

NGHIÊN CỨU TỶ LỆ SẢN SINH MEN EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASES (ESBL) VÀ PHÁT HIỆN GEN KHÁNG CEPHALOSPORIN CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* PHÂN LẬP TỪ CHẤT THẢI LỢN TẠI MỘT SỐ ĐỊA PHƯƠNG

Đặng Thị Thanh Sơn¹, Trần Thị Nhật¹, Trương Thị Quý Dương¹,
Trương Thị Hương Giang¹, Ngô Chung Thủy¹, Phạm Minh Hằng¹, Trần Xuân Bách²

TÓM TẮT

100 mẫu phân lợn thu thập từ nền chuồng nuôi lợn ở tỉnh Thái Bình và huyện Sóc Sơn, Hà Nội đã được xét nghiệm nhằm xác định tỷ lệ đa kháng và gen kháng kháng sinh nhóm cephalosporin của các chủng vi khuẩn *E. coli*. Kết quả nghiên cứu cho thấy *E. coli* kháng cefotaxime được phát hiện trong 82% số mẫu. Trong tổng số 220 chủng *E. coli* phân lập được, có 74,1% đa kháng với kháng sinh cephalosporin. Tỷ lệ phát hiện *E. coli* sản sinh ESBL từ 195 chủng (kháng với ít nhất một loại cephalosporin khác ngoài cefotaxime) là 80,5%. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy 100% các chủng kháng với 5 loại kháng sinh cephalosporin thế hệ 2 và 3 và 97,3% các chủng kháng với 4 loại thế hệ 2 và 3 có khả năng sinh ESBL.

Gen CTX và TEM hiện diện phổ biến trong các chủng vi khuẩn *E. coli* được kiểm tra với tỷ lệ lần lượt là 68,8% và 19,8%. Trong đó, 61,2% số chủng *E. coli* sinh ESBL chỉ mang gen CTX, 12,1% số chủng chỉ mang gen TEM, và 7,7% số chủng mang đồng thời cả 2 loại gen, không phát hiện được chủng *E. coli* nào mang gen SHV.

Từ khóa: phân lợn, *E. coli* sản sinh ESBL, đa kháng kháng sinh, gen kháng cephalosporin

Prevalence of extended-spectrum β -lactamases-producing (ESBL) and detection of cephalosporin resistance gene of *Escherichia coli* isolated from pig manure in Viet Nam

Dang Thi Thanh Son, Tran Thi Nhat, Trương Thị Quý Dương,
Trương Thị Hương Giang, Ngô Chung Thủy, Phạm Minh Hằng, Trần Xuân Bách

SUMMARY

This study was conducted to detect the multi-drug resistance *E. coli* strains and cephalosporin resistance genes of *E. coli* isolated from 100 pig manure samples that collected from Thai Binh province and Soc Son district, Ha Noi City. The studied result showed that cefotaxime resistant *E. coli* was found in 82% samples. Among 220 isolated *E. coli* strains, 74.1% was multi-drug resistance to cephalosporin. The rate of ESBL-producing *E. coli* strains detecting from 195 strains (resistant to at least with other cephalosporin beside cefotaxime) was 80.5%. Moreover, 100% of 5 antibiotic resistant strains and 97.3% of 4 antibiotic resistant strains were able to produce ESBL.

CTX, TEM genes were detected popularly in the tested *E. coli* strains with the rate was 68.8% and 19.8% respectively, of which 61.2% of the ESBL-producing *E. coli* strains carried CTX only, 12.1% carried TEM and 7.7% carried both CTX and TEM. The SHV gene was not

¹ Viện Thú y

² Viện Công nghệ Sinh học

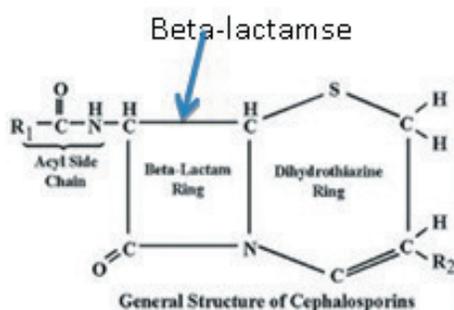
detected at the current study.

Keywords: pig manure, ESBL reproducing *E. coli*, multi-drug resistance, cephalosporin resistant gene

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm vi khuẩn kháng kháng sinh đang là một trong những nguy cơ và thách thức lớn nhất đến hiệu quả điều trị bệnh ở vật nuôi và người trên toàn thế giới, đặc biệt đối với các chủng vi khuẩn mang gen kháng thuốc (Julian và Dorothy, 2010). Ở Việt Nam, tình trạng lây nhiễm vi khuẩn kháng kháng sinh đã ở mức độ phổ biến (GARP Việt Nam, 2010), việc sử dụng kháng sinh rộng rãi trong chăn nuôi và chưa được quản lý tốt là những nguy cơ chủ yếu làm gia tăng khả năng kháng thuốc của vi khuẩn. Vi khuẩn mang gen kháng thuốc, đặc biệt là trực khuẩn gram âm sản sinh men Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) có yếu tố di truyền qua plasmid có thể lây nhiễm giữa các loài và giống khác nhau (Phạm Ngọc Hiếu và cs, 2012).

Vi khuẩn *E. coli* sống cộng sinh trong đường tiêu hóa của vật nuôi. Theo các nghiên cứu trên thế giới, vi khuẩn này có khả năng kháng kháng sinh ngày một gia tăng, nhất là những chủng có khả năng sinh men β -lactamase phổ rộng, kháng với nhiều kháng sinh nhóm cephalosporin, là nhóm kháng sinh được dùng phổ biến trong điều trị bệnh do *E. coli* ở người và vật nuôi (Mark de Been, 2014; George, 2009; Bonet, 2004). Cơ chế kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* sản sinh ESBL là loại enzyme này có khả năng thủy phân các kháng sinh nhóm cephalosporin (Paterson, 2006). Theo các tác giả Chaudhary và Aggarwal (2004), bản chất hóa học của hiện tượng kháng thuốc là các enzyme beta-lactam làm bất hoạt các kháng sinh nhóm Beta-lactamines bằng cách phá hủy mạch nối amide của vòng beta-lactam của Cephalosporin (hình 1).



Hình 1. Vị trí tác động của enzyme beta-lactamase

Việc sử dụng kháng sinh điều trị bệnh ở người và vật nuôi không tuân thủ theo quy định và nhiều kháng sinh không đạt tiêu chuẩn là những yếu tố nguy cơ làm cho quá trình điều trị bệnh ở vật nuôi và người không có hiệu quả và làm tăng khả năng kháng thuốc của nhiều loại vi khuẩn gây bệnh. Hiện nay, những nghiên cứu về nguồn lưu trữ vi khuẩn *E. coli* có khả năng sản sinh men ESBL ở Việt Nam mới cơ bản được thực hiện tại một số cơ sở y tế. Theo kết quả nghiên cứu của dự án GARP Việt Nam (2010), tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sản sinh ESBL tại một số bệnh viện lớn ở Hà Nội là rất cao; 57,3% tại bệnh viện Việt Đức và 41,2% tại bệnh viện Thanh Nhàn (GARP Việt Nam, 2010). Theo tác giả Võ Thị Chi Mai và cs (2010), tại bệnh viện chợ Rẫy, 70,5% *E. coli* và 29,5% *K. pneumoniae* sản sinh ESBL phân lập được từ bệnh nhân nhiễm trùng đường ruột. Tại Bệnh viện Trung ương Huế, tỷ lệ bệnh nhân nhiễm vi khuẩn sinh ESBL là 30,4% (Mai Văn Tuấn và Nguyễn Thanh Bảo, 2008). Theo tác giả Nguyễn Đắc Trung (2013), tại bệnh viện TW Thái Nguyên và bệnh viện trường ĐH Thái Nguyên, 39,53% chủng *E. coli* và 33,33% *K. pneumoniae* sinh ESBL.

Đề tài nghiên cứu này được thực hiện tại Thái Bình và Sóc Sơn - Hà Nội năm 2015 - 2016. Để có thêm thông tin về mức độ nhiễm loài vi khuẩn này ở lợn, làm cơ sở đánh giá nguy cơ lây nhiễm vi khuẩn kháng thuốc, chúng tôi chọn 2 địa phương có số lượng lợn lớn là Thái Bình (năm 2015 1.041.290 con) và (Hà Nội 1.498.265 con). Tuy vậy, việc sử dụng kháng sinh rộng rãi và chưa được kiểm soát tại hai địa phương này (dùng thuốc cho vật nuôi theo kinh nghiệm, không tuân thủ quy định và kháng sinh không đạt tiêu chuẩn). Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến quá trình điều trị bệnh không hiệu quả, gây thiệt hại kinh tế cho người chăn nuôi và làm tăng khả năng kháng thuốc của vi khuẩn. Kết quả thu được từ nghiên cứu này cũng sẽ là cơ sở dữ liệu khoa học góp phần xây dựng bộ số liệu về vi khuẩn *E. coli* kháng thuốc tại Việt Nam và giúp các cơ quan liên quan có thể đưa ra các giải pháp phù hợp về sử dụng kháng sinh, nhằm nâng cao hiệu quả điều trị bệnh do *E. coli* gây ra ở lợn tại nước ta.

II. NỘI DUNG , VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli* kháng cefotaxime ở chất thải lợn thu thập tại nền chuồng nuôi.

- Xác định tỷ lệ đa kháng thuốc nhóm cephalosporin và khả năng sinh ESBL của các chủng *E. coli* phân lập được.

- Phát hiện gen kháng kháng sinh nhóm cephalosporin (CTX, TEM, và SHV) của các chủng *E. coli* sản sinh ESBL phân lập được.

2.2 Vật liệu

100 mẫu phân lợn thu thập từ nền chuồng nuôi tại 50 hộ chăn nuôi ở Thái Bình và 50 hộ tại huyện Sóc Sơn – Hà Nội (mỗi hộ thu thập 1 mẫu).

Các dụng cụ, hóa chất, môi trường dùng để nuôi cấy phân lập và giám định vi khuẩn *E. coli*, bao gồm môi trường có tính đặc hiệu cao Brilliance™ *E. coli/coliform* selective medium, McConkey,...

Các loại khoanh giấy kháng sinh do hãng Oxoid cung cấp, gồm có cefoperazone, (CFP, 3rd, 75 µg), ceftriaxone (CRO, 3rd, 30µg), cefuroxime (CXM, 2nd, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 3rd, 30 µg), cefamandole (MA, 2nd, 30 µg) vv...

Phân lập vi khuẩn, thử tính mẫn cảm kháng sinh được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Vệ sinh thú y - Viện Thú y và các phương pháp PCR phát hiện gen kháng thuốc được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào động vật - Viện Công nghệ sinh học.

Thời gian thực hiện: 2015 - 2016.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thu thập mẫu phân lợn tại nền chuồng nuôi

Tại mỗi hộ chăn nuôi, mẫu phân lợn được thu thập từ 5 vị trí trên nền chuồng, bảo quản lạnh, chuyển về phòng thí nghiệm ngay trong ngày.

2.3.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime

Pha loãng mẫu phân theo tỷ lệ 1/10 trong dung dịch Buffer Pepton water. Tiếp tục pha loãng mẫu theo dãy nồng độ từ 10⁻¹ đến 10⁻⁸ bằng nước muối sinh lý. Nhỏ 100µl dung dịch từ mỗi ống trên bề mặt đĩa thạch MacConkey có bổ sung kháng sinh cefotaxime (2mg / lit) (Hansen *et al.*, 2013). Nuôi cấy vi khuẩn ở nhiệt độ 37°C/ 24h. Lựa chọn tối đa 5 khuẩn lạc *E. coli* có màu hồng cánh sen từ các đĩa thạch MacConkey đại diện cho từng mẫu sau khi giám định bằng Kit sinh hóa sẽ được sử dụng để thử tính mẫn cảm kháng sinh.

2.3.3. Phương pháp kiểm tra tính mẫn cảm kháng sinh của các chủng *E. coli* kháng cefotaxime phân lập được

Sử dụng môi trường Mueller Hinton (MH) và khoanh giấy tẩm kháng sinh (Oxoid), bao gồm cefoperazone, (CFP, 3rd, 75 µg), ceftriaxone (CRO, 3rd, 30µg), cefuroxime (CXM, 2nd, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 3rd, 30 µg), và cefamandole (MA, 2nd, 30 µg) để kiểm tra tính mẫn cảm kháng sinh theo phương pháp Kirby-Bauer của các

chủng *E. coli* phân lập được.

Kết quả được đánh giá theo tiêu chuẩn M100-S24 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing, 2014).

2.3.4. Phương pháp khoan giấy đôi (Double-disks test) phát hiện các chủng *E. coli* sản sinh ESBL

Các chủng *E. coli* kháng với một trong các loại kháng sinh cephalosporin đều là những chủng nghi ngờ, có khả năng sản sinh beta-lactamase cao (Livemore và Brown, 2001; MacKenzie *et al.*, 2002) và được tiếp tục kiểm

tra bằng phương pháp khoan giấy đôi có cải tiến (Cabrera, 2004). Đĩa thạch Mueller-Hinton được cấy lán đều hỗn dịch vi khuẩn *E. coli* (10^6 CFU/ml) và để khô mặt thạch ở nhiệt độ thường. Khoan giấy AMC (amoxicillin 20 μ g / clavulanic acid 10 μ g) được đặt ở giữa đĩa thạch, khoan giấy kháng sinh Cephalosporin được đặt cách khoan giấy AMC 20 mm. Nếu vùng ức chế xung quanh khoan giấy Cephalosporin mở rộng về phía khoan AMC (vùng ức chế hình elip) thì chủng vi khuẩn *E. coli* được kiểm tra có khả năng sản sinh ESBL (NCCLS, 2007) (hình 2).



Hình 2. Vi khuẩn *E. coli* có khả năng sinh ESBL

2.3.5. Phương pháp PCR phát hiện gen kháng cephalosporin (TEM, CTX, và SHV) của các chủng *E. coli* sinh ESBL (Hasman *et al.*, 2005, Olesen *et al.*, 2004).

* Tách chiết ADN tổng số của vi khuẩn *E. coli* bằng bộ Kit QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany).

* Phương pháp PCR đa môi phát hiện gen TEM và SHV: các cặp gen môi dùng cho nghiên cứu

được trình bày ở bảng 3. Phản ứng PCR thực hiện: 3 phút ở 94°C, 25 chu kỳ (94°C/1 phút - 50°C/1 phút - 72°C/1 phút), chu kỳ tổng hợp cuối cùng ở 72°C/10 phút, có thể giữ mẫu ở 4°C. Kiểm tra hiệu quả quá trình khuếch đại và kích thước sản phẩm PCR trên gel agarose 1% và nhuộm bằng Ethidium bromide.

* Phương pháp PCR đơn môi phát hiện gen CTX: Các bước tiến hành tương tự quy trình trên, nhưng 30 chu kỳ sẽ là (94°C/1 phút, 60°C/1 phút và 72°C/1 phút).

Bảng 1. Các cặp mồi để phát hiện gen kháng kháng sinh TEM, SHV và CTX-M
(Olesen et al., 2004)

Gen mồi	Sản phẩm PCR	Nhiệt độ ở chu kỳ biến tính
TEM-757: 5'-GCGGAACCCCTATTTG- 3' TEM-821: 5'- TCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGAC- 3'	964bp	50°C
SHV-1436: 5'- TTCGCCTGTGTATTATCTCCCTG- 3 SHV-1437: 5'- TTAGCGTTGCCAGTGYTCG- 3'	854bp	50°C
CTX-1354: 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC- 3' CTX-1355: 5'- TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG -3'	593bp	60°C

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime ở chất thải lợn

Vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime được phát hiện là bước đầu tiên để tiếp tục nghiên cứu phát hiện các chủng *E. coli* sản sinh men ESBL - là những chủng có khả năng kháng cephalosporin. Kết quả cho thấy 82 trong tổng số 100 mẫu nhiễm *E. coli* kháng cefotaxime, chiếm tỷ lệ 82%, trong đó có 41/50 mẫu dương tính ở Thái Bình và 41/50 mẫu ở Sóc Sơn.

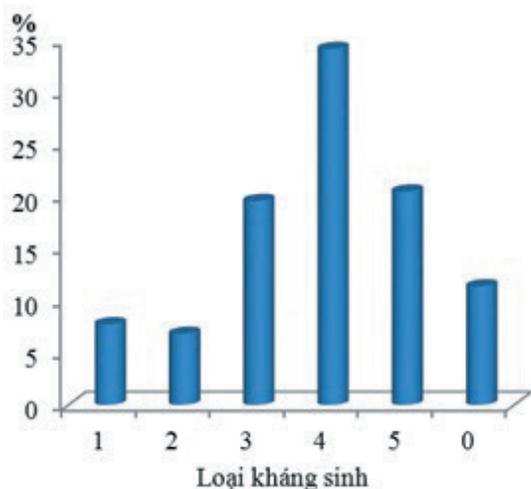
Kết quả khảo sát thông tin về sử dụng kháng sinh cho đàn lợn từ các hộ cho thấy, 100% hộ chăn nuôi đã từng sử dụng kháng sinh với mục đích điều trị bệnh cho đàn lợn đang nuôi tại thời điểm khảo sát. Thuốc kháng sinh được các hộ chăn nuôi sử dụng rộng rãi, nhiều nhất là các thuốc kháng sinh thuộc nhóm β -lactam (ampicillin, amoxicillin, penicillin) và các thuốc kháng sinh thuộc nhóm aminoglycosid (gentamycin, streptomycin, neomycin), tiếp theo là nhóm tetracyclin (doxycycline), nhóm quinolon (enrofloxacin), nhóm macrolid (lincomycin, tylosin) và ít nhất là nhóm polypeptid (colistin). Nhiều kháng sinh được chủ hộ sử dụng với liều tăng từ 0,5- 2 lần so với liều quy định do thấy các thuốc này không còn tác dụng chữa bệnh cho lợn nếu dùng đúng liều cho phép. Bên cạnh đó, 9/100 hộ chăn nuôi sử dụng kháng sinh bổ sung vào thức ăn, nước

uống cho lợn nhằm phòng bệnh và kích thích tăng trưởng cho đàn lợn. Đây là những nguy cơ chính gây nên hiện tượng kháng thuốc phổ biến hiện nay của các vi khuẩn gây bệnh. Vi khuẩn kháng thuốc không chỉ ảnh hưởng tới hiệu quả chữa bệnh ở vật nuôi mà còn ảnh hưởng tới sức khỏe con người nếu bị lây nhiễm các vi khuẩn này từ vật nuôi, từ môi trường.

Tại nghiên cứu này, chúng tôi chưa tìm thấy mối liên quan giữa việc dùng kháng sinh cho lợn và tỷ lệ nhiễm *E. coli* kháng cefotaxime ở phân lợn. Trong quá trình thực hiện điều tra hiện trạng sử dụng kháng sinh cho lợn, hầu hết các chủ hộ không nhớ hết tên các thuốc kháng sinh đã từng được sử dụng tại hộ. Hoặc kháng sinh được sản xuất với tên thương mại khác nhau nhưng thành phần hóa học giống nhau mà chủ hộ không ghi chép lại.

3.2. Xác định mức độ miễn cảm và sự đa kháng với một số kháng sinh khác thuộc nhóm cephalosporin của các chủng *E. coli* phân lập được

Tổng số 220 chủng *E. coli* được lựa chọn (tối đa 5 chủng từ mỗi mẫu) để kiểm tra tính miễn cảm đối với một số loại kháng sinh khác thuộc nhóm cephalosporin, bao gồm cefoperazone, ceftriaxone, cefuroxime, ceftazidime, và cefamandole. Kết quả được trình bày tại biểu đồ 1 cho thấy: 25 chủng miễn cảm với tất cả 5 loại kháng sinh trên, chiếm tỷ lệ 11,4% (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ phát hiện các chủng *E. coli* đa kháng cephalosporin ở phân lợn

Tỷ lệ *E. coli* kháng ít nhất với 1 loại kháng sinh trên là 8,86%, với 2 loại kháng sinh là 6,8%, với 3 loại kháng sinh là 19,5%, với 5 loại kháng sinh là 20,5% và tỷ lệ cao nhất là kháng đồng thời với cả 4 loại kháng sinh: 34,1%. Tỷ lệ

đa kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập được (từ 3 loại kháng sinh trở lên) là 74,1%.

So sánh với các kết quả nghiên cứu đã công bố năm 2008 của tác giả Hoàng Hoài Phương và cs. (2008), 61,5% chủng *E. coli* phân lập từ thực phẩm kháng từ 2 loại kháng sinh và kết quả nghiên cứu đã công bố năm 2014 của Trần Thị Thùy Giang và cs., 65% chủng *E. coli* phân lập từ thực phẩm kháng với 2 - 7 loại kháng sinh thì tỷ lệ đa kháng kháng sinh của *E. coli* tại nghiên cứu này là cao hơn. Điều này có thể lý giải là do nhóm vi khuẩn *E. coli* được lựa chọn thử kháng sinh đồ tại nghiên cứu này theo quy trình phân lập ngay từ đầu là những chủng *E. coli* đã kháng cefotaxime. Tuy vậy, tỷ lệ đa kháng kháng sinh của *E. coli* phổ biến ở mức cao sẽ tiếp tục gây khó khăn cho công tác phòng và trị bệnh ở vật nuôi và người ở nước ta.

3.3. Kết quả phát hiện mối liên quan giữa khả năng sản sinh men ESBL của *E. coli* và khả năng miễn cảm kháng sinh nhóm cephalosporin

Bảng 2. Mối tương quan giữa khả năng đa kháng kháng sinh nhóm cephalosporin và tỷ lệ sản sinh men ESBL của vi khuẩn *E. coli* phân lập được

Số lượng và tên kháng sinh	Khả năng đa kháng kháng sinh		Tỷ lệ sản sinh men ESBL	
	Số chủng kháng /220 chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng (+) / Số chủng thử	Tỷ lệ (%)
CFP+CRO+CXM+CAZ+MA	45	20,5	45/45	100
CFP+CRO+CXM+MA	68	30,9	68/68	100
CRO+CXM+CAZ+MA	4	1,8	3/4	75
CFP+CRO+CAZ+MA	2	0,9	2/4	100
CFP+CXM+CAZ+MA	1	0,5	0/1	0
CRO+CXM+MA	28	12,7	26/28	92,9
CRO+CAZ+MA	14	6,4	3/14	21,4
CXM+CAZ+MA	1	0,5	0/1	0
CAZ+MA	8	3,6	5/8	62,5
CRO+MA	5	2,7	0/5	0
CXM+MA	1	0,5	0/1	0
CRO+CXM	1	0,5	1/1	100
CAZ	1	0,5	0/1	0
MA	16	7,3	4/16	25
Tổng	195/220	88,6	157/195	80,5

CFP: cefoperazone, CRO: ceftriaxone, CXM: cefuroxime, CAZ: ceftazidime, MA: cefamandole

Theo Vanessa Blanc *et al.* (2006), sự hiện diện của vi khuẩn sinh ESBL ở vật nuôi là do sự lan truyền plasmid có chứa gen kháng thuốc giữa các chủng trong cùng một loài hoặc giữa các loài vi khuẩn khác nhau. Ngoài ra tác giả cũng cho biết: việc sử dụng các kháng sinh nhóm beta-lactam trong chăn nuôi cũng tạo áp lực chọn lọc lên vi khuẩn, khiến vi khuẩn tăng khả năng đề kháng với kháng sinh.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy: trong tổng số 195 chủng vi khuẩn *E. coli* từ phân lợn khỏe mạnh kháng ít nhất với một loại kháng sinh nhóm cephalosporin, có 157 chủng có khả năng sản sinh men ESBL, chiếm 80,5% (bảng 2).

Kết quả tại bảng 2 cũng cho thấy nếu các chủng vi khuẩn *E. coli* kháng đồng thời với nhiều loại kháng sinh cephalosporin thì khả năng sinh men ESBL càng cao. Cụ thể: các chủng *E. coli* kháng 5, 4, và 3 loại kháng sinh có khả năng sản sinh ESBL với tỷ lệ lần lượt là 100%, 97,3%, và 67,4%.

Ngoài ra để khẳng định rõ việc chỉ có các chủng vi khuẩn *E. coli* kháng với ít nhất một loại kháng sinh cephalosporin mới có thể có khả năng sản sinh ESBL, 25 chủng miễn cảm với tất cả các kháng sinh trên khi kiểm tra đều cho thấy không sản sinh ESBL (bảng 3).

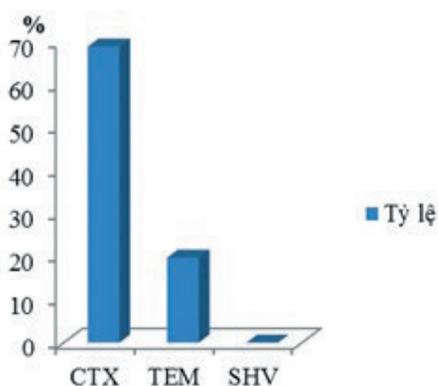
Bảng 3. Khả năng sản sinh ESBL của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được tỷ lệ với khả năng miễn cảm kháng sinh cephalosporin

Loại kháng sinh cephalosporin	Chủng sinh ESBL/ số chủng thử	Tỷ lệ (%)
Miễn cảm với tất cả các kháng sinh cephalosporin được sử dụng trong nghiên cứu	0/25	0
Không miễn cảm với cephalosporin thế hệ 2	4/17	23,6
Kháng ít nhất với 1 loại kháng sinh cephalosporin thế hệ 3	153/178	85,95
Kháng ít nhất với 1 loại kháng sinh cephaloparin	195/220	80,6

Hơn nữa, các chủng *E. coli* kháng với kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 có tỷ lệ sản sinh ESBL ở mức độ cao (86%), trong khi các chủng chỉ kháng với cephalosporin thế hệ 2 có tỷ lệ ở mức thấp, 4/17 chủng (chiếm 23,6%). Tỷ lệ phát hiện *E. coli* sản sinh ESBL ở nghiên cứu này là 85,95% (bảng 3). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả các nghiên cứu trên thế giới. Theo nghiên cứu của MacKenzie *et al.* (2002), 91% các chủng *E. coli* kháng với cefoperazone, cefamandole, cefpodoxime và cefpirome có khả năng sản sinh ESBL. Nghiên cứu của Dahms (2015) cũng cho thấy 70,6% chủng *E. coli* phân lập từ các trang trại lợn và gà có khả năng sản sinh ESBL.

3.4. Kết quả phát hiện gen kháng cephalosporin ở các chủng *E. coli* có khả năng sản sinh men ESBL phân lập được

Từ bảng 2 cho thấy: 157/195 chủng kháng ít nhất với 1 loại kháng sinh nhóm cephalosporin có khả năng sản sinh men ESBL. Biểu đồ 2 cho thấy trong 157 chủng trên, có 108 chủng được phát hiện mang gen CTX, chiếm 68,8% và 31/157 chủng mang gen TEM, chiếm 19,8%. Hơn nữa kết quả nghiên cứu tại bảng 4 cũng cho thấy có 96/157 (61,2%) chủng *E. coli* sản sinh ESBL chỉ mang gen CTX, 19/157 (12,1%) chủng chỉ mang gen TEM và 12/157 (7,7%) chủng mang đồng thời cả 2 gen CTX và TEM. Tại nghiên cứu này, chúng tôi không phát hiện chủng *E. coli* nào mang gen SHV.



Biểu đồ 2. Tỷ lệ các gen kháng cephalosporin được phát hiện từ các chủng *E. coli* sản sinh ESBL

Kết quả nghiên cứu phát hiện gen kháng thuốc của *E. coli* phân lập từ phân nền chuồng lợn của chúng tôi thấp hơn so với kết quả nghiên cứu trên gà của Bùi Thị Lê Minh và cs. (2016) tại Trà Vinh. Tác giả phát hiện các chủng *E. coli*

phân lập từ phân gà có mang gen với tỷ lệ cao, gen CTX (93,3%), TEM (90%), và nhóm nghiên cứu cũng đã phát hiện gen SHV (16,7%) và 90% các chủng mang đồng thời cả 2 gen CTX và TEM. Theo nghiên cứu của Dahms *et al.* (2015) tiến hành phân lập vi khuẩn *E. coli* trong mẫu phân lợn và kiểm tra có 32 chủng mang gen CTX-M, 11 chủng mang gen TEM, trong đó có 10 chủng mang đồng thời cả gen CTX-M và TEM. Theo nghiên cứu của tác giả Schmiedel *et al.* (2014), 49,3% *Enterobacteriaceae* phân lập từ mẫu động vật cảnh (chó và mèo) tại Đức mang gen CTX, 46,4% vi khuẩn *Enterobacteriaceae* phân lập từ chất thải mang gen TEM, trong đó 74% các chủng vi khuẩn được tìm thấy là *E. coli*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với nghiên cứu của Carmen Dahms *et al.* (2015) và Overdeest *et al.* (2011) tại Hà Lan khi phát hiện gen CTX là gen có sự hiện diện với tỷ lệ cao nhất trong các chủng *E. coli* sản sinh men ESBL phân lập được.

Bảng 4. Tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen (CTX, TEM, SHV) kháng cephalosporin

Gen kháng cephalosporin	Số chủng kiểm tra	Số chủng mang gen được phát hiện	Tỷ lệ %
CTX	157	96	61,2
TEM	157	19	12,1
CTX + TEM	157	12	7,7
Tổng	157	127	80,9

IV. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ nhiễm *E. coli* kháng cefotaxime ở chất thải lợn thu thập tại nền chuồng là 82% và tương đương ở cả 2 địa phương Thái Bình và Sóc Sơn.

- Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mẫn cảm với cả 5 loại kháng sinh nhóm cephalosporin được kiểm tra là 11,4%, tỷ lệ kháng ít nhất với 1 loại kháng sinh cephalosporin là 88,6%, và tỷ lệ đa kháng (kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên) là 74,1%.

- Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* phân lập từ phân nền chuồng lợn, kháng với ít nhất một loại cephalosporin khác là cefotaxime, có khả năng

sản sinh men ESBL là 80,5%. Nghiên cứu cũng xác định được 100% các chủng kháng với 5 loại kháng sinh cephalosporin thế hệ 2 và 3 có khả năng sinh ESBL và 97,3% các chủng kháng 4 loại thế hệ 2 và 3 có khả năng sản sinh ESBL.

- Tỷ lệ mang gen CTX và TEM của các chủng *E. coli* sản sinh ESBL tại nghiên cứu này lần lượt là 68,8% và 19,8%. Trong đó, 61,2% số chủng *E. coli* sản sinh ESBL chỉ mang gen CTX, 12,1% số chủng chỉ mang gen TEM, và 7,7% số chủng mang đồng thời cả 2 gen CTX và TEM. Tại nghiên cứu này, chúng tôi không phát hiện chủng *E. coli* mang gen SHV.

Các nghiên cứu sâu về sinh học phân tử cần được tiếp tục triển khai để có thể hiểu rõ cơ chế lây truyền gen kháng thuốc thông qua plasmid của vi khuẩn giữa các loài vật nuôi khác nhau và giữa vật nuôi với con người, góp phần từng bước kiểm soát và ngăn chặn nguy cơ lây nhiễm vi khuẩn kháng thuốc tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu thực hiện với kính phí được tài trợ từ Quỹ Phát triển Khoa học Công nghệ NAFOSTED- Bộ Khoa học Công Nghệ (mã số tài trợ 106-YS.02-2014.02).

Chúng tôi gửi lời cảm ơn chân thành đến cán bộ Chi cục Thú y Thái Bình, Trạm Thú y huyện Sóc Sơn và các Thú y viên xã, các chủ hộ chăn nuôi đã tham gia thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Thị Minh Lê, Lưu Hữu Mãnh, Nguyễn Nhựt Xuân Dung. 2016. Khảo sát sự hiện diện gen CTX-M, TEM và SHV ở *Escherichia coli* sinh β – Lactamase phổ rộng phân lập từ gà ở Trà Vinh. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ*. 42b:1-6.
- Báo cáo của Bộ Y tế Việt Nam phối hợp với dự án Hợp tác toàn cầu về kháng kháng sinh GARP- Việt Nam và Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng ĐH Oxford, tháng 10 – 2010. "Báo cáo sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại 15 bệnh viện Việt Nam năm 2008 – 2009".
- Been, M.D, Val F., Lanza, 2014. Dissemination of Cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. Published: December 18, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004776>.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., and Frank M. Aarestrup, F.M. 2005. Beta-lactamases among extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. of Antimicrob. Chemother.* 56, 115–121.
- Hansen, K. H., Damborg. P., Andreasen. M., Nielsen. S.S., Guardabassi. L. 2013. Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *E. coli* in pigs: A longitudinal study. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (3), 794–798.
- Mai, V.T.C., Cuong, N.T., Hai, N.M., and Giao, L.K.N. 2006. Study for monitoring antimicrobial resistance trends, (SMART) in Cho Ray hospital, 2005.
- Mai Văn Tuấn và Nguyễn Thanh Bảo, 2008. Khảo sát trực khuẩn gram âm sinh men – lactamase phổ mở rộng phân lập tại bệnh viện Trung ương Huế. *Tạp chí y học Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2008 – tập 12 – số 1*.
- Trần Thị Thùy Giang, Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Văn Trí, Nguyễn Thị Lệ Hồ, cs, 1-6/2014. Khảo sát độ nhiễm khuẩn và khả năng kháng kháng sinh của *E. coli* phân lập từ thực phẩm tại Viện Pasteur, Tp Hồ Chí Minh". *Tạp chí khoa học ĐHSP Tp. Hồ Chí Minh số 61 năm 2014*.
- Trung, N. Đ. 2013. Phát hiện gene blaTEM và blaCTX-M ở các chủng *E. coli* và *K. pneumoniae* bằng phản ứng multiplex-PCR. *Tạp chí Y- Dược học quân sự. Số 9*.
- Võ Thị Chi Mai, Ngô Thị Quỳnh Hoa, Huỳnh Công Lý, Lê Kim Ngọc Giao và Hoàng Thị Phương Dung, 2010, "Trực khuẩn đường ruột tiết β -lactamase phổ rộng (ESBL) gây nhiễm khuẩn và chiếm cứ đường ruột phân lập tại bệnh viện Chợ Rẫy". *Tạp chí y học Thành phố Hồ Chí Minh. Năm 2010 – tập 14 – Số 2*.

Nhận ngày 28-9-2016

Phản biện ngày 30-11-2016