

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN THỊ KHÁNH LY

**SÀNG LỌC VI KHUẨN SINH BETA – LACTAMASE
PHỔ RỘNG PHÂN LẬP TẠI BỆNH VIỆN ĐA KHOA
TRUNG ƯƠNG THÁI NGUYÊN BẰNG KỸ THUẬT
MULTIPLEX – PCR**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh

Mã số : 60 42 0201

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Đắc Trung

Thái Nguyên, năm 2013

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên cho tôi gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tới Tiến sĩ Nguyễn Đắc Trung – Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y – Dược Thái Nguyên, đã tận tình hướng dẫn giúp đỡ tôi hoàn thành tốt luận văn này.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các bác sĩ, kỹ thuật viên khoa Vi sinh – Bệnh viện Đa khoa Trung ương Thái Nguyên, tới các cán bộ nhân viên của Bộ môn Vi sinh – Đại học Y – Dược Thái Nguyên đã hết sức tạo điều kiện giúp đỡ, cho tôi trong quá trình làm luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới Ban Giám hiệu, Phòng đào tạo, các thầy cô giáo, cán bộ giảng dạy của Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên đã tận tình giảng dạy trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới khoa Xét nghiệm – Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Thái Nguyên, nơi tôi đang công tác đã tạo điều kiện về thời gian cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu.

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2013

DANH MỤC BẢNG

BẢNG	TÊN BẢNG BIỂU	Trang
2.1	Các dung dịch và đệm sử dụng trong thí nghiệm	21
2.2	Các thiết bị được sử dụng trong thí nghiệm	22
2.3	Các giai đoạn trong quá trình nghiên cứu	28
2.4	Trình tự các cặp mồi được thiết kế để khuếch đại gen	29
2.5	Thành phần các phản ứng PCR đơn mồi	30
2.6	Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với cặp mồi gene <i>bla</i> _{TEM}	30
2.7	Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với cặp mồi gene <i>bla</i> _{CTX-M}	31
2.8	Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với cặp mồi gene <i>bla</i> _{SHV}	31
2.9	Thành phần phản ứng multiplex - PCR	32
2.10	Chu trình nhiệt của phản ứng multiplex - PCR	33
3.1	Cơ cấu các loại vi khuẩn Gram âm gây bệnh phân lập được	34
3.2	Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> (43 chủng)	35
3.3	Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
3.4	Kiểu cách kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> và <i>K. pneumoniae</i>	39
3.5	Tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBL	41
3.6	Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> ESBL	42
3.7	Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng <i>K. pneumoniae</i> ESBL(+)	43
3.8	Kiểu gene ESBL <i>bla</i> được tìm thấy ở các chủng vi khuẩn	52

DANH MỤC HÌNH

HÌNH	TÊN HÌNH ẢNH	Trang
1.1	Phương pháp đĩa đôi xác định vi khuẩn sinh ESBL	17
1.2	E-test xác định vi khuẩn sinh ESBL	18
2	Sơ đồ các bước được thực hiện trong quá trình nghiên cứu	27
3.1	Tỷ lệ kháng kháng sinh của <i>E. coli</i>	36
3.2	Tỷ lệ kháng kháng sinh của <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
3.3	Kiểu cách kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> và <i>K. Pneumoniae</i>	39
3.4	Kết quả Double-disk test ở chủng vi khuẩn ESBL(+)	41
3.5	Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> ESBL(+)	42
3.6	Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng <i>K. pneumoniae</i> ESBL(+)	44
3.7	Kết quả khuếch đại gene <i>bla</i> _{TEM} bằng PCR đơn gene	46
3.8	Kết quả khuếch đại gene <i>bla</i> _{CTX-M} bằng PCR đơn gene	47
3.9	Kết quả khuếch đại gene <i>bla</i> _{SHV} bằng PCR đơn gene	49
3.10	Kết quả khuếch đại gene <i>bla</i> _{TEM} và <i>bla</i> _{CTX-M} bằng multiplex-PCR	51

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU	
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
1.1. Kháng sinh và cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn.....	3
1.1.1. Định nghĩa	3
1.1.2. Phân loại phổ tác dụng và chống chỉ định của thuốc kháng sinh	3
1.1.3. Cơ chế tác dụng của kháng sinh.....	6
1.1.4. Cơ chế kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn.....	7
1.2. Enzyme β – lactamase hoạt phổ rộng.....	9
1.2.1. Lịch sử phát hiện enzyme β - lactamase hoạt phổ rộng.....	9
1.2.2. Định nghĩa ESBL	10
1.3. Tình hình nghiên cứu khả năng sinh ESBL ở vi khuẩn gây bệnh	10
1.3.1. Trên thế giới	10
1.3.2. Tại Việt Nam.....	12
1.4. Các gen mã hóa ESBL.....	13
1.4.1. TEM	13
1.4.2. SHV	13
1.4.3. CTX – M.....	14
1.4.4. OXA	15
1.5. Một số phương pháp phát hiện vi khuẩn sinh ESBL.....	16
1.5.1. Phương pháp đĩa đôi	17

1.5.2. Phương pháp đĩa kết hợp (Double disk test)	17
1.5.3. Phương pháp E-test.....	18
1.5.4. Vitek ESBL card	18
1.5.5. Hệ thống tự động BD Phoenix (Becton Dickinson Biosciences)	18
1.5.6. Các phương pháp sinh học phân tử.....	19

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu	21
2.1.1. Các chủng vi khuẩn	21
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất	21
2.1.3. Môi trường nuôi cấy, phân lập vi khuẩn	23
2.1.4. Vật liệu và môi trường xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với.....	23
2.2. Địa điểm nghiên cứu	23
2.3. Phương pháp nghiên cứu	23
2.3.1. Phân lập, định danh chủng vi khuẩn Gram âm	23
2.3.2. Kỹ thuật xác định độ nhạy cảm với kháng sinh	24
2.3.3. Kỹ thuật xác định vi khuẩn sinh ESBL	25
2.3.4. Sàng lọc vi khuẩn Gram âm sinh ESBL bằng kỹ thuật multiplex-PCR	26
2.4. Xử lý số liệu	33

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ và kiểu cách kháng kháng sinh của vi khuẩn Gram âm gây bệnh phân lập được.....	34
3.2. Tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBL.....	40
3.3. Tỷ lệ và mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn Gram âm (<i>E. coli</i> và <i>Klebsiella pneumoniae</i>) sinh ESBL phân lập được.....	42
3.3. Khuếch đại gene ESBL ở <i>E. coli</i> và <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
3.3.1. Kết quả khuếch đại gene ESBL bằng kỹ thuật PCR.....	45
3.3.1.1. Gene <i>bla</i> _{TEM}	46

3.3.1.2. Gene <i>bla</i> _{CTX-M}	47
3.3.1.3. Gene <i>bla</i> _{SHV}	48
3.3.2. Kết quả khuếch đại gene ESBL bằng kỹ thuật multiplex – PCR.....	50
KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ	
KẾT LUẬN.....	54
KHUYẾN NGHỊ.....	55
TÀI LIỆU THAM KHẢO	56
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AMC	Amoxicillin/ Acid clavuanate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
FEP	Cefepime
CTX	Cefotaxime
CAZ	Ceftazidime
CRO	Ceftriaxone
CXM	Cefuroxime
CIP	Ciprofloxacin
dNPTs	Deoxyribonucleotide Triphosphate
DO	Doxycyline
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-spectrum beta lactamase
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MEM	Meropenem
MPA	Meat – Peptone – Agar
OFX	Ofloxacin
PABA	Para - aminobenzoic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris – Acetate - EDTA
Bp	Base pairs
Taq – DNA polymerase	Themus aquaticus DNA polymerase
W/v	Weight/volume
<i>Bla</i>	β - lactamase

MỞ ĐẦU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc phát minh ra kháng sinh năm 1928 đã làm tăng hiệu quả xử lý các ổ nhiễm trùng. Nhờ đó nhiều căn bệnh được giải quyết dựa vào việc điều trị bằng những phác đồ kháng sinh. Tuy nhiên việc sử dụng kháng sinh tràn lan trong nhiều thập kỷ qua dẫn đến xuất hiện nhiều chủng vi khuẩn kháng kháng sinh. Nhiều bệnh dịch nhiễm trùng kháng thuốc đang nổi lên và kháng sinh dần mất hiệu lực trong điều trị. Đây là mối lo chung của ngành y tế và của toàn xã hội.

Việc giới thiệu các kháng sinh cephalosporin thế hệ thứ ba vào thực hành điều trị lâm sàng các nhiễm khuẩn trong đầu những năm 1980 đã được dự báo như là một bước đột phá trong cuộc chiến chống lại các vi khuẩn gây bệnh sinh β -lactamase. ESBL là các β -lactamase có khả năng tác động lên các phân tử penicillin và các cephalosporin thế hệ 1, thế hệ 2, thế hệ 3 và các aztreonam (trừ kháng sinh cefamycin và carbapenem) do chúng có khả năng ly giải các kháng sinh này nhưng chúng lại bị ức chế bởi các chất ức chế β -lactamase như acid clavulanic [1, 18]. Nhiều gene mã hóa ESBL nằm trên các phân tử plasmid lớn. Các plasmid đã kháng thuốc này đều được tìm thấy ở các vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae*, trong đó hay gặp nhất là *E. coli* và *Klebsiella* spp. [2, 3, 4, 17, 20, 21, 23]. Nhiễm trùng do các chủng vi khuẩn sinh β -lactamase phổ rộng dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ thất bại trong điều trị bằng kháng sinh, trong đó làm tăng cao tỷ lệ tử vong đặc biệt ở những trường hợp nhiễm khuẩn huyết do vi khuẩn sinh ESBL. Khi các chủng vi khuẩn sinh ESBL cũng đồng nghĩa với việc chúng kháng lại rất nhiều loại kháng sinh, đặc biệt là các kháng sinh nhóm cephalosporin. Bệnh viện Đa khoa Trung ương Thái Nguyên là bệnh viện hạng I trực thuộc Bộ Y tế, được thành lập từ năm 1951, có nhiệm vụ khám chữa bệnh cho nhân dân các dân tộc miền núi vùng Đông bắc Việt Nam. Bệnh viện đóng trên địa bàn trung tâm của tỉnh Thái Nguyên có trách nhiệm phục vụ trực tiếp

cho người dân của tỉnh. Lưu lượng bệnh nhân đến khám và điều trị tại bệnh viện ngày một tăng. Nhiều nghiên cứu về cơ cấu vi khuẩn và mức độ kháng kháng sinh của các vi khuẩn phân lập tại bệnh viện cũng đã được thực hiện và công bố trên các tạp chí trong nước. Tuy nhiên, vẫn chưa có một nghiên cứu nào điều tra về vi khuẩn sinh β -lactamase phổ rộng được thực hiện tại bệnh viện. Đó là lý do chúng tôi chọn tên đề tài “ **Sàng lọc vi khuẩn sinh beta – lactamase phổ rộng phân lập tại bệnh viện Đa khoa trung ương Thái Nguyên bằng kỹ thuật multiplex - PCR**”.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Xác định tỷ lệ và kiểu cách kháng kháng sinh của một số vi khuẩn Gram âm gây bệnh phân lập tại BVĐKTU Thái Nguyên.
- Xác định tỷ lệ và mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn Gram âm sinh ESBL phân lập tại BVĐKTU Thái Nguyên.
- Phát hiện một số gene ESBL ở các chủng vi khuẩn phân lập bằng kỹ thuật multiplex - PCR.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Thu thập bệnh phẩm từ các mẫu bệnh hô hấp, sinh dục và các bệnh phẩm khác.
- Nuôi cấy, phân lập và xác định vi khuẩn.
- Thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn.
- Sàng lọc chủng vi khuẩn sinh ESBL bằng kỹ thuật khoanh giấy đôi (double - dist test).
- Sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện gene sinh ESBL (SHV, CTX và TEM)