	4	1,1
ETEC	3	0,8
EIEC	8	2,2
DAEC	1	0,3

Với 360 trẻ tiêu chảy thì tỷ lệ phát hiện nhóm EAEC ở trẻ tiêu chảy chiếm cao nhất 6,7%, tiếp đến nhóm EPEC 4,2%, EIEC 2,2%, EHEC 1,1%, ETEC 0,8% và DAEC 0,3%. Không có trường hợp nào phát hiện bệnh nhân đồng nhiễm 2 nhóm DEC trở lên.

Bảng 3.4. Phân bố các loại gen xác định DEC (n=55)

Nhóm DEC	Loại gen	Số chủng
EAEC	<i>pCVD</i>	24
EPEC	<i>eaeA</i>	7
	<i>eaeA + bfp</i>	8
EHEC	<i>vt1</i>	0
	<i>vt2</i>	3
	<i>vt1 + vt2</i>	1
ETEC	<i>eltB</i>	2
	<i>estA</i>	0
	<i>eltB + estA</i>	1
EIEC	<i>ial</i>	8
DAEC	<i>afaBC</i>	1

Trong 15 chủng EPEC có 8 chủng xác định được 2 loại gen *eaeA* và *bfpA*, 7 chủng chỉ có gen *eaeA*.

EHEC có 3 chủng chỉ có gen *vt2* và 1 chủng có cả gen *vt1* và *vt2*.

ETEC có 2 chủng chỉ có *eltB* và 1 chủng cả 2 loại gen *eltB* và *estA*.

Bảng 3.6. Phân bố cơ cấu các nhóm DEC theo nhóm tuổi ở trẻ tiêu chảy có DEC (n=55)

Nhóm DEC	Nhóm ≤ 2 tuổi		Nhóm 3 - 5 tuổi		Tổng	
	n	%	n	%	n	%
EAEC	22	51,2	2	16,7	24	43,6
EPEC	9	20,9	6	50,0	15	27,3
EHEC	3	7,0	1	8,3	4	7,3
ETEC	3	7,0	0	0	3	5,5
EIEC	5	11,6	3	25,0	8	14,5
DAEC	1	2,3	0	0	1	1,8
Tổng	43	100	12	100	55	100

Nhóm trẻ dưới 2 tuổi EAEC phát hiện được nhiều nhất 22 chủng (51,2%), tiếp đến là EPEC 9 chủng (20,9%), tỷ lệ ít nhất là DAEC 1 chủng (2,3%). Nhóm trẻ 3 - 5 tuổi xác định được EPEC nhiều nhất 6 chủng chiếm 50%, EIEC có 3 chủng chiếm 25%, EAEC 2 chủng chiếm 16,7%, ETEC và DAEC không phát hiện được trường hợp nào ở nhóm tuổi này.

3.1.3. Một số yếu tố liên quan với tình trạng tiêu chảy có DEC

Bảng 3.11. Mối liên quan giữa số lần tiêu chảy trung bình với tiêu chảy có DEC (n= 360)

Yếu tố liên quan	Có DEC	Không có DEC	p = 0,05
	(n = 55)	(n = 305)	
Trung bình ± SD	7,22± 3,02	6,54 ± 2,2	
(Min - Max)	(3-20)	(3-15)	

Những trẻ có số lần tiêu chảy trung bình là $7,22 \pm 3,02$ có khả năng mang DEC cao hơn so với trẻ có số lần tiêu chảy trung bình là $6,54 \pm 2,2$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$.

Bảng 3.12. So sánh triệu chứng lâm sàng giữa tiêu chảy có DEC và tiêu chảy không có DEC

Triệu chứng lâm sàng	Có DEC (n = 55)	Không có DEC (n = 305)	p
Sốt	26 (47,3%)	86 (28,2%)	p <0,001
Nôn	21 (38,2%)	77 (25,3%)	p <0,05
Mất nước	17 (30,9%)	34 (11,1%)	p <0,001

Kết quả bảng 3.12 cho thấy tỷ lệ trẻ tiêu chảy có triệu chứng lâm sàng sốt, nôn, mất nước ở nhóm trẻ có DEC cao hơn ở nhóm trẻ tiêu chảy không có DEC ở cả 3 triệu chứng lâm sàng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3.13. So sánh tính chất phân giữa tiêu chảy có DEC và tiêu chảy không có DEC

Tính chất phân	Có DEC (n = 55)	Không có DEC (n = 305)	p
Phân nhày hoặc máu hoặc nhày máu	45 (81,8%)	169 (55,4%)	p <0,001

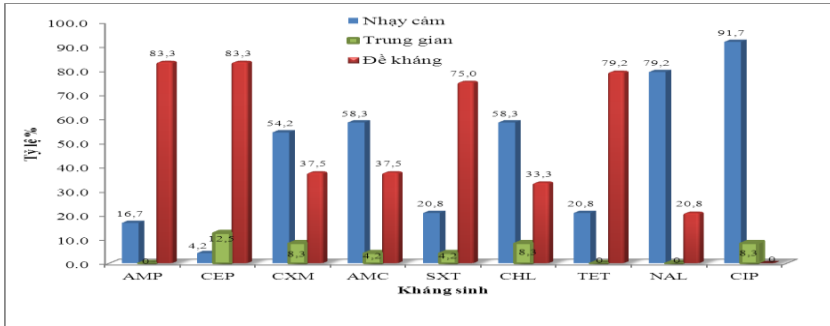
Kết quả cho thấy tỷ lệ trẻ có phân nhày hoặc máu hoặc nhày máu ở nhóm trẻ tiêu chảy có DEC cao hơn ở nhóm trẻ tiêu chảy không có DEC, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

3.2. Một số đặc điểm sinh học phân tử của các chủng EAEC ở trẻ tiêu chảy tại bệnh viện Nhi Trung ương, bệnh viện Đa khoa Ba Vì và trẻ không tiêu chảy tại huyện Ba Vì, quận Tây Hồ - Hà Nội 2010 - 2012

3.2.1. Một số đặc điểm chung của các chủng vi khuẩn EAEC

Kết quả phân tích 33 chủng EAEC xác định được từ trẻ tiêu chảy (24 chủng) và trẻ không tiêu chảy (9 chủng).

3.2.2. Mức độ kháng kháng sinh và phân bố gen độc lực của các chủng EAEC



Biểu đồ 3.11. Mức độ kháng kháng sinh của các chủng EAEC phân lập từ trẻ tiêu chảy (n=24)

Kết quả cho thấy EAEC đã kháng cao với ampicillin 83,3%, trimethoprim/sulfamethoxazol 75,0%, chloramphenicol 33,3%, nalidixic acid 20,8%, không có chủng nào kháng với ciprofloxacin nhưng đã có 8,3% số chủng ở mức trung gian.

EAEC kháng cephalothin, cefuroxim, amoxicillin/clavulanic và tetracyclin tương ứng 83,3%, 37,5%, 37,5% và 79,2%.

Bảng 3.14. Tỷ lệ EAEC kháng số loại kháng sinh (n=33)

Số loại kháng sinh	Số chủng kháng		Tổng số
	Trẻ tiêu chảy (n=24)	Trẻ không tiêu chảy (n= 9)	
2 loại	3	3	6
3 loại	4	3	7
4 loại	4	1	5
5 loại	5	1	6
6 loại	7	1	8
7 loại	1	0	1

Tất cả các chủng EAEC đều kháng từ 2 loại kháng sinh trở lên, 27/33 chủng EAEC (81,8%) kháng 3 loại kháng sinh trở lên.

Bảng 3.15. Tỷ lệ mang các gen độc lực của các chủng EAEC

Loại gen	EAEC ở trẻ tiêu chảy (n=24)		EAEC ở trẻ không tiêu chảy (n=9)	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>aggR</i>	20	83,3	3	33,3
<i>aggA</i>	9	37,5	3	33,3
<i>aafA</i>	1	4,2	3	33,3
<i>aap</i>	21	87,5	2	22,2
<i>astA</i>	11	45,8	2	22,2

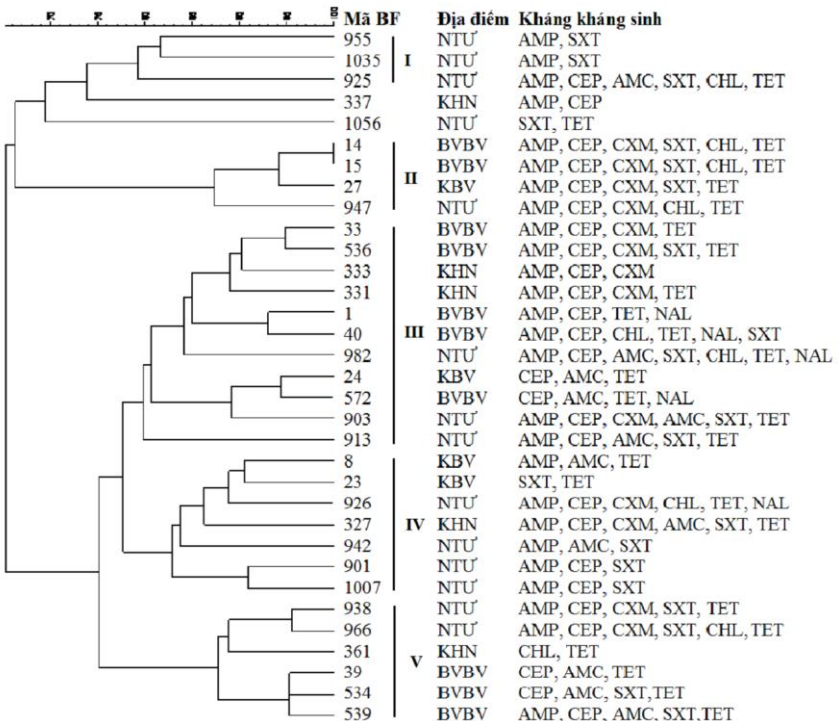
Kết quả bảng trên cho thấy ở trẻ tiêu chảy 87,5% số chủng EAEC có gen *aap*, 83,3% có gen *aggR*, 45,8% có gen *astA*, 37,5% có gen *aggA* và chỉ có 4,2% có gen *aafA*. Trẻ không tiêu chảy 33,3% số chủng EAEC có *aggR*, *aggA* và *aafA* 22,2% số chủng có *aap* và *astA*.

Bảng 3.16. Phân bố các gen độc lực của các chủng EAEC ở trẻ tiêu chảy (n=24) và trẻ không tiêu chảy (n=9)

Số loại gen	Trẻ tiêu chảy n (%)	Trẻ không tiêu chảy n (%)
EAEC có 1 gen		
<i>aggR</i>	2 (8,3)	
<i>aggA</i>		2 (22,2)
<i>aafA</i>		3 (33,3)
EAEC có 2 gen		
<i>aggR, aggA</i>		1 (11,1)
<i>aggR, aafA</i>		1 (11,1)
<i>aggR, aap</i>	2 (8,3)	
<i>aggR, astA</i>	1 (4,2)	
<i>aggA, aap</i>	2 (8,3)	
<i>aafA, aap</i>	1 (4,2)	
<i>aap, astA</i>		1 (11,1)
EAEC có 3 gen		
<i>aggR, aggA, aap</i>	6 (25,0)	
<i>aggR, aap, astA</i>	9 (37,5)	1 (11,1)
EAEC có 4 gen		
<i>aggR, aggA, aap, astA</i>	1 (4,2)	

Trẻ tiêu chảy có 8,3% số chủng EAEC mang 1 loại gen, 25,0% số chủng mang 2 loại gen, 62,5% số chủng EAEC mang 3 loại gen và 4,2% số chủng mang 4 loại gen. Trẻ không tiêu chảy có 55,5% số chủng EAEC mang 1 loại gen, 33,3% số chủng mang 2 loại gen, 11,1% số chủng EAEC mang 3 loại gen.

3.2.3. Một số đặc điểm sinh học phân tử của các chủng vi khuẩn EAEC



Hình 3.4. Hình ảnh cây phả hệ PFGE của 33 chủng EAEC phân lập từ phân trẻ tiêu chảy và trẻ không tiêu chảy (n=33)

Khi phân tích bằng kỹ thuật PFGE 33 chủng EAEC lấy ngưỡng tương đồng về kiểu gen là 80% trở lên, có 31/33 chủng chia

thành 5 nhóm kiểu gen tương đồng từ 80% trở lên và có 2 chủng là 337 và 1056 không xếp vào nhóm tương đồng trên.

Nhóm I gồm 3 chủng có mức tương đồng 80%, chung kiểu đề kháng AMP, SXT. Nhóm II gồm 4 chủng có mức tương đồng 87%, trong đó có 2 chủng 14 và 15 tương đồng 100%, chung kiểu đề kháng AMP, CEP, CXM, TET. Nhóm III gồm 11 chủng tương đồng 80%, chung kiểu đề kháng CEP. Nhóm IV gồm 7 chủng tương đồng 83%. Nhóm V gồm 6 chủng tương đồng 87%, chung kiểu đề kháng TET.

Bảng 3.17. Phân tích kết quả MLST của các chủng EAEC

Chủng EAEC	Gen							Kiểu ST
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
Chủng 33	10	11	4	8	8	8	2	10
Chủng 536	10	11	4	8	8	8	2	10
Chủng 327	10	11	4	8	8	8	2	10
Chủng 903	10	11	4	8	8	8	2	10
Chủng 938	4	26	2	25	5	5	19	38
Chủng 966	4	26	2	25	5	5	19	38
Chủng 23	10	11	4	8	8	18	2	215
Chủng 572	18	22	20	23	5	15	4	414
Chủng 333	101	88	97	108	26	79	2	457
Chủng 1056	6	6	5	136	9	7	7	678

Kết quả MLST cho thấy 10 chủng EAEC thuộc 6 kiểu trình tự ST đã xác định trên thế giới, trong đó 4 chủng thuộc ST10, 2 chủng ST38, 1 chủng ST215, 1 chủng ST414, 1 chủng ST457 và 1 chủng ST678.

Bảng 3.20. So sánh kết quả PFGE và MLST của 10 chủng EAEC

Chủng	Nhóm PFGE	ST-MLST	Địa chỉ cư trú	Thời gian
Chủng 33	Nhóm III	10	Tân Hồng - Ba Vì	4/2011
Chủng 536	Nhóm III	10	Chu Minh - Ba Vì	5/2011
Chủng 327	Nhóm IV	10	Yên Phụ - Tây Hồ	1/2010
Chủng 903	Nhóm III	10	Mai Đình - Sóc Sơn	10/2011
Chủng 938	Nhóm V	38	Nguyễn Khoái - Thanh Trì	11/2011
Chủng 966	Nhóm V	38	Tiến Thịnh - Mê Linh	3/2012
Chủng 23	Nhóm IV	215	Chu Minh - Ba Vì	12/2010
Chủng 572	Nhóm III	414	Cam Thượng - Ba Vì	2/2010
Chủng 333	Nhóm III	457	Âu Cơ - Tây Hồ	2/2010
Chủng 1056	Không thuộc 5 nhóm	678	Phù Lưu - Ứng Hòa	9/2012

Bảng trên cho thấy: 10 chủng EAEC phân thành 3 nhóm kiểu gen (nhóm III, IV, V) có mức tương đồng 80% trở lên và 1 chủng không được xếp vào các nhóm tương đồng trên 80%. Các chủng có cùng nhóm kiểu gen đều xác định được từ các trẻ có địa chỉ cư trú khác nhau, ở các thời điểm khác nhau.

10 chủng EAEC khi thực hiện kỹ thuật MLST chia thành 6 kiểu trình tự ST (10, 38, 215, 414, 457, 678). Các chủng có kiểu trình tự như nhau được xác định từ các trẻ có địa chỉ cư trú khác nhau, ở các thời điểm khác nhau.

Chương 4 BÀN LUẬN

4.1. Tỷ lệ, sự phân bố và một số yếu tố liên quan các loại *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ dưới 5 tuổi tại bệnh viện Nhi Trung ương và bệnh viện Đa khoa Ba Vì năm 2010 - 2012

4.1.1. Đặc điểm chung của nhóm trẻ tiêu chảy

Tỷ lệ phát hiện DEC tại 2 bệnh viện là 15,3%, tỷ lệ này thấp hơn nghiên cứu tại Ấn Độ năm 2003 - 2006 là 52%, I rắc năm 2009 là 38%, nhưng cao hơn nghiên cứu tại Libya năm 2000-2001 chiếm 8,6%, Trung Quốc năm 2009 - 2013 chiếm 5%. Một số nghiên cứu chỉ ra có sự đồng nhiễm giữa các loại DEC trong mẫu nghiên cứu, tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi không phát hiện trường hợp nào đồng nhiễm 2 loại DEC, kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu tại Ấn Độ ở 5 bệnh viện với 1826 bệnh nhân nhưng không phát hiện có sự đồng nhiễm các gen của DEC, nghiên cứu tại Trung Quốc với 2318 trẻ tiêu chảy có 7,6% là DEC nhưng cũng không phát hiện trẻ nào có đồng nhiễm 2 loại DEC.

4.1.2. Phân bố các nhóm *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ tiêu chảy có DEC

EAEC là tác nhân tiêu chảy gặp ngày càng phổ biến ở các nước đang phát triển, chiếm tỷ lệ cao nhất trong các loại DEC, EPEC là căn nguyên thường gặp thứ 2 của DEC. Trong nghiên cứu này EAEC chiếm cao nhất 6,7%, EPEC 4,2%. Các nhóm EIEC, EHEC, ETEC, EIEC, DAEC gặp tỷ lệ không cao tương ứng 2,2%, 1,1%, 0,8%, 0,3%.

4.1.3. Một số yếu tố liên quan với tình trạng tiêu chảy có DEC

Trẻ tiêu chảy kèm sốt, nôn, mất nước làm tình trạng tiêu chảy của trẻ nặng hơn, trong nghiên cứu tỷ lệ trẻ tiêu chảy có sốt, nôn, mất nước có DEC cao hơn ở trẻ tiêu chảy không có DEC có ý nghĩa thống kê. Trẻ tiêu chảy có DEC trung bình số lần tiêu chảy là $7,22 \pm$

3,02 lần/ngày, trẻ không có DEC trung bình $6,54 \pm 2,2$ lần, kết quả cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$. Với 6 loại DEC gây tiêu chảy thì EAEC, EPEC, EHEC, EIEC, DEAC đều gây tổn thương biểu mô đường ruột do vậy phân có thể có máu, nhày hoặc nhày máu. Với 55 trẻ tiêu chảy có DEC thì trẻ tiêu chảy phân có nhày hoặc máu hoặc nhày máu chiếm 81,8% cao hơn ở trẻ tiêu chảy không có DEC chiếm 55,4%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

4.2. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng EAEC ở trẻ tiêu chảy tại bệnh viện Nhi Trung ương, bệnh viện Đa khoa Ba Vì và trẻ không tiêu chảy tại huyện Ba Vì, quận Tây Hồ - Hà Nội 2010 -2012.

4.2.1. Một số đặc điểm chung của các chủng vi khuẩn EAEC

Với 24 chủng EAEC xác định được từ 360 trẻ tiêu chảy (chiếm 6,7%) và 9 chủng EAEC xác định được từ 386 trẻ không tiêu chảy (chiếm 2,3%), hầu hết các chủng này đều xác định ở trẻ dưới 2 tuổi chiếm 84,8% và ở trẻ nam chiếm 66,7% cao hơn trẻ nữ 33,3%.

4.2.2. Mức độ kháng kháng sinh và phân bố gen độc lực của các chủng EAEC

Các chủng EAEC phân lập từ trẻ tiêu chảy được thử nghiệm với 9 loại kháng sinh, EAEC đề kháng cao với các kháng sinh thường dùng được khuyến cáo để điều trị tiêu chảy như ampicillin là 83,3%, trimethoprim/sulfamethoxazol 75%. Tỷ lệ *E. coli* kháng 2 kháng sinh này cũng rất cao trong các nghiên cứu Nguyễn Vũ Trung (86,4% và 88,3%), Peru (85% và 79%). Tại Việt Nam ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazol được dùng phổ biến, dễ dàng mua được trên thị trường không cần đơn của bác sĩ do vậy đây có thể là lý do mà tỷ lệ kháng các kháng sinh này rất cao. Kháng sinh nalidixic acid tác dụng tốt với trực khuẩn Gram âm ở đường tiêu hóa

trong đó có EAEC, nhưng không được khuyến cáo rộng rãi ở trẻ em. Trong nghiên cứu EAEC kháng với nalidixic acid 20,8%, tương tự tỷ lệ kháng của EAEC ở các nghiên cứu trước tại Việt Nam.

100% số chủng EAEC từ trẻ tiêu chảy và không tiêu chảy kháng từ 2 loại kháng sinh trở lên, 81,8% kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên.

Sự kết hợp các gen độc lực làm tăng độc tính của EAEC trong tiêu chảy, trẻ tiêu chảy có 62,5% số chủng EAEC mang 3 loại gen và 4,2% số chủng mang 4 loại gen. Trẻ không tiêu chảy có 33,3% số chủng mang 2 loại gen, 11,1% số chủng EAEC mang 3 loại gen, không có chủng nào mang 4 loại gen.

4.2.3. Một số đặc điểm sinh học phân tử của các chủng EAEC

Với 33 chủng EAEC lấy ngưỡng tương đồng về kiểu gen 80% để phân tích kiểu gen PFGE và kháng kháng sinh cho thấy không phải nhóm nào cũng tìm được kiểu hình kháng kháng sinh chung. Khi phân tích ở mức tương đồng cao hơn như 90%, thì các chủng có nhiều đặc tính kháng kháng sinh chung hơn như chủng 14 và 15, 33 và 536, 24 và 572, 938 và 966, 39, 534 và 539. Khi nghiên cứu về *E. coli* gây nhiễm trùng tiết niệu Karen Ejimaes cũng thấy mặc dù một số chủng có mối tương đồng 85% về kiểu gen PFGE nhưng cũng không tìm thấy mối liên quan của các trường hợp nhiễm trùng.

Phân tích kiểu gen của 10 chủng EAEC đã xác định được 6 kiểu trình tự là ST10, ST38, ST215, ST414, ST457 và ST678. Tỷ lệ ST10 chiếm cao nhất 40% và tiếp đến ST38 chiếm 20%. Cả 6 kiểu trình tự này đều xác định được ở một số nước trên thế giới, trong đó ST 10 và ST 38 cũng chiếm phổ biến nhất. Với 9 loại kháng sinh thử nghiệm, kết quả phân tích cho thấy các chủng ST10 đều kháng ampicillin, cephalothin, cefuroxim, tetracyclin, đặc biệt chủng 327 và 903 đều cùng kháng 6 loại kháng sinh. Các chủng ST38 kháng với

ampicillin, cephalothin, cefuroxim, trimethoprim/sulfamethoxazol và tetracyclin. Các chủng EAEC có kiểu ST giống nhau thì có kiểu kháng kháng sinh gần giống nhau. Các chủng 23, 572, 333 và 1056 có các kiểu ST khác nhau có kiểu kháng kháng sinh khác nhau.

Khi so sánh mối liên quan dịch tễ học phân tử của các chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật PFGE và MLST được một số nghiên cứu đề cập tới với nhiều nhận định khác nhau, tác giả Jennifer và cộng sự nhận định mặc dù MLST là một kỹ thuật mới nhưng khả năng phân biệt các chủng *Pseudomonas aeruginosa* thấp hơn so PFGE, tương tự tác giả Noller và cộng sự cũng đánh giá *Escherichia coli* O157: H7 sử dụng kỹ thuật MLST khả năng phân biệt cũng thấp hơn so kỹ thuật PFGE. Các nghiên cứu về *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* và *S. aureus* lại cho rằng MLST có độ phân biệt cao hơn so PFGE. Tuy nhiên cũng có nghiên cứu chỉ ra rằng không có sự khác biệt rõ ràng giữa 2 phương pháp

KẾT LUẬN

1. Tỷ lệ, sự phân bố và một số yếu tố liên quan của các loại *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ dưới 5 tuổi tại bệnh viện Nhi Trung ương và bệnh viện Đa khoa Ba Vì năm 2010 - 2012

- Tỷ lệ *Escherichia coli* gây tiêu chảy ở trẻ dưới 5 tuổi mắc tiêu chảy tại 2 bệnh viện nghiên cứu là 15,3%. Bệnh viện Nhi Trung ương có tỷ lệ 20,1%, bệnh viện Đa khoa Ba Vì là 11,4%.

- Tỷ lệ các nhóm *E. coli* gây tiêu chảy: EAEC chiếm cao nhất 6,7%, tiếp đến EPEC 4,2%, EIEC 2,2%, EHEC 1,1%, ETEC 0,8% và DAEC 0,3%.

- Số lần tiêu chảy/ngày của trẻ tiêu chảy có DEC (+) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với trẻ tiêu chảy không có DEC.

- Trẻ tiêu chảy có DEC (+) có tỷ lệ xuất hiện các triệu chứng sốt, nôn, mất nước và phân nhày/máu/nhày máu cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm trẻ tiêu chảy không có DEC.

- Không thấy mối liên quan giữa nhóm tuổi, giới và loại tiêu chảy với tình trạng tiêu chảy có DEC (+) ở trẻ nghiên cứu.

2. Một số đặc điểm sinh học phân tử của các chủng EAEC ở trẻ tiêu chảy tại bệnh viện Nhi Trung ương, bệnh viện Đa khoa Ba Vì và trẻ không tiêu chảy tại huyện Ba Vì, quận Tây Hồ - Hà Nội 2010 -2012

- Tỷ lệ EAEC phân lập từ trẻ tiêu chảy kháng một số loại kháng sinh thường sử dụng điều trị tiêu chảy: ampicillin 83,3%, trimethoprim/sulfamethoxazol 75%, nalidixic acid 20,8%; chưa có chủng nào kháng với ciprofloxacin. Có 81,8% số chủng EAEC kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên.

- Có 66,7% số chủng EAEC ở trẻ tiêu chảy mang 3 loại gen độc lực trở lên, trong đó tỷ lệ mang gen *aap* là cao nhất 87,5%, thấp nhất là gen *aafA* 4,2%.

- Có 31/33 chủng EAEC với mức tương đồng kiểu gen 80% trở lên, trong đó có 2 chủng tương đồng 100%.

- Phân tích 10 chủng EAEC xác định được 6 kiểu trình tự ST đã xác định trên thế giới, 4/10 chủng EAEC thuộc ST10 và 2/10 chủng thuộc ST38 là các ST cũng phổ biến trên thế giới.

- Kỹ thuật MLST có khả năng phân biệt các chủng EAEC tốt hơn so PFGE.