

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KIỂU HÌNH VÀ KIỂU GEN KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* SẢN SINH ESBL PHÂN LẬP TỪ CHẤT THẢI LỢN

Truong Thị Quý Dương¹, Trần Thị Nhật¹,
Truong Thị Hương Giang¹, John Elmerdahl Olsen²,
Mahuton Gildas Hounmanou², Anders Dalsgaard², Đặng Thị Thanh Sơn¹

TÓM TẮT

Vi khuẩn kháng kháng sinh là mối đe dọa đối với sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới và lây truyền gen kháng là cơ chế kháng kháng sinh quan trọng nhất của vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, 43 chủng *E. coli* sản sinh ESBL phân lập từ chất thải của lợn tại Bắc Ninh đã được lựa chọn để giải trình tự gen của chúng bằng phương pháp Illumina Nextera XT sử dụng quy trình v3 của kit thử MiSeq. Kết quả nghiên cứu cho thấy gen kháng kháng sinh phát hiện được từ các chủng vi khuẩn nói trên bao gồm: *blaCTX-M-55* (22/43), *blaCTX-M-14* (10/43), *blaCTX-M-27* (5/43), *blaCTX-M-15* (2/43) và *blaOXA10* (4/43). Một chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen *blaDHA* - gen quy định tính kháng kháng sinh beta-lactam nhóm C. 18/43 chủng *E. coli* sản sinh ESBL mang gen *mcr-1* (kháng colistin). Trong đó có 3 chủng đồng mang gen kháng colistin *mcr-3*, 2 chủng có đột biến trên gen *prnB* (p.V161G). 41/43 (95,3%) chủng *E. coli* sản sinh ESBL đều mang gen kháng nhóm kháng sinh quinolone (*qnrS1* hoặc/và các gen kháng *qnrB6*, *qnrB19*) qua plasmid (PMQR). Các gen kháng này có thể truyền ngang hoặc truyền dọc giữa các chủng/loài vi khuẩn khác nhau và đây là một trong những bằng chứng về lây lan gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ chất thải của lợn tại Việt Nam.

Từ khóa: Chất thải lợn, *E. coli* sản sinh ESBL, gen kháng kháng sinh.

Study on antibiotic resistance phenotype and genotype of *Escherichia coli* producing ESBL from pig waste

Truong Thi Quy Duong, Tran Thi Nhat,
Truong Thi Huong Giang, John Elmerdahl Olsen,
Mahuton Gildas Hounmanou, Anders Dalsgaard, Dang Thi Thanh Son

SUMMARY

Antimicrobial resistance bacteria is a threat to public health in the worldwide and transmission of the resistant genes is the most important antibiotic resistance mechanism of bacteria. A total of 43 *E. coli* strains producing ESBL isolated from the pig feces samples in Bac Ninh province were used for analyzing their gene sequences by Illumina Nextera XT method using v3 protocol of MiSeq kit. The studied result showed that the antibiotic resistance genes identified from the above isolated bacteria strains included *blaCTX-M-55* (22/43), *blaCTX-M-14* (10/43), *blaCTX-M-27* (5/43), *blaCTX-M-15* (2/43) and *blaOXA10* (4/43). There was 1 isolate producing ESBL carried both *blaDHA*, *AmpC* genes (the gene resisted beta-lactam antibiotics, C group). There were 18/43 *E. coli* isolates carried the plasmid-mediated *mcr-1* gene (resisted colistin). Of which, there were 4 isolates carried the *mcr-3* gene (resisted colistin), 2 isolates had mutations in the *prnB* gene (p.V161G). Most of the *E. coli* strains (41/43) producing ESBL harbored plasmid-mediated genes resisted beta-lactam antibiotics (quinolone group) (*qnrS1* and/or *qnrB6* and/or *qnrB19*) and/or quinolone resistance due to mutations. These resistant genes could be transmitted following the horizontal or vertical ways among different bacterial strains/species. This is one of the witness on spreading the antibiotic resistance genes of *E. coli* strains isolated from the pig waste in Viet Nam.

Keywords: Pig manure, ESBL producing *E. coli*, antibiotic resistant gene.

¹ Viện Thú y

² Trường Đại học Tổng hợp Copenhagen, Đan Mạch

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự xuất hiện nhanh chóng của các vi khuẩn kháng kháng sinh đang là một trong những nguy cơ và thách thức lớn ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị một loạt bệnh nhiễm trùng ở vật nuôi và người trên toàn thế giới. Trong số các vi khuẩn kháng kháng sinh, *E. coli* là một trong những vi khuẩn rất được quan tâm trong họ *Enterobacteriaceae*, có thể gây nhiễm trùng đường ruột, tiết niệu, viêm màng não và nhiễm trùng máu ở cả người và động vật (Touchon *et al.*, 2009). *E. coli* là trực khuẩn gram âm, một số chủng có khả năng sản sinh men Extended-spectrum β -lactamases phổ rộng (*E. coli* sinh ESBL) có yếu tố di truyền qua plasmid có khả năng ly giải (kháng) các kháng sinh thuộc nhóm penicillin, cephalosporin thế hệ một, hai và ba (David *et al.*, 2006). Đây là các nhóm thuốc được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh trên người và vật nuôi. Ở Việt Nam, tỷ lệ *E. coli* sản sinh ESBL phân lập trên người khá cao. Các gen kháng cephalosporin *CTX-M-9* và *CTX-M-1* được phát hiện và là những β -lactamase phổ biến nhất. Tại một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long, tác giả Hinenoya và cs. (2018) cho biết 94,7% các chủng *E. coli* phân lập từ đường ruột của gà đã kháng với ciprofloxacin, phổ biến là các gen *CTX-M-1* kháng cephalosporin và *mcr1* kháng colistin. Đối với lợn; 12,8% *E. coli* phân lập được kháng với ciprofloxacin và các gen *mcr1* và *CTX-M-9* là phổ biến.

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli* kháng cefotaxime, *E. coli* sản sinh ESBL tại hộ chăn nuôi lợn. Từ đó chọn chủng có đặc điểm kháng điển hình khác nhau để giải trình tự toàn bộ hệ gen nhằm xác định mối tương quan giữa kiểu hình và sự đa dạng kiểu gen kháng đối với một số kháng sinh như colistin, nhóm quinolone và cephalosporin của vi khuẩn *E. coli*.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định tỷ lệ kháng của các chủng *E. coli* kháng cefotaxime đã phân lập được với 12 loại

kháng sinh phổ biến khác, xác định các chủng sản sinh ESBL

- Giải trình tự toàn bộ hệ gen một số chủng *E. coli* sản sinh ESBL có tính kháng điển hình để phát hiện sự đa dạng gen kháng với một số kháng sinh như colistin, nhóm quinolone và cephalosporin.

2.2. Vật liệu

- 87 chủng vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime phân lập từ 116 mẫu chất thải lợn.

- Hóa chất, môi trường (Oxoid) dùng để nuôi cấy phân lập, giám định vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime và xác định tính miễn cảm kháng sinh.

- Hóa chất môi trường dùng cho phát hiện gen kháng và giải trình tự gen theo kit thư MiSeq (theo quy trình v3 phương pháp Illumina Nextera XT).

- Trang thiết bị, máy móc cần thiết trong phòng thí nghiệm Bộ môn Vệ sinh Thú y (Viện Thú y) và Trường Đại học Tổng hợp Copenhagen (Đan Mạch).

- Địa điểm và thời gian thực hiện: Tại tỉnh Bắc Ninh từ 2018 - 2019.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu

Tại mỗi hộ chăn nuôi, mẫu chất thải của lợn (mỗi mẫu khoảng 20g) được thu thập từ 5 vị trí khác nhau trên nền chuồng và được bảo quản ống chuyên dụng đặt trong thùng lạnh (4°C – 8°C) và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ.

2.3.2. Phân lập vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime

Sử dụng đĩa thạch MacConkey có bổ sung cefotaxime (2 μ g/ml) và các xét nghiệm sinh hóa.

2.3.3. Xác định tỷ lệ kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập

Phương pháp khoan giấy để xác định tỷ lệ kháng đối với 12 loại kháng sinh (Oxoid). Các chủng *E. coli* kháng với ít nhất 1 trong các kháng

sinh nhóm cephalosporin thế hệ 3 (ceftriaxone hoặc cefotaxime) được phát hiện khả năng sản sinh ESBL bằng phương pháp khoan giấy đôi.

Phương pháp phát hiện nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên đĩa 96 giếng để xác định tỷ lệ kháng colistin (COL).

2.3.4. Giải trình tự gen

43 chủng vi khuẩn *E. coli* sản sinh ESBL có tính kháng khác nhau được lựa chọn để giải trình tự gen sử dụng Illumina Nextera XT và theo quy trình sinh phẩm bộ kit MiSeq v.3. Trình tự chuỗi được tổ hợp bằng ứng dụng Spades 3.9 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) và được kiểm tra chất lượng bằng phần mềm Quast. Gen kháng kháng sinh được phân tích bằng các công cụ ResFinder 3.2 của CGE servers (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

Chủng *E. coli* ATCC 25922 được sử dụng làm chủng đối chứng dương.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả cho thấy có 87/116 (75%) mẫu chất thải dương tính với vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime. Cephalosporin là kháng sinh có hoạt phổ rộng được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh trên người và động vật hiện nay có thể là lý do chính dẫn đến tỷ lệ kháng cao đối với nhóm kháng sinh này.

3.1. Kết quả xác định mức độ kháng một số loại kháng sinh khác và phát hiện vi khuẩn *E. coli* sản sinh ESBL

Kết quả được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ kháng với một số kháng sinh khác của các chủng *E. coli* kháng cefotaxim phân lập được (N=87)

TT	Loại kháng sinh	Số chủng kháng	Tỷ lệ (%)
1	Ampicillin (AMP, 10 µg)	87	100
2	Gentamycin (GEN, 10 µg)	66	75,9
3	Trimethoprim (TMP, 5 µg)	83	95,4
4	Tetracycline (TET, 30 µg)	84	96,6
5	Streptomycin (STR, 10 µg)	65	74,7
6	Nalidixic acid (NAL, 30 µg)	57	65,5
7	Sulfonamides (S3, 300 µg)	81	93,1
8	Ciprofloxacin (CIP, 5 µg)	33	37,9
9	Ceftriaxone (CRO, 30 µg)	85	97,7
10	Cefoxitin (FOX, 30 µg)	5	5,7
11	Amoxicillin clavulanic (AMC, 30 µg)	5	5,7
12	Ceftiofur (EFT, 30 µg)	78	89,7
13	Colistin (COL)	42	48,3

Vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime phân lập được từ chất thải chăn nuôi lợn kháng cao với ampicillin (100%), ceftriaxone (97,7%), tetracycline (96,6%), trimethoprim (95,4%), sulfonamide (93,1%), ceftiofur (89,7%), gentamycin (75,9%), streptomycin (74,7%), nalidixic acid (65,5%) và kháng thấp với ciprofloxacin (37,9%) và

amoxicillin/clavulanic acid và cefoxitin (5,7%). Đặc biệt 48,3% *E. coli* sản sinh ESBL kháng với colistin (là kháng sinh quan trọng trong điều trị bệnh ở người theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới). Nghiên cứu này còn cho thấy tỷ lệ *E. coli* đa kháng (kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên) là 89,6%.

Vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL được phát hiện

trong 78/87 (89,6%) mẫu dương tính với *E. coli* kháng cefotaxime. Nghiên cứu của Nguyen và cs. (2016) cho biết 22% mẫu thịt lợn tại cơ sở giết mổ và 50% mẫu từ siêu thị tại Tp Hồ Chí Minh có chứa vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL. Dương và cs. (2016) khi nghiên cứu *E. coli* sinh ESBL trên thạch không bổ sung cefotaxime cho biết kết quả phân lập là 14% từ mẫu thu thập tại cơ sở giết mổ. Kết quả khác nhau của các nghiên cứu trên có thể được giải thích là do sự khác nhau về hàm lượng cefotaxime bổ sung trong môi trường thạch sàng lọc ban đầu.

Thang và cs. (2016) phát hiện được 82,8% *E. coli* sản sinh ESBL từ các chủng *E. coli* kháng cefotaxime (1mg/l) phân lập được trên mẫu phân người khỏe mạnh tại Thái Bình. Việc phát hiện *E. coli* sinh ESBL với tỷ lệ cao cả ở người khỏe mạnh và vật nuôi ở nước ta là bằng chứng của sự truyền lây vi khuẩn kháng thuốc và nhóm gen kháng (ESBLs) giữa các loài vi khuẩn gây bệnh, giữa vật nuôi và người. Nhiễm vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL đa kháng kháng sinh với nhiều loại thuốc sẽ gây ra những thiệt hại trầm trọng về kinh tế và đe dọa sức khỏe cộng đồng. Việc nâng cao nhận thức về sử dụng kháng sinh thận trọng trong chăn nuôi là hết sức cần thiết nhằm giảm thiểu tỷ lệ vi khuẩn kháng thuốc/ truyền lây gen kháng của vi khuẩn gây bệnh.

3.2. Đặc điểm kiểu gen kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* sản sinh ESBL phân lập được

Kết quả giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequencing) của 43 chủng *E. coli* sản sinh ESBL có kiểu hình kháng khác nhau được trình bày tại bảng 2.

Các gen kháng nhóm kháng sinh β -lactam phổ rộng rất đa dạng, bao gồm *blaCTX-M-55* (22/43), *blaCTX-M-14* (10/43), *blaCTX-M-27* (5/43), *blaOXA-10* (4/43), *blaCTX-15* (2/43) và *blaCTX-M-65* (1/43). Bốn chủng mang gen *blaOXA-10* trong đó có 2 chủng mang gen *blaCTX-M-55*, 2 chủng mang gen *blaCTX-M-27*. Một chủng mang gen *blaCTX-M-14* đồng thời mang gen *AmpC* (*blaDHA-1*).

Mười tám trong tổng số 43 chủng *E. coli* sản sinh ESBL mang gen kháng colistin bao gồm 4 chủng mang gen *blaCTX-M-14*, 14 chủng mang gen *blaCTX-M-55*, 18 chủng này đều mang gen *mcr1*, trong đó có 4 chủng mang đồng thời cả gen *mcr3*. Ba chủng chỉ mang gen *mcr1* có xuất hiện đột biến trên gen *pmrB* tại vị trí p.V161G (V>G) mã hóa cho kháng colistin. Tuy nhiên có 1 chủng xuất hiện đột biến trên *pmrB* nhưng cho kết quả mẫn cảm với colistin.

Các chủng *E. coli* sản sinh ESBL trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng colistin ở mức cao (48,3%) trong đó 17/43 (39,5%) chủng mang gen *mcr1*, 3 chủng mang đồng thời cả hai gen kháng *mcr3* và *mcr1* và một chủng mang cả hai gen *mcr1* và *mcr4*. Tác giả Kawahara và cs. (2019) chỉ ra đây là các gen kháng phổ biến được tìm thấy trên lợn và gà tại Việt Nam. Nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên phát hiện sự đột biến trên gen *pmrB* tạo nên tính kháng colistin của vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ lợn ở Việt Nam.

Sáu loại gen kháng quinolone từ plasmid (PMQR) bao gồm *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB19*, *qnrS1*, *qnrS4* và *qnrS5* được tìm thấy trong 41/43 (95,3%) chủng *E. coli* sản sinh ESBL. Trong đó 29 chủng mang gen *qnrS1* và 21 chủng mang nhiều hơn 1 loại gen PMQR, ví dụ chủng Ec60 phân lập từ trại E01 mang đồng thời gen *qnrS1* và *qnrB19*, chủng Ec_130 phân lập từ trại B09 mang gen *qnrB6* and *qnrS1* (bảng 2). Các vùng đột biến tạo nên tính kháng quinolone (QRDR) của gen topoisomerase được tìm thấy trong 51% (22/43) tổng số chủng, dẫn đến sự thay đổi amino acid trên các protein *gyrA* [Ser83→Leu (n = 19), Asp87→Asn (n = 9), Asp87→Gly (n = 1)], *parC* [Ser80→Ile (n = 11), Ser56→Thr (n = 3), Ser57→Thr (n = 1)] và *parE* [Ser458→Ala (n = 1)].

Mười chín loại gen kháng aminoglycosides được tìm thấy trong 24 chủng *E. coli* sản sinh ESBL. Các gen kháng aminoglycoside bao gồm *aadA1*, *aph(3)-IIa*, *aph(6)-Id*, *aac(3)-IId* và *aadA2*. Hai chủng (Ec_168 và Ec_447) mang 2

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu kiểu hình và kiểu gen kháng kháng sinh nhóm β -lactamase, colistin và quinolone của một số chủng *E. coli* sản sinh ESBL phân lập được

Ký hiệu hộ chăn nuôi	Kháng β - lactamase			Kháng colistin			Kháng quinolone		
	Kiểu hình	Kiểu gen	Kiểu hình	Kiểu gen	Kiểu hình	Kiểu gen	Kiểu hình	Kiểu gen	
A-01	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-27, blaOXA-10</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
A-02	AMP, EFT, FOX, CRO/+	<i>blaCTX-M-55</i>	COL/-		NAL/+ , CIP/-				
A-03	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55</i>	COL/+	<i>mcr-1, mcr-3</i>	NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
A-04	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1, mcr-4</i>	NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
A-07	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-27</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
A-10	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+ , CIP/-		<i>qnrS1, gyrA p. S83L</i>		
A-18	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B</i>	COL/-	<i>pmrB p. V161G</i>	NAL/+ , CIP/-		<i>qnrS1, gyrA p. S83L</i>		
B-03	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+ , CIP/-		<i>gyrA p. S83L</i>		
B-05	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-27, blaOXA-10</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
B-08	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
B-09	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/+ , CIP/+		<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB6, qnrS1,</i>		
B-10	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B</i>	COL/-	<i>mcr-1</i>	NAL/+ , CIP/-		<i>qnrS1, gyrA p. S83L</i>		
B-14	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaOXA-10, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+ , CIP/+		<i>qnrS1, parC p. S80I, gyrA p. S83L</i>		
B-19	AMP, EFT, CRO, FOX, AMC/+	<i>blaCTX-M-55</i>	COL/+	<i>mcr-1, pmrB p. V161G</i>	NAL/+ , CIP/-		<i>gyrA p. S83L</i>		
B-26	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/+ , CIP/+		<i>gyrA p. S83L, gyrA p. D87N, parC p. S80I</i>		
C-05	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1, pmrB p. V161G</i>	NAL/+ , CIP/+		<i>parC p. A56T, parC p. S80I, gyrA p. S83L, gyrA p. D87N</i>		
C-07	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/+ , CIP/+		<i>gyrA p. S83L, gyrA p. D87N, parC p. S80I</i>		
C-08	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
C-09	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-65</i>	COL/-		NAL/+ , CIP/+		<i>parC p. A56T, parC p. S80I, gyrA p. S83L, gyrA p. D87N</i>		
C-10	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/+ , CIP/+		<i>parC p. S80I, gyrA p. S83L, gyrA p. D87N</i>		
C-11	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		
C-12	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/+ , CIP/-		<i>qnrS1</i>		
C-13	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-		<i>qnrS1</i>		

C-18	Ec_416 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-	<i>qnrS1</i>
C-22	Ec_426 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1, mcr-3</i>	NAL/+, CIP/+	<i>qnrS1, parC p.S57T, parC p.S80I, gyrA p.S83L, gyrA p.D87N</i>
C-24	Ec_431 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-27, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+, CIP/-	<i>qnrS1</i>
C-26	Ec_434 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/-, CIP/-	<i>qnrS1</i>
D-13	Ec_297 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+, CIP/+	<i>qnrS1, gyrA p.S83L, gyrA p.D87N, parE p.S458A, parC p.A56T, parC p.S80I</i>
E-01	Ec_60 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+, CIP/-	<i>qnrB19, qnrS1, gyrA p.S83L</i>
E-03	Ec_63 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+, CIP/-	<i>qnrS1, gyrA p.S83L</i>
E-04	Ec_67 ^p	AMP, EFT, CRO, FOX, AMC/+	<i>blaCTX-M-14, blaDHA-1</i>	COL/-		NAL/+, CIP/-	<i>qnrB4, gyrA p.S83L</i>
E-13	Ec_80 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1, mcr-3</i>	NAL/+, CIP/-	<i>qnrS1, gyrA p.S83L</i>
E-14	Ec_81 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+, CIP/-	<i>gyrA p.S83L</i>
E-14	Ec_447 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-	
E-15	Ec_83 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55, blaOXA-10</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-	<i>qnrS1</i>
E-17	Ec_442 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-55</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/+, CIP/+	<i>parC p.S80I, gyrA p.S83L, gyrA p.D87N</i>
E-20	Ec_452 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14, blaTEM-1B</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/+, CIP/-	<i>qnrS1, gyrA p.S83L</i>
E-21	Ec_457 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-14</i>	COL/+	<i>mcr-1</i>	NAL/-, CIP/-	<i>qnrS1</i>
E-26	Ec_467 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-27, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/+, CIP/-	<i>qnrS1</i>
E-27	Ec_472 ^p	AMP, EFT, CRO/+	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B</i>	COL/-		NAL/-, CIP/-	<i>qnrS1</i>

gen kháng aminoglycoside (*aadA1* và/hoặc *aadA2*) đều mắc cảm với kiểu hình kháng gentamycin (GEN) và streptomycin (STR). Gen *aac(6')* *Ib-cr* là gen kháng đồng thời aminoglycosides và quinolone được tìm thấy trên chủng Ec_130.

Các gen kháng sulfonamides bao gồm *sul1, sul2, sul3*, trong đó *sul3* là gen được tìm thấy phổ biến. Gen kháng trimethoprim được tìm thấy 42/43 chủng bao gồm *dfrA1, dfrA12, dfrA14, dfrA15, dfrA17*, và *dfrA27*. Gen *dfrA12, dfrA14* chiếm chủ yếu (n=20 và 19).

Gen kháng tetracycline bao gồm *tet(A), tet(B), tet(M)* và *tet(X4)*, trong đó *tet(A)* và *tet(M)* là gen chiếm số lượng lớn. Gen *tet(A)*

được tìm thấy trên 26 chủng trong khi *tet(M)* được tìm thấy trên 8 chủng. Một chủng Ec_9 có kiểu hình kháng tetracycline nhưng không phát hiện mang gen *tet*. Thêm vào đó, 37 chủng mang gen kháng chloramphenicol bao gồm *floR* (n=33) và *cmIA1* (n=24). Gen *erm(B), lnu(F), lnu(G), mdf(A), mef(B)* và *mph(A)* là gen kháng macrolide, trong đó *mdf(A)* được tìm thấy trong tất cả 43 chủng. Bên cạnh đó, 3 chủng mang gen kháng fosfomycin (*fosA3*) và 7 chủng mang gen kháng rifampicin (*aar2* hoặc *aar3*).

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có 18 chủng *E. coli* sản sinh ESBL đồng mang gen colistin (*mcr1* và *mcr3*) và gen kháng quinolone. Tỷ lệ kháng ciprofloxacin (37,9%) và nalidixic acid

(65,5%) là kháng sinh thuộc nhóm quinolone cao ở các chủng sản sinh ESBL trong nghiên cứu này. *QnrSI* và đột biến trên gen *gyrA*, *parC* chiếm tỷ lệ cao trong khi không có đột biến trên gen *gyrB*. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng chỉ một đột biến trên gen cũng đủ để vi khuẩn kháng quinolone, tương tự như các nghiên cứu trước đây (Teramae *et al.*, 2019). Sự xuất hiện tính kháng colistin và quinolone của các chủng *E. coli* sản sinh ESBL trong nghiên cứu này cho thấy mối nguy cơ ảnh hưởng tới sức khỏe cộng đồng do nhiễm *E. coli* mang gen kháng hai loại kháng sinh quan trọng này. Hầu hết các chủng kháng colistin mang gen *mcr1*, một vài chủng mang gen *mcr3*, một số khác mang đồng thời cả hai gen trên. Theo các tác giả Kawahara và cs. (2019), gen *mcr1* và *mcr3* cũng được phát hiện phổ biến ở lợn và gà tại Việt Nam. Tại nghiên cứu của chúng tôi, 13 chủng nhạy cảm với nalidixic acid và ciprofloxacin mang gen kháng quinolone và 2 chủng nhạy cảm với colistin mang gen kháng colistin được phát hiện, đã phản ánh phần nào về những hạn chế trong phương pháp xác định kiểu hình kháng có thể khiến một số chủng có gen kháng không được phát hiện.

Một số khảo sát trước đây cho thấy tổng lượng kháng sinh được dùng cho người và cho lợn ở Việt Nam cao gấp 2 lần so với các nước châu Âu (Carrique-mas *et al.*, 2020). Theo quan sát của chúng tôi, các kháng sinh thuộc nhóm quinolone (enrofloxacin, norfloxacin) được dùng khá phổ biến cho phòng và chữa tiêu chảy trên lợn con ở nước ta. Quan điểm về sử dụng kháng sinh để tăng sản lượng chăn nuôi, giảm tỉ lệ chết của vật nuôi là lý do cho việc lạm dụng kháng sinh ở Việt Nam (Jeamsripong *et al.*, 2019). Theo một báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới, những năm trước đây colistin là kháng sinh được dùng khá phổ biến cho phòng và điều trị bệnh tại Việt Nam (SCOH, 2015). Việc không cho phép sử dụng colistin trong phòng và thậm trọng sử dụng trong điều trị bệnh ở vật nuôi là hết sức cần thiết nhằm ngăn chặn nguy cơ kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh đối với các nhóm kháng sinh quan trọng này.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cập nhật tỷ lệ kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* kháng cefotaxime phân lập từ chất thải lợn và giải trình tự toàn bộ hệ gen của 43 chủng *E. coli* sản sinh ESBL có kiểu hình kháng khác nhau nhằm xác định đa dạng gen kháng đối với colistin, cephalosporin và quinolone, và một số kháng sinh khác. Kết quả giải trình tự phát hiện gen kháng/cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli* tại nghiên cứu này là căn cứ để tiếp tục đánh giá nguy cơ lây truyền gen kháng thuốc giữa vật nuôi và người ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu về tỷ lệ kháng và đa dạng gen kháng là bộ số liệu khoa học tin cậy phục vụ Chương trình hành động quốc gia về kiểm soát vi khuẩn kháng thuốc tại Việt Nam được Bộ NN & PTNT phê duyệt tháng 7/2017.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals.
2. Carrique-mas JJ, Choisy M, Cuong NV., 2020. An estimation of total antimicrobial usage in humans and animals in Vietnam. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 9 (16). <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0671-7>.
3. Chi Mai VT, Huỳnh Hoa NT, Ngọc Giao LK và cs., 2010. Trục khuẩn đường ruột tiết β -lactamase phổ rộng (ESBL) gây nhiễm khuẩn và chiếm cư đường ruột phân lập tại bệnh viện Chợ Rẫy. *Y Học TP. Hồ Chí Minh* 14 (1): 865–889.
4. Coyne L, Arief R, Benigno C, Giang VN, Hương LQ *et al.*, 2019. Characterizing antimicrobial use in the livestock sector in three south east Asian countries (Indonesia, Thailand and Vietnam). *Journal Mapi* 8 (33). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010033>.
5. Consultant's report of project (SCOH). Strengthening capacity for the implementation of one health in Vietnam

- 2015: Investigating the use of antibiotics in livestock production within Viet Nam.
6. David L, Paterson MD., 2006. Esistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control* 34 (5): S20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.238>.
 7. Dương TTQ, Ngọc PT, Thuy NC, Sơn ĐTT *et al.*, 2016. Tình hình nhiễm *E. coli* sản sinh men β -lactamases (ESBL) tại một số cơ sở giết mổ lợn trên địa bàn thành phố Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y* 13 (7): 60–67.
 8. EUCAST, 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection* 9 (8): 1–7.
 9. Hinenoya A, Suong TTT, Ngu AT *et al.*, 2018. Isolation and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* from industrial food animals in Mekong Delta, Vietnam. *The Japanese Journal of Veterinary Research* 66 (1): 1–12.
 10. Hudzicki, Jan, 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *J. American Society for Microbiology*, no. December 2009: 1–23.
 11. Kawahara R, Fujiya Y, Yamaguchi T, Diep KT., 2019. Most comestic livestock possess colistin-resistant commensal *Escherichia coli* harboring *mcr* in a rural community in Vietnam. *J. Antimicrob Agent Chemotherapy* 63 (6): e00594-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00594-19>.
 12. Korggaard H, Henlus AE, Pedersen KSS., 2017. Danmap 2017. use of antimicrobial Agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. *Miceobiology and Infection Control*, no. ISSN 1600-2032.
 13. Sơn ĐTT, Nhật TT, Dương TTQD *et al.*, 2017. Nghiên cứu tỷ lệ sản sinh men extended-spectrum β -lactamases (ESBL) và phát hiện gen kháng cephalosporin của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ chất thải lợn tại một số địa phương. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y* 14 (2): 40–48.
 14. Teramae M, Osawa K, Shigemura K *et al.*, 2019. Prevalence of quinolone resistance of *Escherichia coli* with ST131- FimH30 in a city hospital in Hyogo , Japan. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (20): 5162. <https://doi.org/10.3390/ijms20205162>.
 15. Thắng NN, Hòa TT, Hoa NT và cs., 2016. Độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* sinh beta-lactamase phổ rộng (ESBL) phân lập ở người khỏe mạnh tại xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, Thái Bình. *Tạp chí Sinh học* 39 (1): 96–101. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v39n1.8395>.
 16. Zurfluh K, Abgottspon H, Hachler H *et al.*, 2014. Quinolone resistance mechanisms among extended- spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. *Plos One* 9 (4): e95864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095864>.

Ngày nhận 5-6-2020

Ngày phản biện 25-1-2021

Ngày đăng 1-3-2021