

Đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người khỏe mạnh, phân động vật nuôi, thức ăn và nước tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam

Nguyễn Thị Tuyết Mai^{1*}, Vũ Thị Ngọc Bích², Vũ Thị Tường Vân¹, Trần Huy Hoàng^{3,4}

¹Bệnh viện Bạch Mai

²Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford, Hà Nội

³Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

⁴Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 15/3/2022; ngày chuyển phản biện 18/3/2022; ngày nhận phản biện 11/4/2022; ngày chấp nhận đăng 14/4/2022

Tóm tắt:

Colistin là kháng sinh ưu tiên quan trọng được sử dụng cho các trường hợp nhiễm khuẩn gram âm đường ruột kháng carbapenem. Các chủng *E. coli* mang gen kháng colistin (*mcr-1*) được ghi nhận trên toàn thế giới ở cả người, động vật và môi trường với các cơ chế kháng rất đa dạng từ kháng nội tại, đột biến và vận chuyển gen [1]. Xác định các đặc điểm dịch tễ học về tình trạng lây lan giữa các chủng có chứa *mcr-1* là vấn đề rất cần thiết. Giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* phân lập từ bệnh phẩm phân người khỏe mạnh và môi trường từ cộng đồng cho thấy, gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập từ cộng đồng trong nghiên cứu nằm trên cả nhiễm sắc thể (NST) và plasmid, tỷ lệ gen *mcr-1* nằm trên plasmid cao hơn nhiều so với nằm trên NST (71,3% so với 26,4%, $p < 0,001$). 100% chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có subtype *mcr-1.1*. Các plasmid có kích thước rất đa dạng (từ <50 kb đến >300 kb). Có 7 loại replicon đơn mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng, bao gồm IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%), IncFIA (n=3, 4,7%), IncHI1B (n=3, 4,7%), IncN (n=1, 1,6%) và IncX1 (n=1, 1,6%), được tìm thấy ở người, động vật và nước. Có 21 loại multi-replicon khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2 được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* ở người, động vật và nước. Có 56 sequence types (STs) khác nhau, trong đó ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%) là các STs thường gặp.

Từ khóa: *E. coli*, *mcr-1*, plasmid, STs.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Colistin là kháng sinh thuộc nhóm polymycin E, có nhiều độc tính trên thận, ít được sử dụng trên người và được sử dụng nhiều trong chăn nuôi từ những năm 70 của thế kỷ trước để điều trị và dự phòng các bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn gram âm ở động vật. Sự xuất hiện và ngày càng gia tăng các chủng vi khuẩn gram âm, đường ruột đa kháng, bao gồm kháng carbapenem dẫn đến việc đưa vào sử dụng colistin trở lại như là một “kháng sinh lựa chọn cuối cùng” để điều trị khi chúng ta đang cạn kiệt những giải pháp thay thế khả thi do chưa có các dòng kháng sinh mới [2, 3]. Chính vì vậy, việc dự phòng và giảm thiểu khả năng kháng colistin trên người hiện nay là một vấn đề cần thiết nhằm bảo toàn tác dụng của colistin.

Colistin đã được sử dụng một thời gian dài ở động vật, do vậy cũng đã tồn tại nhiều chủng kháng colistin xuất phát từ động vật. Y.Y. Liu và cs (2016) [4] đã xác định được gen

mcr-1 nằm trên plasmid kháng colistin phân lập từ thịt lợn và người tại Trung Quốc. Cho đến nay, các chủng vi khuẩn gram âm kháng colistin được ghi nhận trên toàn thế giới ở cả người, động vật và môi trường với các cơ chế kháng rất đa dạng từ kháng nội tại, đột biến và vận chuyển gen [1]. Việc hiểu đầy đủ dịch tễ học về tình trạng lây lan giữa các chủng có chứa gen *mcr-1* và tìm kiếm sự hiện diện các bằng chứng về kháng kháng sinh của các chủng này trong hệ vi sinh vật đường ruột của cả động vật và con người, môi trường sinh hoạt xung quanh, mối liên quan giữa chúng là rất cần thiết để có bằng chứng khoa học giúp đưa ra các giải pháp tối ưu nhằm giảm thiểu tình trạng kháng thuốc hiện nay. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm mục tiêu: 1) Xác định đặc điểm của gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được từ phân người, phân động vật và môi trường; 2) Xác định một số đặc điểm dịch tễ phân tử của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được trong nghiên cứu.

*Tác giả liên hệ: Email: ntm3@bachmai.edu.vn

Molecular epidemiological characteristics of *E. coli* strains carrying the *mcr-1* gene isolated from healthy human feces, domestic animal feces, food and water in Thanh Ha commune, Thanh Liem district, Ha Nam province

Thi Tuyen Mai Nguyen^{1*}, Thi Ngoc Bich Vu²,
Thi Tuong Van Vu¹, Huy Hoang Tran^{3,4}

¹Bach Mai Hospital

²Oxford University Clinical Research Unit - Vietnam, Hanoi

³National Institute of Hygiene and Epidemiology

⁴Hanoi Medical University

Received 15 March 2022; revised 11 April 2022; accepted 14 April 2022

Abstract:

Colistin is a critically important antimicrobial for the treatment of carbapenem-resistant gram-negative intestinal infections. *E. coli* strains carrying the colistin-resistant mediated colistin resistance (*mcr-1*) gene have been globally distributed, found in humans, animals and the environment with diverse resistance mechanisms, namely intrinsic, mutation, and horizontal gene transfer [1]. Evaluation of the epidemiological characteristics and transmission status of *E. coli* strains to carry the *mcr-1* gene is urgent. Sequencing results of 87 community *E. coli* strains isolated from healthy human feces and environment showed that the *mcr-1* gene of these strains in the study was found on both chromosomes and plasmids, the ratio of *mcr-1* plasmid-mediated is much higher than on the chromosome (71.3% vs 26.4%, $p < 0.001$). 100% of *E. coli* strains that carry the *mcr-1* gene were subtype *mcr-1.1*. The plasmids diversified in size (from <50 kb to >300 kb). There were 7 types of single replicon carrying *mcr-1* gene detected from 29 strains, including IncI2 (n=7, 10.9%), IncP (n=7, 10.9%), IncX4 (n=5, 7.8%), IncFIA (n=3, 4.7%), IncHI1B (n=3, 4.7%), IncN (n=1, 1.6%) and IncX1 (n=1, 1.6%), were found in healthy humans feces, animals and household water. There were also 21 different multi-replicons with combinations of IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 and IncI2 plasmids, found in 31 strains of *E. coli* in humans, animals and water. Strains were classified into 56 different sequence types (STs). ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) and ST206 (n=8, 8%) were common STs.

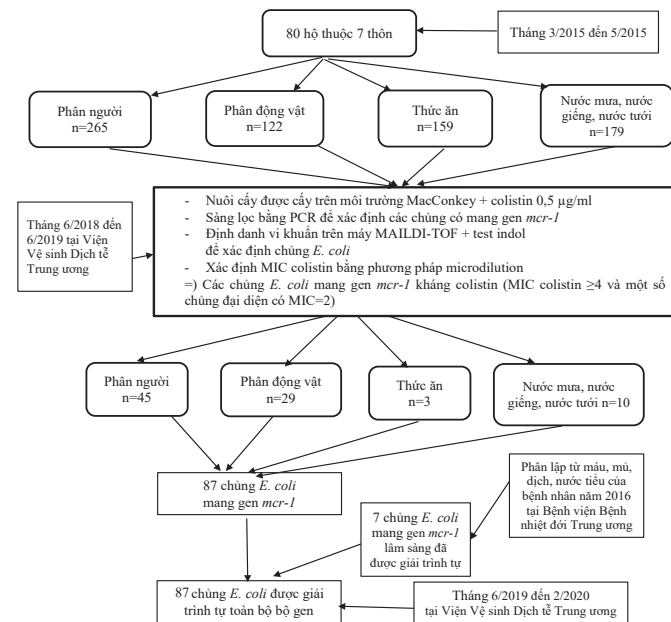
Keywords: *E. coli*, *mcr-1*, plasmid, STs.

Classification number: 3.1

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng, thời gian và địa điểm

Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu được tóm tắt theo sơ đồ dưới đây:



Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang, thu thập mẫu nghiên cứu có chủ đích dựa trên công thức tính cỡ mẫu:

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

trong đó: n là số chủng cần nghiên cứu; p là tỷ lệ dự đoán; $Z_{(1-\alpha/2)}$ là hệ số tin cậy, với độ tin cậy là 95% ($Z_{1-\alpha/2} = 1,96$); d là độ chính xác tuyệt đối.

Trang thiết bị và vật tư tiêu hao

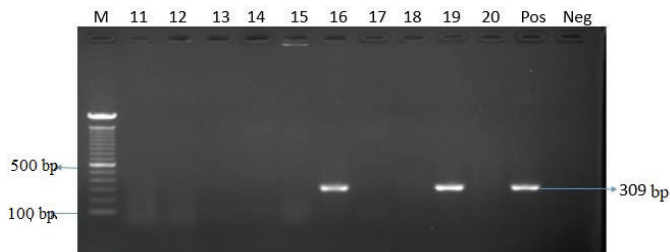
Sinh phẩm: MacConkey (Oxoid, Vương quốc Anh), thạch thường (Sigma), bột colistin (Sigma) sử dụng trong nuôi cấy và định danh vi khuẩn. 2X Go-taq Master-Mix (GoTaq® DNA Polymerase, Promega) sử dụng trong phản ứng PCR tìm *mcr-1*. Nextera XT kit (Illumina, San Diego, California, Mỹ) sử dụng trong tinh sạch DNA chuẩn bị thư viện cho giải trình tự. Miseq reagent kit V3 (Illumina) sử dụng để giải trình tự gen.

Chủng chuẩn: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC 13846™ sử dụng làm quản lý chất lượng (quality control - QC) trong kỹ thuật đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), chủng *E. coli* J53 sử dụng trong kỹ thuật tiếp hợp.

Thiết bị: máy định danh Maldi-Tof (Bruker, Đức), máy PCR, máy giải trình tự Illumina Miseq.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

Kỹ thuật PCR phát hiện gen *mcr-1*: Tách chiết DNA bằng nhiệt. Trình tự của mỗi như sau: *mcr-1* F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3'); *mcr-1* R (5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3') [4]. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: biến tính: 94°C, gắn môi: 5°C, tổng hợp chuỗi: 72°C, 30 chu kỳ. Sản phẩm gen *mcr-1* có kích thước 309 bp. Kiểm soát chất lượng của phản ứng PCR bằng chứng dương và chứng âm. Chứng dương *mcr-1* là DNA khuôn mẫu tách chiết từ chủng *E. coli* SHP45 mang gen *mcr-1*, chứng âm là nước siêu sạch. Hình minh họa kết quả PCR được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Hình minh họa kết quả PCR phát hiện gen *mcr-1*.

Kỹ thuật định danh vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn cần định danh được cấy vào các đĩa thạch thường, ủ ở 37°C trong 18 đến 24 giờ. Khuẩn lạc thuần mọc trên đĩa thạch Nutrient agar được lựa chọn và tiến hành định danh trên máy Maldi Tof và làm test indol để xác định *E. coli*.

Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen (WGS): Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Luria bertani broth ở 37°C, từ 18 đến 24 giờ. Tách DNA tổng số bằng hệ thống tách chiết tự động QIAcube (Qiagen). Định lượng DNA bằng kit Barteria DNA Prep và máy đo nồng độ Qubit (ThermoFisher Scientific). Thiết lập thư viện DNA sử dụng kit NexteraXT (Illumina) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giải trình tự các gen bằng máy MiSeq (Illumina) dùng kit MiSeq Reagent V3 Kit, 2x150 bp). Dữ liệu thu được được phân tích trên các phần mềm và công cụ tin sinh: lắp ráp De novo trên SPAdes v3.14.1. Một số công cụ phân tích tin sinh được sử dụng: NCBI Procaroyotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD).

Kỹ thuật tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen *mcr-1* qua plasmid: Chủng nhận *E. coli* J53 không chứa gen *mcr-1* có thể mọc trên môi trường có chứa sodium azide. Chủng cho là các chủng *E. coli* có plasmid mang gen *mcr-1* kháng colistin. Các chủng cho và nhận được tạo điều kiện tiếp hợp với nhau. Các chủng *E. coli* J53 sau khi tiếp hợp với chủng nhận sẽ truyền plasmid có chứa gen *mcr-1* từ chủng nhận tạo nên chủng mới *E. coli* J53 có mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid (mọc được trên môi trường MacConkey có muối azua (NaN₃) + 2 µg/ml colistin). Xác định gen *mcr-1* của các chủng J53 sau tiếp hợp bằng kỹ thuật PCR.

Kết quả

Đặc điểm của gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được từ phân người khỏe mạnh, phân động vật, thức ăn và nước

Kết quả giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng mang gen *mcr-1* cho thấy số lượng gen *mcr-1* nằm trên plasmid và NST được phân bố.

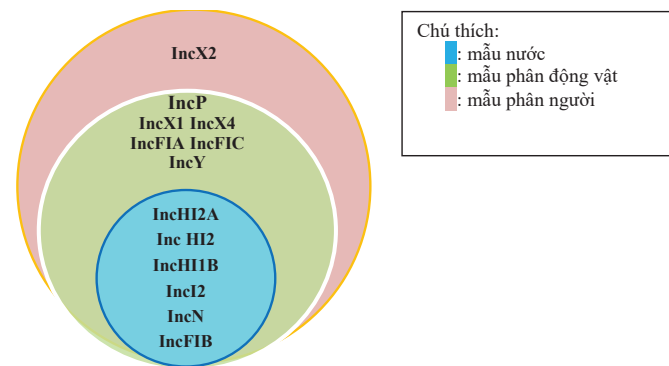
Bảng 1. Sự phân bố của gen *mcr-1* nằm trên NST và plasmid của các chủng *E. coli*.

Loại mẫu	<i>mcr-1</i> subtype	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên NST	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên plasmid	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên NST và plasmid	Tổng số
Phân người	<i>mcr-1.1</i>	10	35	0	45
Phân động vật	<i>mcr-1.1</i>	5	23	1	29
Thức ăn	<i>mcr-1.1</i>	3	0	0	3
Môi trường	<i>mcr-1.1</i>	5	4	1	10
Tổng số	<i>mcr-1.1</i>	23	62	2	87

Gen *mcr-1* kháng colistin ở các chủng *E. coli* được tìm thấy ở cả trên NST và plasmid. Số lượng gen *mcr-1* nằm trên plasmid chiếm 71,3% (n=62) và trên NST là 26,4% (n=23) (bảng 1). Đặc biệt, có 2 chủng có gen *mcr-1* nằm cả trên NST và plasmid, trong đó 1 chủng phân lập từ nước và 1 chủng từ động vật chiếm tỷ lệ 2,3%. 100% gen *mcr-1* có subtype là *mcr-1.1*

Các loại plasmid mang gen *mcr-1*

Giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bằng phương pháp short read đã xác định được 64 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid. Nghiên cứu đã xác định được 13 loại plasmid mang gen *mcr-1*, trong đó ở nước là 6 loại, phân động vật 12 loại và phân người lành 13 loại (hình 2).



Hình 2. Biểu đồ Venn các loại replicon của plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli*. Các replicon nằm ở các đường tròn khác nhau là các replicon của các plasmid nằm trên các loại mẫu khác nhau.

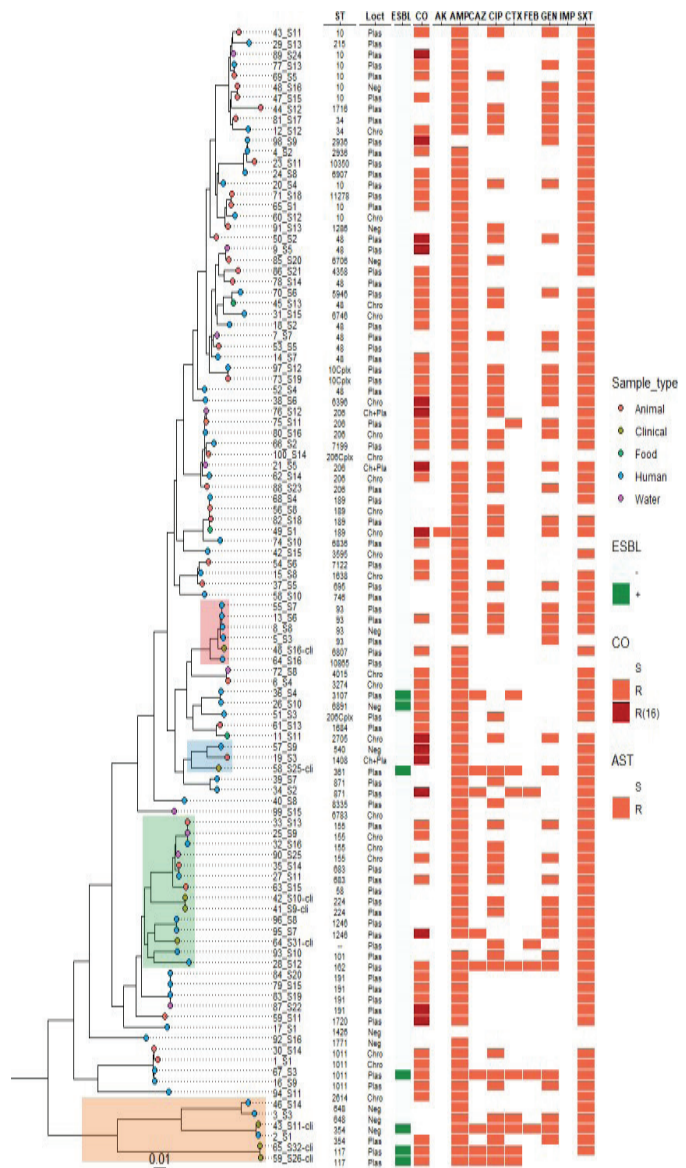
Kết quả hình 2 cho thấy, có 6 loại replicon của plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập từ các mẫu nước, 6 loại này cũng được tìm thấy ở các chủng *E. coli* phân lập từ phân động vật và phân người. Các chủng *E. coli* phân lập từ phân người lành và phân động vật đều có chung 12 loại plasmid mang gen *mcr-1*. Có 1 loại plasmid mang gen *mcr-1* (IncX2) chỉ có ở chủng phân lập từ phân người.

Sự kết hợp của các loại replicon đơn trên tạo ra 21 loại multireplicon plasmid khác nhau. Các replicon đơn thường gặp trong cộng đồng là IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%) (bảng 2).

Bảng 2. Các loại plasmid của 64 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu.

STT	Replicon_formula (in silico)	Số chủng (short read)	Kích thước (Kb)	Loại mẫu
1	IncFIA	3	150-300	Phân người + động vật
2	IncFIA : IncFIC : rep2327	1	50-100	Phân động vật
3	IncFIB : IncHI1B	2	100-150	Phân động vật + nước
4	IncFIB : IncHI1B : IncHI1B	2	150-200	Phân người + động vật
5	IncFIB : IncHI1B : IncHI1B : IncN	1	100-150	Phân động vật
6	IncFIB : IncHI1B : IncHI2A : IncHI2 : IncN	1	>300	Phân người
7	IncFIB : IncHI1B : IncN	2	50-150	Phân người + động vật
8	IncFIB : IncI2	1	<50	Phân người
9	IncFIC : rep2244 : IncHI2A : IncHI2	1	>300	Phân người
10	IncHI1B	3	50-100	Phân người + nước
11	IncHI1B : IncHI1B	1	100-150	Phân người
12	IncHI1B : IncHI1B : rep2327	1	50-100	Phân người
13	IncHI1B : IncHI2A : IncHI2	1	200-300	Phân động vật
14	IncHI1B : IncHI2A : IncHI2 : IncN	4	>300	Phân người + động vật
15	IncHI1B : IncX1	2	100-150	Phân người + động vật
16	IncHI1B : IncX2	1	100-150	Phân người
17	IncHI1B : rep2327	1	100-150	Phân động vật
18	IncHI2A : IncHI2	3	200-300	Phân người + động vật
19	IncHI2A : IncHI2 : IncI2	2	>300	Phân người
20	IncHI2A : IncHI2 : IncN	1	200-300	Nước
21	IncHI2A : IncHI2 : IncY	2	200-300	Phân người + động vật
22	IncHI2A : IncI2 : IncN : IncHI2	1	200-300	Phân người
23	IncI2	7	50-100	Phân người + động vật + nước
24	IncN	1	50-100	Phân động vật
25	IncP	7	50-100	Phân người + động vật
26	IncX1	1	<50	Phân người
27	IncX4	5	<50	Phân người + động vật
28	undetected	6	<50	Phân người + động vật

Khi phân tích mối quan hệ kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lành, phân động vật, thức ăn và môi trường từ kết quả của giải trình tự gen của 87 chủng trong nghiên cứu, để có thể làm rõ thêm mối liên hệ giữa các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng và lâm sàng, chúng tôi có kết hợp với các dữ liệu từ kết quả giải trình tự gen của 7 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên lâm sàng được phân lập từ các bệnh phẩm. Cây phân loài thể hiện mối quan hệ kiểu gen giữa các chủng được thể hiện ở hình 3:



Hình 3. Cây phân loài của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*.

Kết quả hình 3 cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lành, phân động vật và môi trường nước có sự phân bố rất đa dạng về kiểu gen. Có 56 STs khác nhau. STs thường gặp bao gồm ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%).

Bảng 3. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có kiểu trình tự chung được phân loại từ các loại mẫu trong cùng hộ gia đình.

Kiểu trình tự (STs)	Mã hộ	STT	Loại mẫu	<i>mcr-1</i> NST/ <i>mcr-1</i> plasmid	Loại plasmid mang gen <i>mcr-1</i>
155	H137	32	Phân người lành	NST	
		33	Phân động vật	Plasmid	IncHI1B, IncX1
10	H154	47	Phân động vật	Plasmid	IncI2
		48	Phân động vật	Plasmid	IncI2
48	H175	52	Phân người lành	Plasmid	IncHI1B, IncHI2A, IncN
		53	Phân động vật	Plasmid	IncX4
206	H275	75	Phân động vật	Plasmid	IncI2
		76	Nước	Plasmid	IncI2
191	H314	83	Phân người lành	Plasmid	IncHI1B, IncHI2A
		84	Phân người lành	Plasmid	IncHI2, IncN
		87	Nước	Plasmid	IncHI2A, IncHI2, IncN

Kết quả bảng 3 cho thấy, có 5/80 hộ có tìm thấy các chủng có cùng ST được phân lập từ các loại mẫu khác nhau như từ mẫu của người - động vật, mẫu động vật - nước, mẫu người - người và mẫu từ người - nước trong cùng một hộ gia đình

Kết quả tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen *mcr-1* qua plasmid

Nghiên cứu lựa chọn 24 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* đã được xác định nằm trên plasmid thông qua giải trình tự short read để làm thực nghiệm tiếp hợp đánh giá sự lan truyền *mcr-1* qua plasmid. Kết quả thu được 24 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được tiếp hợp với các chủng nhận là *E. coli* J53. Có 70,83% (n=17) chủng *E. coli* truyền thành công gen *mcr-1* sang chủng nhận *E. coli* J53 (bảng 4). Các plasmid mang gen *mcr-1* này bao gồm 13 loại replicon plasmid trong hình 2 được phân lập từ phân người, phân động vật và nước.

Bảng 4. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được thực hiện kỹ thuật tiếp hợp.

Mã mẫu	Loại mẫu	Loại plasmid mang <i>mcr-1</i>	Kết quả <i>mcr-1</i> của <i>E. coli</i> J53	Mã mẫu	Loại mẫu	Loại plasmid mang <i>mcr-1</i>	Kết quả <i>mcr-1</i> của <i>E. coli</i> J53
4	Phân người	IncHI1B, IncX1	+	44	Phân động vật	-	+
7	Nước	IncHI2A, IncHI2	+	47	Phân động vật	IncI2	+
11	Nước	-	+	50	Phân động vật	IncFIB, IncHI1B	+
13	Phân người	-	+	53	Phân động vật	IncX4	(-)
16	Phân người	IncX4	+	54	Phân động vật	IncFIA, IncFIC, rep_cluster_2327	+
19	Phân động vật	IncP	+	59	Phân động vật	IncFIA	+
21	Nước	-	(-)	74	Phân người	rep_cluster_312	+
23	Phân động vật	IncFIB, IncHI1B, IncHI2A, IncN	(-)	76	Nước	IncI2	(-)
27	Phân người	IncHI1B, IncHI1B, rep_cluster_2327	+	78	Phân động vật	IncP	+
34	Phân người	IncP	(-)	79	Phân người	IncFIB, IncHI1B, IncHI2A, IncHI2, IncN	+
37	Phân người	-	(-)	86	Phân động vật	IncHI1B, IncHI2A, IncHI2	+
40	Phân người	IncFIA	(-)	89	Nước	IncFIB, IncHI1B	+

Kết quả bảng 4 cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên single-replicon và multi-replicon đều có khả năng truyền ngang gen *mcr-1* sang chủng khác qua hình thức tiếp hợp. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ người, động vật và nước đều có khả năng lan truyền qua hình thức tiếp hợp.

Bàn luận

Đặc điểm của gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được từ phân người khỏe mạnh, phân động vật, thức ăn và nước

Khi giải trình tự toàn bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*, nghiên cứu của chúng tôi xác định được gen *mcr-1* nằm trên cả NST và plasmid, tuy nhiên tỷ lệ gen *mcr-1* nằm trên plasmid cao hơn nhiều so với nằm trên NST (71,3% so với 26,4%, p<0,001). Toàn bộ 87 chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có phân nhóm là *mcr-1.1*. Nghiên cứu của chúng tôi cũng xác định được 2 chủng *E. coli* có gen *mcr-1* nằm trên cả NST và plasmid, bao gồm 1 chủng phân lập từ phân động vật và 1 chủng phân lập từ nước.

Gen *mcr-1* kháng colistin nằm trên plasmid ở các chủng vi khuẩn gram âm đường ruột phân lập từ động vật và người được phát hiện từ NST của các trực khuẩn gram âm đường ruột, phổ biến nhất là *E. coli* phân lập từ động vật sống trong các trang trại và người lành [5, 6]. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu đã phát hiện gen *mcr-1* nằm trên NST của *E. coli* phân lập từ người bệnh và người lành [7, 8]. Nghiên cứu của T. Yamaguchi và cs (2020) [7] trên cộng đồng tại tỉnh Thái Bình cho thấy, tỷ lệ gen *mcr-1* kháng colistin nằm trên NST của các chủng *E. coli* phân lập từ phân người khỏe mạnh cũng khá cao (36,8%).

Các gen kháng kháng sinh nằm trên NST sẽ lan truyền dọc gen kháng trong cùng loài, tốc độ lây truyền chậm hơn các gen kháng kháng sinh nằm trên plasmid. Gen kháng kháng sinh nằm trên plasmid sẽ lan truyền gen kháng sang các loài khác và tốc độ lan truyền nhanh. Gen *mcr-1* được tìm thấy cả ở NST và plasmid, thậm chí trong nghiên cứu của chúng tôi còn tìm thấy 2,3% chủng *E. coli* có gen này nằm đồng thời cả trên NST và plasmid. Điều này cho thấy, gen *mcr-1* có đường lan truyền rất linh hoạt và đa dạng có thể lan truyền cả cho cùng loài và khác loài, vì vậy có thể làm cho tốc độ lan truyền cũng tăng lên.

Để đánh giá tính linh hoạt và đa dạng khi lan truyền gen kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin trong cộng đồng, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu về đặc điểm của các loại plasmid mang gen *mcr-1*, mối liên hệ kiểu gen dựa vào phân tích MLST và đánh giá sự lan truyền qua plasmid thông qua thực nghiệm tiếp hợp.

Các loại plasmid mang gen *mcr-1*

Khi giải trình tự toàn bộ bộ gen của 64 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid trong nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được 13 loại replicon typing của plasmid mang gen *mcr-1*, trong đó các chủng phân lập từ phân người mang nhiều loại nhất (13 loại), sau đó đến phân động vật (12 loại) và nước (6 loại) (hình 2). Điều này cho thấy tính đa dạng của các plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* trong cộng đồng, thể hiện nhiều nhất trong cộng đồng người khỏe mạnh.

Các plasmid có kích thước rất đa dạng, nhỏ nhất là <50 kb, lớn nhất >300 Kb. Có 7 loại replicon đơn mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng trong các mẫu nghiên cứu, bao gồm là IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%), IncFIA (n=3, 4,7%), IncHI1B (n=3, 4,7%), IncN (n=1, 1,6%) và IncX1 (n=1, 1,6%) tìm thấy ở người, động vật và nước. Các loại multi-replicons plasmid mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu phát hiện được bao gồm sự kết hợp của các loại plasmid IncHI2, IncN, IncX1 và IncR. Có 21 loại multi-replicon khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2 được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* ở người, động vật và nước (bảng 2). Một lần nữa cho thấy tính đa dạng của các loại plasmid của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng, không chỉ ở động vật - đối tượng sử dụng colistin trong một thời gian dài mà còn tồn tại cả trong môi trường xung quanh (nước) và người khỏe mạnh mặc dù việc sử dụng colistin ở người hiện nay còn hạn chế. Chúng tôi đưa ra giả thiết rằng, nhờ tính đa dạng này mà làm cho gen *mcr-1* có đặc tính có thể dễ dàng lan truyền qua các plasmid từ động vật qua môi trường, thức ăn

lây sang người, đồng thời lây từ người sang người, điều này thể hiện ở tính đa dạng về các loại plasmid mang gen *mcr-1* trong cộng đồng từ người, động vật đến môi trường.

Một số nghiên cứu trong cộng đồng tại Trung Quốc, Hàn Quốc cũng đã ghi nhận nhiều loại plasmid khác nhau trong cộng đồng như IncI2, IncX4, IncN, IncF..., trong đó replicon IncI2 là loại thường gặp [9, 10]. Tại Việt Nam, một số đặc điểm vi sinh của *E. coli* sinh beta lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016 đã ghi nhận nhiều loại plasmid khác nhau trong cộng đồng nhưng loại chủ yếu thường gặp là IncF [11]. Sự khác biệt này có thể do nghiên cứu ở các cộng đồng khác nhau nên có thể có sự khác nhau về các loại plasmid mang gen *mcr-1*. Để chứng minh giả thuyết trên, chúng tôi tiếp tục tìm bằng chứng thông qua phân tích cây phân loài và thử nghiệm tiếp hợp.

Mối liên hệ kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lành, phân động vật, thức ăn và môi trường

Qua phân tích cây phân loài cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người lành, phân động vật, môi trường nước và 7 chủng phân lập từ lâm sàng cho thấy có sự phân bố rất đa dạng về kiểu gen. Trong 94 chủng (7 chủng phân lập từ bệnh phẩm lâm sàng), có 56 STs khác nhau. STs thường gặp bao gồm ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%). Các chủng lâm sàng cũng có các ST rất thay đổi. Không có ST của chủng lâm sàng nào được tìm thấy trong cộng đồng (hình 3).

Phân tích các STs theo hộ gia đình, nghiên cứu của chúng tôi tìm thấy có 4 nhóm mà các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ các nguồn khác nhau (phân người và/hoặc phân động vật và/hoặc nước) trong cùng một hộ gia đình có các STs giống nhau nằm trên cùng một nhánh của cây phân loài, gồm: cặp 32-33 của hộ H137-ST 155, cặp 47-48 của hộ H154, cặp 75-76 của hộ H275-ST206 và cặp 83-84-87 của hộ H314-ST191. Ngoài ra còn cặp 52-53 của hộ H175 đều có cùng ST10 tuy không trên cùng một nhánh nhưng có mối liên quan gần. Đây là bằng chứng chứng tỏ có sự lây lan của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cùng 1 hộ gia đình giữa động vật nuôi trong nhà và người qua môi trường (nước). Nghiên cứu của chúng tôi chưa tìm được bằng chứng lan truyền qua thức ăn có thể do số lượng chủng phân lập còn ít nên hạn chế sự phát hiện này.

Sự đa dạng về STs của các chủng này có thể giải thích do sự lan truyền qua plasmid. Khả năng lan truyền qua plasmid giữa các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được đã được chúng tôi chứng minh qua thử nghiệm tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen qua plasmid thông qua chủng *E. coli* J53.

Chúng tôi lựa chọn 24 chủng *E. coli* đã được xác định mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid bao gồm cả single replicon và multireplicon. Kết quả thử nghiệm tiếp hợp thành công truyền gen *mcr-1* sang chủng *E. coli* J53 (17/24 chủng, 70,8%).

Trên thế giới, có nhiều nghiên cứu đã mô tả sự đa dạng về các STs cũng như bằng chứng về sự lan truyền của gen *mcr-1* qua plasmid của các chủng *E. coli* trong cộng đồng tương tự như nghiên cứu của chúng tôi [6, 12]. Tuy nhiên, tại Việt Nam còn rất ít nghiên cứu trong cộng đồng về vấn đề này.

Kết luận

Qua giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu có phối hợp với dữ liệu giải trình tự của 7 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên lâm sàng cho thấy, các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập trong nghiên cứu nằm trên cả NST và plasmid, tỷ lệ gen *mcr-1* nằm trên plasmid cao hơn nằm trên NST (71,3% so với 26,4%, $p < 0,001$). Toàn bộ 87 chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có subtype *mcr-1.1*. Các plasmid có kích thước rất đa dạng, nhỏ nhất là < 50 kb, lớn nhất > 300 Kb. Có 7 loại replicon đơn mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng phân lập từ phân người, động vật và nước bao gồm: IncI2 (n=7, 10,9%), IncP (n=7, 10,9%), IncX4 (n=5, 7,8%), IncFIA (n=3, 4,7%), IncHI1B (n=3, 4,7%), IncN (n=1, 1,6%) và IncX1 (n=1, 1,6%). Có 21 loại multireplicon khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2, được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* phân lập từ phân người, động vật và nước. Có 56 STs khác nhau, trong đó ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%) là các STs thường gặp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của Quỹ NAFOSTED (mã số 108.02-2017.320). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] K. Jeannot, A. Bolard, P. Plésiat (2017), “Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **49(5)**, pp.526-535, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029.

[2] D. Yong, M.A. Toleman, C.G. Giske, et al. (2009), “Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53(12)**, pp.5046-5054, DOI: 10.1128/AAC.00774-09.

[3] M.E. Falagas, S.K. Kasiakou, L.D. Saravolatz (2005), “Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections”, *Clinical Infectious Diseases*, **40(9)**, pp.1333-1341, DOI: 10.1086/429323.

[4] Y.Y. Liu, Y. Wang, T.R. Walsh, et al. (2016), “Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study”, *The Lancet Infectious Diseases*, **16(2)**, pp.161-168, DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

[5] L.L. Zhong, H.T.T. Phan, C. Shen, et al. (2018), “High rates of human fecal carriage of *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* emerge in China in association with successful plasmid families”, *Clinical Infectious Diseases*, **66(5)**, pp.676-685, DOI: 10.1093/cid/cix885.

[6] A. Nakano, R. Nakano, R. Nishisouzu, et al. (2021), “Prevalence and relatedness of *mcr-1*-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from livestock and farmers in Japan”, *Frontiers in Microbiology*, **12**, DOI: 10.3389/fmicb.2021.664931.

[7] T. Yamaguchi, R. Kawahara, K. Hamamoto, et al. (2020), “High prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* with chromosomally carried *mcr-1* in healthy residents in Vietnam”, *mSphere*, **5(2)**, DOI: 10.1128/mSphere.00117-20.

[8] T. Tada, P.H. Nhung, K. Shimada, et al. (2017), “Emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates harboring *mcr-1* in Vietnam”, *International Journal of Infectious Diseases*, **63**, pp.72-73, DOI: 10.1016/j.ijid.2017.07.003.

[9] J.E. Dominguez, D. Faccone, N. Tijet, et al. (2019), “Characterization of *Escherichia coli* carrying *mcr-1*-plasmids recovered from food animals from Argentina”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **9**, DOI: 10.3389/fcimb.2019.00041.

[10] X. Lu, X. Xiao, Y. Liu, et al. (2020), “Widespread prevalence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* from Père David’s Deer in China”, *mSphere*, **5(6)**, DOI: 10.1128/mSphere.01221-20.

[11] Khổng Thị Điệp (2020), *Xác định một số đặc điểm vi sinh của Escherichia coli sinh beta lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016*, Luận án tiến sĩ, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

[12] F. Liu, R. Zhang, Y. Yang, et al. (2020), “Occurrence and molecular characteristics of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from healthy meat ducks in Shandong province of China”, *Animals*, **10(8)**, DOI: 10.3390/ani10081299.