

Tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL trên người khỏe mạnh tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam

Phạm Thị Thanh Hương¹, Vũ Thanh Phương¹, Vũ Anh Thư¹, Nguyễn Quang Huy¹,
Phạm Duy Thái², Trần Huy Hoàng^{2*}

¹Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Ngày nhận bài 8/3/2019; ngày chuyển phản biện 11/3/2019; ngày nhận phản biện 8/4/2019; ngày chấp nhận đăng 15/4/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu mô tả tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL kháng kháng sinh (KKS) nhóm betalactam phổ rộng phân lập được trên mẫu phân người khỏe mạnh tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam năm 2018. 94 mẫu cấy trên môi trường MacConkey agar có kháng sinh ceftazidime 2 µg/ml được sử dụng để tiến hành phân tích khả năng sinh trưởng của vi khuẩn kháng thuốc và tỷ lệ vi khuẩn mang gen ESBL. Kết quả cho thấy: i) tình trạng vi khuẩn phân lập từ phân người khỏe mạnh kháng thuốc là rất cao: 93/94 (99%), đồng thời mức độ KKS của vi khuẩn phân lập được cũng khác nhau và chia ra làm bốn loại; ii) tỷ lệ vi khuẩn mang gen KKS nhóm ESBL cao: cao nhất là TEM (85,1%), tiếp đến là CTX-M (71,3%) và thấp nhất là SHV (5,3%). Điều này cho thấy tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL KKS trong cộng đồng ở Trảng An, Bình Lục, Hà Nam rất nghiêm trọng và cần được giám sát chặt chẽ. Nghiên cứu cũng chứng tỏ nguy cơ KKS tiềm ẩn ngay trong các hộ gia đình khỏe mạnh ở cộng đồng. Qua đó chỉ ra rằng, việc theo dõi tình trạng KKS trong cộng đồng tại Hà Nam cũng như tại các địa phương khác là vô cùng cần thiết nhằm bảo vệ sức khỏe con người.

Từ khóa: CTX-M, ESBL, SHV, TEM.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Hiện nay, KKS đang là một trong những vấn đề được quan tâm hàng đầu trên thế giới. Tình trạng vi khuẩn KKS đã trở thành vấn đề nghiêm trọng đối với sức khỏe con người và với ngành y tế trên toàn cầu. Ngày càng nhiều bệnh lây nhiễm đang trở nên khó chữa, thậm chí vô phương cứu chữa, dẫn đến tỷ lệ tử vong cũng ngày càng tăng. Theo các báo cáo, hàng năm có hơn nửa triệu người chết do các bệnh truyền nhiễm có nguyên nhân là các chủng vi khuẩn KKS [1, 2]. Theo “Review on Antimicrobial Resistance” của Jim O’Neill và cộng sự xuất bản vào ngày 14/5/2015¹, có 2 lý do chính khiến KKS đang dần trở thành mối nguy với tình hình y tế cộng đồng trên thế giới. Thứ nhất, quá trình nghiên cứu phát triển thuốc, đặc biệt là thuốc kháng sinh, đang có dấu hiệu chậm lại. Thứ hai, việc sử dụng thuốc kháng sinh nói chung đang có dấu hiệu gia tăng trong vài thập kỷ gần đây. Chính việc sử dụng nhiều loại thuốc kháng sinh đặc hiệu với liều lượng cao để điều trị các bệnh do vi

khẩn gây ra đã tạo điều kiện cho chúng nâng cao khả năng kháng thuốc. Ở nhiều nước, kháng sinh có thể được mua dễ dàng mà không cần có đơn thuốc, dẫn đến việc sử dụng thuốc bừa bãi, tràn lan [3, 4]. Hơn nữa, việc sử dụng thuốc kháng sinh trên diện rộng trong nông nghiệp cũng như việc bác sĩ kê sai đơn thuốc cũng khiến tình hình KKS đang trên đà gia tăng.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn đường ruột sinh ESBL khá nhiều, tuy nhiên chỉ tập trung chủ yếu ở các cơ sở điều trị trên các nhóm bệnh nhân mà chưa có nhiều nghiên cứu tại cộng đồng trên nhóm người lành khỏe mạnh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định đặc điểm KKS của vi khuẩn sinh ESBL và tỷ lệ mang gen mã hóa ESBL phân lập được trên người lành khỏe mạnh tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên nhóm người lành khỏe mạnh đang sinh sống tại xã Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam trong năm 2018.

¹https://amr-review.org/sites/default/files/SECURING%20NEW%20DRUGS%20FOR%20FUTURE%20GENERATIONS%20FINAL%20WEB_0.pdf

*Tác giả liên hệ: Email: thh@nthe.org.vn

Prevalence of ESBL-producing bacteria on healthy people in Trang An commune, Binh Luc district, Ha Nam province

Thi Thanh Huong Pham¹, Thanh Phuong Vu¹,
Anh Thu Vu¹, Quang Huy Nguyen¹, Duy Thai Pham²,
Huy Hoang Tran^{2*}

¹University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy
of Science and Technology

²National Institute of Hygiene and Epidemiology

Received 8 March 2019; accepted 15 April 2019

Abstract:

The cross-sectional study aimed to describe the status of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing bacteria isolated from stool samples of healthy people in Trang An commune, Binh Luc district, Ha Nam province in 2018. A total of 94 samples were cultured on MacConkey agar containing 2 µg/ml ceftazidime for evaluating the growth of drug-resistant strains and the rate of bacteria carrying ESBL-encoding genes. The results showed that: (1) the proportion of ESBL-producing bacteria were found very high in the participants (99%); nevertheless, the levels of antibiotic resistance were associated with the rate of bacterial growth; (2) the TEM was the most prevalent ESBL-encoding gene (85.1%), followed by CTX-M (71.3%) and SHV (5.3%). These results exhibited that the status of ESBL-producing bacteria was very serious in the Trang An population. Therefore, it is essential to monitor the antibiotic resistance in this region as well as other regions for the long-term development strategy to prevent the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria.

Keywords: CTX-M, ESBL, SHV, TEM.

Classification number: 3.3

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang và phân tích phòng thí nghiệm.

Cỡ mẫu: 94 mẫu phân thu thập từ người khỏe mạnh tại xã Tràng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.

Tiêu chuẩn lựa chọn thành viên tham gia nghiên cứu: là người dân khỏe mạnh, đang sinh sống tại các hộ gia đình và tự nguyện tham gia nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ là người không lấy được mẫu phân hoặc mắc phải các bệnh mạn tính.

Các kỹ thuật xét nghiệm

- Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường chọn lọc khả năng sinh ESBL: đối với từng thành viên được chọn vào nghiên cứu sẽ thu thập mẫu phân để làm xét nghiệm. Mỗi người sẽ lấy 5 g phân tại thời điểm điều tra. Các mẫu phân được bảo quản và vận chuyển theo thường quy về Phòng thí nghiệm KKS của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương trong ngày. Mẫu phân được cấy trực tiếp lên môi trường MacConkey có bổ sung ceftazidime (2 µg/ml) và ủ ở 37°C qua đêm. Các đĩa có khuẩn lạc sẽ được chọn để lưu giữ và tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

- PCR phát hiện vi khuẩn mang gen ESBL bao gồm gen TEM (TEM-F: TTTTCGTGTCGCCCTTATTCC; TEM-R: CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTC), CTX-M (CTX-M F: CGATGTGCAGTACCAGTAA; CTX-M R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG), SHV (SHV-F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC; SHV-R: GATTTGCTGATTCGTCGG): các chủng vi khuẩn mọc trên môi trường chọn lọc được tách chiết ADN bằng phương pháp tách nhiệt ở 95°C trong 10 phút. Sau đó, các mẫu ADN được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR để phát hiện các gen KKS.

Phân tích số liệu

Dữ liệu được lưu và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel.

Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được Hội đồng Y đức thông qua và nhận được sự chấp thuận tham gia nghiên cứu của các hộ gia đình tại xã Tràng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.

Kết quả

Kiểu hình sinh ESBL phản ánh nguy cơ KKS trong cộng đồng

94 mẫu phân được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc khả năng sinh ESBL của vi khuẩn. Kết quả cho thấy 93 mẫu dương tính với ESBL và 1 mẫu âm tính với ESBL. Kiểu hình các mẫu dương tính với ESBL được phân làm 4 loại

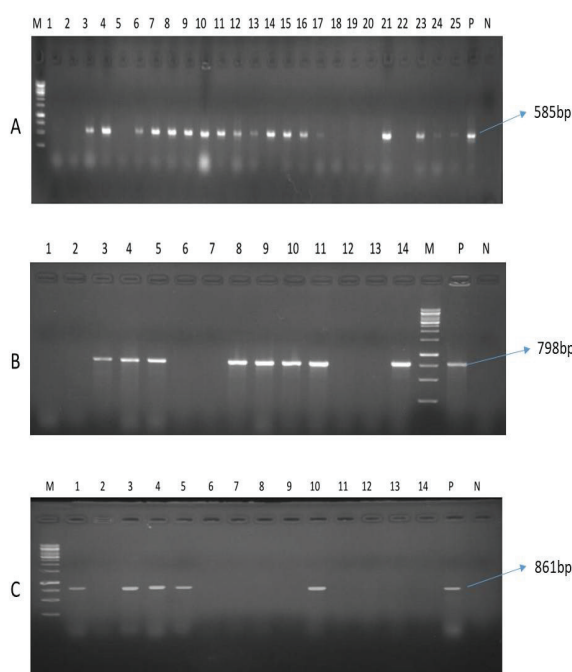
dựa theo đặc điểm sinh trưởng của khuẩn lạc vi khuẩn: loại 1 (khuẩn lạc mọc thưa thớt và yếu), loại 2 (khuẩn lạc mọc nhiều nhưng sinh trưởng yếu), loại 3 (khuẩn lạc mọc dày và sinh trưởng tốt), loại 4 (khuẩn lạc mọc rất dày và sinh trưởng mạnh). Kết quả phân bố các loại vi khuẩn dương tính ESBL được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ phân bố 4 loại kiểu hình vi khuẩn có vi khuẩn sinh ESBL phân lập từ mẫu phân trong nghiên cứu.

	Loại 1	Loại 2	Loại 3	Loại 4	Tổng
Kết quả nuôi cấy	22 (23,66%)	37 (39,78%)	25 (26,88%)	9 (9,68%)	93

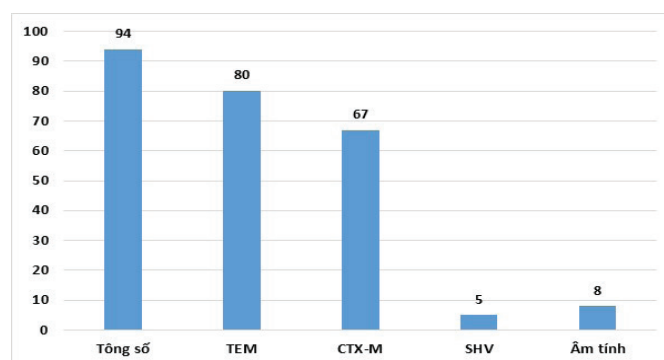
Kết quả PCR phát hiện gen ESBL KKS

Nghiên cứu tiến hành kỹ thuật PCR phát hiện gen KKS nhóm ESBL bao gồm TEM, CTX-M, SHV với 94 chủng vi khuẩn phân lập được. Kết quả PCR được thể hiện qua các hình ảnh đại diện trong hình 1.



Hình 1. (A) Kết quả PCR đại diện phát hiện gen CTX-M. (B) Kết quả PCR đại diện phát hiện gen TEM. (C) Kết quả PCR đại diện phát hiện gen SHV. M là thang chuẩn DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder); P: chứng dương; N: chứng âm.

Trong 94 chủng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu nghiên cứu, số chủng dương tính với gen TEM là cao nhất: 80/94 chủng, chiếm 85,1% tổng số chủng. Tiếp theo là CTX-M với 67/94 chủng, tương đương 71,3%. Tỷ lệ dương tính thấp nhất là SHV với chỉ 5/94 chủng dương tính, chiếm khoảng 5,3%. Có 8 chủng vi khuẩn âm tính với cả 3 gen trên (hình 2).



Hình 2. Biểu đồ thể hiện số lượng mẫu dương tính với gen TEM, SHV, CTX-M.

Kết quả PCR cũng cho thấy tần suất xuất hiện các gen KKS trong các mẫu vi khuẩn của nghiên cứu. Có những vi khuẩn chỉ mang một trong ba gen KKS là TEM, CTX-M hoặc SHV. Tuy nhiên, có rất nhiều trường hợp vi khuẩn mang đa gen KKS, cụ thể là có tới 60 trường hợp (63,8%) phát hiện cả 2 gen KKS và 3 trường hợp phát hiện được cả 3 gen KKS. Tần suất các gen kháng xuất hiện trên các mẫu phân lập được thể hiện cụ thể trong bảng 2.

Bảng 2. Tần suất xuất hiện các gen KKS trong các mẫu phân lập.

	Đơn gen		Đa gen		Không có gen nào (%)	
	<i>CTX-M (%)</i>	<i>TEM (%)</i>	<i>Phát hiện 3 gen (%)</i>	<i>CTX-M/TEM (%)</i>		<i>SHV/TEM (%)</i>
Tần suất xuất hiện kiểu gen	6 (6,38)	17 (18,09)	3 (3,19)	58 (61,70)	2 (2,13)	8 (8,51)

Bàn luận

Kết quả sàng lọc các mẫu vi khuẩn từ phân người thu thập được trong nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBL là rất cao (93/94 mẫu vi khuẩn phân lập được). Kết quả này chứng tỏ sự hiện diện của vi khuẩn đường ruột sinh ESBL trên mẫu phân người khỏe mạnh tại Hà Nam cao hơn nhiều so với một số nghiên cứu trước đây tại Việt Nam [5-7]. Điều này cũng cho thấy tình trạng báo động đối với vi khuẩn KKS đang lưu hành trong cộng đồng. Tỷ lệ vi khuẩn KKS cao phân lập được từ người khỏe mạnh phản ánh tình trạng sử dụng kháng sinh bừa bãi, không kiểm soát trong cộng đồng dẫn đến vi khuẩn thích ứng và kháng lại các kháng sinh phổ biến. Tuy nhiên, kết quả nuôi cấy trên môi trường chọn lọc cho thấy mức độ kháng thuốc của vi khuẩn là không đồng đều giữa các mẫu phân lập được. Cụ thể, khoảng 23,66% số mẫu mọc thưa thớt và yếu trên môi trường bổ sung kháng sinh, 39,78% số mẫu mọc nhiều nhưng sinh trưởng yếu, 26,88% số mẫu mọc nhiều và sinh trưởng tốt, chỉ có khoảng hơn 9,68% số mẫu mọc nhiều và

phát triển rất mạnh trên môi trường có kháng sinh (bảng 1). Như vậy, nếu không có sự can thiệp và quản lý tốt đối với hành vi sử dụng kháng sinh trong cộng đồng, tình trạng KKS của vi khuẩn sẽ ngày càng tăng về cả số lượng và mức độ kháng thuốc.

Kết quả PCR phát hiện gen TEM, CTX-M, SHV KKS của vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu cũng cho thấy mức độ KKS rất cao của vi khuẩn, dương tính với gen TEM là 80/94 chủng (chiếm 85,1%), CTX-M là 67/94 chủng (71,3%) và SHV là 5/94 chủng (5,3%). Tỷ lệ vi khuẩn dương tính với các kiểu gen trong nghiên cứu này cao hơn hẳn so với một nghiên cứu trước đó tại Hà Nam năm 2015 với tỷ lệ vi khuẩn mang gen TEM, CTX-M, SHV lần lượt là 47,6; 37; 1,5%. Đồng thời, kết quả phát hiện gen kháng ESBL trong nghiên cứu này cũng cho tỷ lệ tương đồng với nghiên cứu của Karen Bush và cs hay nghiên cứu của Panjarat Suntarasamit [8, 9]. Điều này cho thấy tình trạng vi khuẩn KKS trong cộng đồng ngày càng gia tăng. Không những thế, vi khuẩn mang gen ESBL lưu hành trong cộng đồng cũng ngày càng đa dạng về kiểu gen kháng thuốc, cụ thể là một mẫu vi khuẩn phân lập có thể mang một hoặc nhiều loại gen KKS khác nhau (bảng 2). Điều này có thể lý giải là do việc lạm dụng nhiều loại kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn cũng như dùng kháng sinh với liều lượng không đúng cách, không tuân theo khuyến cáo của bác sĩ, dẫn đến vi khuẩn dần kháng lại kháng sinh. Bên cạnh đó, vi khuẩn có khả năng lan truyền gen KKS trong cùng loài cũng như giữa 2 loài khác nhau thông qua nhiều hình thức như plasmid, transposons và intergrons [10]. Do đó, cần có những biện pháp cấp bách và cụ thể để hạn chế khả năng phát triển cũng như lan truyền gen KKS của vi khuẩn nhằm bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

Kết luận

Qua nghiên cứu cho thấy, tình trạng KKS của các mẫu vi khuẩn phân lập được từ phân người khỏe mạnh tại Trảng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam ở mức rất cao (99%) và kháng ở nhiều mức độ khác nhau thông qua kiểu hình mọc trên môi trường chọn lọc có kháng sinh.

Tỷ lệ vi khuẩn mang gen ESBL cao, cụ thể là gen TEM chiếm tỷ lệ cao nhất khoảng 85,1%, tiếp theo là CTX-M chiếm 71,3% và thấp nhất là SHV chiếm 5,3% tổng số chủng. Bên cạnh đó, tần suất xuất hiện gen KKS cũng rất đa dạng. Có chủng vi khuẩn chỉ phát hiện một trong ba loại gen KKS nêu trên. Tuy nhiên, có chủng lại phát hiện tới hai hoặc cả ba gen KKS trong nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Dự án 23HN: Thực trạng sử dụng kháng sinh và tỷ lệ người mang một số vi khuẩn KKS trong cộng đồng tại một xã của tỉnh Hà Nam năm 2018 do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương và Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Trường Đại học Oxford (OUCRU) tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Amr-review.org. (2019), *Background/AMR Review*, [online] available at: <https://amr-review.org/background.html> [accessed 12 Feb. 2019].
- [2] Who.int. (2018), *Antibiotic resistance*, [online] available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> [accessed 12 Feb. 2019].
- [3] C.L. Ventola (2015), "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats", *P&T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, **40(4)**, pp.277-283.
- [4] Nature.com (2013), "The antibiotic alarm", *Nature*, **495(7440)**, p.141.
- [5] Hoang Huy Tran, Soudeh Ehsani, Keigo Shibayama, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Minh Binh Nguyen, Duong Nhu Tran, Van Phuong Tran, Dieu Linh Tran, Hoai Thu Nguyen, Duc Anh Dang, Hong Son Trinh, Tran Hien Nguyen, and Heiman F.L. Wertheim (2015), "Common isolation of New Delhi Metallo-beta Lactamase 1-producing Enterobacteriaceae in a large surgical hospital in Vietnam", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **34(6)**, pp.1247-1254.
- [6] Mai Văn Tuấn, Nguyễn Thanh Bảo (2006), "Khảo sát trực khuẩn gram âm sinh men betalactam phổ rộng phân lập tại Bệnh viện Trung ương Huế", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **12**, phụ bản số 1, tr.150-156.
- [7] Nguyễn Đỗ Phúc, Nguyễn Lý Hoàng Ngân (2014), "Tần suất mang gen sinh ESBL và AMPC của Enterobacteriaceae trong cộng đồng TP Hồ Chí Minh năm 2013", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **18**, phụ bản số 6, tr.388-392.
- [8] Karen Bush, Grogre A. Jacoby, and Antone A. Medeiros (1995), "A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39(6)**, pp.1211-1233.
- [9] Panjarat Suntarasamit (2007), *Characterization of extended spectrum- β -lactamase (ESBL) in E. coli and K. pneumoniae and their responders to combinations of piperacillin/tazobactam plus amikacin or ciprofloxacin versus meropenem*, thesis PhD, Mahidol University.
- [10] M.N. Alekshun, S.B. Levy (2007), "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance", *Cell*, **128(6)**, pp.1037-1050.