

DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.058

TÌNH HÌNH NHIỄM *Escherichia coli* SINH BETA-LACTAMASE PHỔ RỘNG TRÊN NGƯỜI CHĂN NUÔI GÀ Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Bùi Thị Lê Minh*, Lưu Hữu Mạnh và Nguyễn Nhựt Xuân Dung

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Bùi Thị Lê Minh (email: btlminh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 18/06/2018

Ngày duyệt đăng: 03/08/2018

Title:

Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on chicken rearer in the Mekong Delta

Từ khóa:

E. coli, ESBL, gene CTX-M, gene TEM, người chăn nuôi gà

Keywords:

Chicken rearers, CTX-M gene, *E. coli*, ESBL, TEM gene

ABSTRACT

The study was carried out to investigate the presence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL *E. coli*) isolated from 80 fecal samples of chicken rearers in the Mekong Delta by the combination disc methods. The results showed that 62.5% samples infected ESBL-producing *E. coli*. One hundred and twenty-two ESBL *E. coli* isolates were selected for the antibiotic susceptibility test to 14 antibiotics by the disc diffusion method. The results showed that these isolates were resistant to 3-13 antibiotics. Resistance was most frequently observed to beta-lactams: ampicillin (96.67%), cefaclor (97.5%) and cefuroxime (100%). However, these isolates were still sensitive to amikacin (94.17%), fosfomycin (96.67%), colistin (83.33%) and doxycycline (70%). Twenty-one multidrug-resistant ESBL producing *E. coli* isolates were selected for the determination of beta-lactamase coding CTX-M and TEM genes by PCR method. The result showed that TEM gene and CTX-M gene were frequently detected in the tested isolates (100% and 90.5% respectively).

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát sự hiện diện của *E. coli* sinh beta-lactamase phổ rộng (*E. coli* sinh ESBL) phân lập từ 80 mẫu phân của người chăn nuôi gà ở Đồng bằng sông Cửu Long bằng phương pháp đĩa kết hợp. Kết quả nghiên cứu cho thấy 62,5% mẫu nhiễm *E. coli* sinh ESBL. Một trăm hai mươi hai chủng *E. coli* sinh ESBL được kiểm tra tính nhạy cảm với 14 loại kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng vi khuẩn này kháng từ 3-13 loại kháng sinh. Sự đề kháng cao nhất đối với các kháng sinh nhóm beta-lactam: ampicillin (96,67%), cefaclor (97,5%) và cefuroxime (100%). Tuy nhiên, các chủng vi khuẩn này vẫn còn nhạy cảm cao với kháng sinh amikacin (94,17%), fosfomycin (96,67%), colistin (83,33%) và doxycycline (70%). Hai mươi một chủng *E. coli* sinh ESBL đa kháng được chọn để xác định gene TEM và CTX-M mã hóa beta-lactamase phổ rộng bằng phương pháp PCR. Kết quả cho thấy tỉ lệ gene TEM và CTX-M được phát hiện nhiều ở các chủng kiểm tra (lần lượt là 100% và 90,5%).

Trích dẫn: Bùi Thị Lê Minh, Lưu Hữu Mạnh và Nguyễn Nhựt Xuân Dung, 2018. Tình hình nhiễm *Escherichia coli* sinh beta-lactamase phổ rộng trên người chăn nuôi gà ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Nông nghiệp): 1-5.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Escherichia coli (*E. coli*) là một vi khuẩn phổ biến ở môi trường, thức ăn, nước uống, cơ thể động vật và người. Hầu hết các vi khuẩn *E. coli* không gây hại và đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự cân bằng sinh lý tự nhiên ở đường ruột của người và động vật khỏe mạnh. Khi sức đề kháng của cơ thể bị giảm sút, các chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh sẽ phát triển mạnh và gây bệnh cho con người và vật nuôi. Ở người, vi khuẩn *E. coli* không chỉ gây viêm ruột, tiêu chảy mà còn gây nhiễm trùng đường tiết niệu, viêm màng não sơ sinh, viêm phổi và nhiễm trùng nơi phẫu thuật. Tỷ lệ bệnh nhân tử vong liên quan đến nhiễm trùng do *E. coli* trên thế giới mỗi năm rất cao và gia tăng (Russo and Johnson, 2003). Trong những năm gần đây, các chủng vi khuẩn kháng thuốc ngày càng nhiều và đề kháng kháng sinh do vi khuẩn Gram âm sinh beta-lactamase phổ rộng là vấn đề được quan tâm nghiên cứu trên thế giới, đặc biệt là *E. coli* sinh beta-lactamase phổ rộng (*E. coli* sinh ESBL). Ở Việt Nam, một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy *E. coli* sinh ESBL hiện diện trên bệnh nhân khá cao. Kết quả khảo sát trực khuẩn Gram âm sinh beta-lactamase phổ rộng phân lập tại Bệnh viện Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh cho thấy tỷ lệ nhiễm vi khuẩn sinh ESBL chiếm 32,4%, trong đó *E. coli* chiếm tỷ lệ cao 71,2% và các chủng vi khuẩn sinh ESBL đề kháng cao với các nhóm kháng sinh aminoglycosides (trừ amikacin) và fluoroquinolones (Hoàng Thị Phương Dung và *ctv.*, 2010). Một nghiên cứu khác tại bệnh viện Chợ Rẫy cho thấy 174 mẫu phân của bệnh nhân không nhiễm khuẩn tiêu hóa đến khám bệnh có 133 mẫu (76,4%) có vi khuẩn sinh ESBL và chủ yếu là *E. coli* 65,8% (Võ Thị Chi Mai và *ctv.*, 2010). Tuy nhiên, các nghiên cứu về *E. coli* sinh ESBL chủ yếu tập trung ở các bệnh viện lớn, mới bước đầu phát hiện thông báo tỷ lệ dương tính, các nghiên cứu về *E. coli* sinh ESBL trên người chăn nuôi chưa được quan tâm do đó nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu khảo sát sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL và mức độ phát hiện các gene TEM, CTX-M mã hóa beta-lactamase phổ rộng trên vi khuẩn *E. coli* phân lập từ người chăn nuôi gà tại Đồng bằng sông Cửu Long.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Tám mươi mẫu phân trực tràng được thu thập từ 80 người trực tiếp chăn nuôi gà ở 60 nông hộ chăn nuôi gà và 20 trại gà công nghiệp tại tỉnh Vĩnh Long, Trà Vinh, Hậu Giang và Sóc Trăng. Mẫu phân được bảo quản trong Cary Blair và trữ lạnh.

Hóa chất và môi trường sử dụng (Merck, Đức) gồm MacConkey agar, Mueller Hinton agar, Simmon Citrate agar, Methyl Red - Voges Proskauer, tryptone soy agar, tryptone soy broth, trypton, thuốc thử Kovac, methyl red, Mytaq Mix 2X, các loại môi cho phản ứng PCR, nước cất, 100 bp ADN ladder, agarose, ethidium bromid, các loại khoanh giấy kháng sinh.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập vi khuẩn E. coli sinh beta-lactamase phổ rộng

Mẫu phân được cấy rìa trên môi trường thạch MacConkey có bổ sung ceftazidime 2 mg/l, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Mỗi mẫu dương tính chọn 10 khuẩn lạc *E. coli* điển hình kiểm tra đặc tính sinh hóa sinh indol, methyl red, voges proskauer và citrate. Các khuẩn lạc *E. coli* tiếp tục được kiểm tra đặc tính sản sinh beta-lactamase phổ rộng bằng phương pháp đĩa kết hợp (CLSI, 2014).

Phương pháp kiểm tra tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh

Vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL phân lập được kiểm tra tính nhạy cảm với 14 loại kháng sinh bằng phương pháp đĩa khuếch tán Kirby-Bauer. Các kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu gồm: ampicillin (10 µg), cefuroxime (30 µg), cefaclor (30 µg), gentamicin (10 µg), streptomycin (10 µg), kanamycin (30 µg), amikacin (30 µg), tetracycline (30 µg), doxycycline (30 µg), norfloxacin (10 µg), ofloxacin (5 µg), fosfomicin (50 µg), trimethoprim + sulfamethoxazole (1,25/23,75 µg) và colistin (10 µg). Mức độ nhạy cảm, trung gian và đề kháng với kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL được dựa theo tiêu chuẩn CLSI (2014).

Phương pháp xác định gene TEM và CTX-M mã hóa beta-lactamase phổ rộng

Các gene TEM và CTX-M mã hóa beta-lactamase phổ rộng được xác định bằng phương pháp PCR. Mẫu DNA của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL được chiết tách bằng phương pháp sốc nhiệt. Các cặp mồi được sử dụng gồm: cặp mồi F: 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3' và R: 5'-TTACTGTCATGCCATCC-3' để khuếch đại đoạn gene TEM có chiều dài 351 bp (Rasheed *et al.*, 2000), cặp mồi F: 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3' và R: 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' để khuếch đại đoạn gene CTX-M có chiều dài 550 bp (Bonnet *et al.*, 2000). Phản ứng khuếch đại DNA được thực hiện trong một chu trình nhiệt theo Lucena *et al.* (2012).

Phương pháp phân tích thống kê

Số liệu so sánh tỉ lệ được phân tích thống kê bằng phương pháp Chi bình phương, sử dụng phần mềm Minitab version 16.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập *E. coli* sinh ESBL trên người chăn nuôi gà

Bảng 1: Tỉ lệ người chăn nuôi dương tính với *E. coli* sinh ESBL

Phương thức chăn nuôi	Số mẫu khảo sát (người)	Số mẫu dương tính (người)	Tỉ lệ (%)
Nông hộ	60	36	60,0
Công nghiệp	20	14	70,0
Tổng	80	50	62,5
			P=0,424

Kết quả Bảng 1 cho thấy người chăn nuôi gà dương tính với *E. coli* sinh ESBL chiếm tỉ lệ cao (62,5%), trong đó người trực tiếp chăn nuôi ở trại gà công nghiệp và ở nông hộ dương tính với *E. coli* sinh ESBL lần lượt là 70% và 60%, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (P=0,424). Kết quả nghiên cứu khác của Boonyasiri *et al.* (2014) đã phát hiện người chăn nuôi gà có tỉ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL là 75,5%. Tại Đức, Dahms *et al.* (2015) đã phân lập vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trên mẫu phân người chăn nuôi gà từ 6 trại chăn nuôi gà ở Mecklenburg-Western Pomerania là 11,7%.

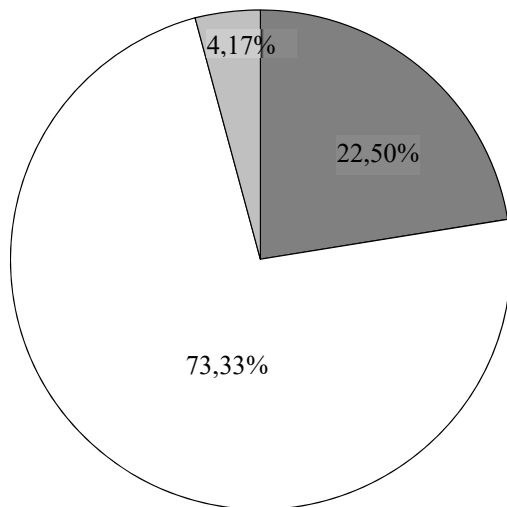
3.2 Kết quả khảo sát tính nhạy cảm của *E. coli* sinh ESBL đối với kháng sinh

Các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL phân lập từ người chăn nuôi gà có tính nhạy cảm với amikacin

(94,17%), fosfomycin (96,67%), colistin (83,33%), doxycycline (70%), norfloxacin (66,67%) và ofloxacin (68,33%); các vi khuẩn này có tính đề kháng cao với ampicillin (96,67%), cefuroxime (100%), cefaclor (97,5%), trimethoprim/sulfamethoxazole và streptomycin đồng tỉ lệ (75%). Các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL phân lập từ người chăn nuôi gà đề kháng cao với các kháng sinh ampicillin, cefuroxime, cefaclor là do vi khuẩn *E. coli* có khả năng sinh ra men beta-lactamase phổ rộng. Các men này làm bất hoạt kháng sinh nhóm beta-lactam bằng cách phá hủy nối amide của vòng beta-lactam. Bên cạnh đó, vi khuẩn có thể truyền các gene đề kháng kháng sinh qua nhiễm sắc thể hoặc plasmid để lây truyền gene đề kháng kháng sinh qua vi khuẩn trên người và vật nuôi (Guardabassi and Courvalin, 2006).

Bảng 2: Tỉ lệ *E. coli* sinh ESBL phân lập từ người chăn nuôi gà nhạy cảm, trung gian và đề kháng với kháng sinh

STT	Kháng sinh	Chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL phân lập (n= 120)					
		Nhạy cảm		Trung gian		Đề kháng	
		Số lượng	Tỉ lệ (%)	Số lượng	Tỉ lệ (%)	Số lượng	Tỉ lệ (%)
1	Ampicillin (10 µg)	1	0,83	3	2,50	116	96,67
2	Cefuroxime (30 µg)	0	0,00	0	0,00	120	100,00
3	Cefaclor (30 µg)	2	1,67	1	0,83	117	97,50
4	Gentamicin (10 µg)	53	44,17	6	5,00	61	50,83
5	Streptomycin (10 µg)	18	15,00	12	10,00	90	75,00
6	Kanamycin (30 µg)	59	49,17	5	4,17	56	46,67
7	Amikacin (30 µg)	113	94,17	0	0,00	7	5,83
8	Tetracycline (30 µg)	14	11,67	29	24,16	77	64,17
9	Doxycycline (30 µg)	84	70,00	17	14,17	19	15,83
10	Norfloxacin (10 µg)	80	66,67	8	6,67	32	26,67
11	Ofloxacin (5 µg)	82	68,33	8	6,67	30	25,00
12	Fosfomycin (50 µg)	116	96,67	3	2,50	1	0,83
13	Trimethoprim + Sulfamethoxazole (1,25/23,75 µg)	24	20,00	6	5,00	90	75,00
14	Colistin (10 µg)	100	83,33	0	0,00	20	16,67



- Đa kháng 3-4 loại kháng sinh
- Đa kháng 5-10 loại kháng sinh
- ▒ Đa kháng 11-13 loại kháng sinh

Hình 1: Sự phân bố đa kháng thuốc kháng sinh trên E. coli sinh ESBL

Các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL phân lập trên người chăn nuôi gà tạo ra 40 kiểu hình đa kháng thuốc và đa kháng từ 3-13 loại kháng sinh, trong đó, đa kháng từ 5-10 loại kháng sinh là phổ biến (73,33%), đa kháng 3-4 loại kháng sinh và 11-13 loại kháng sinh chiếm tỉ lệ cao lần lượt là 22,50% và 4,17% (Hình 1). Sự đa kháng nhiều loại kháng sinh và tạo ra nhiều kiểu hình đa kháng kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL sẽ làm hạn chế việc phối hợp thuốc kháng sinh và ảnh hưởng đến hiệu quả sử dụng kháng sinh trong điều trị bệnh.

3.3 Kết quả xác định và phân tích trình tự nucleotide của gene CTX-M và TEM

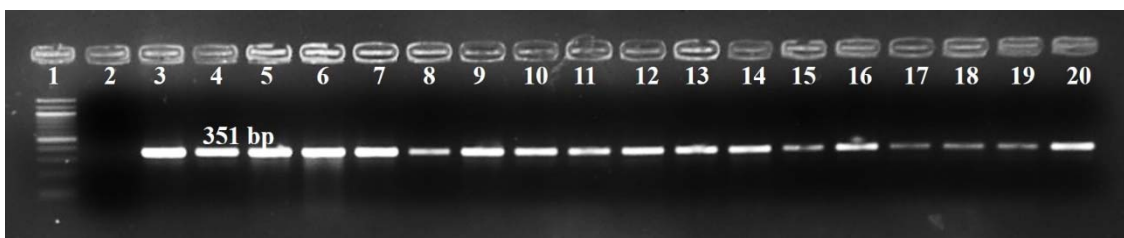
Các gene TEM và CTX-M được phát hiện với tỉ lệ cao lần lượt là 100% và 90,5%, hai gene này có thể tồn tại độc lập hoặc cùng tồn tại trên một vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL. Nhiều gene đề kháng kháng sinh cùng lưu hành trên một vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL sẽ làm tăng tính đề kháng kháng sinh của vi khuẩn và làm ảnh hưởng đến hiệu quả sử dụng kháng sinh trong điều trị bệnh. Theo Livermore and Woodford (2004), các beta-lactamase phổ rộng có mức độ hoạt động kháng lại các cephalosporin khác nhau trong đó TEM mã hóa các beta-lactamase phổ rộng có khả năng phân giải kháng sinh ceftazidime

nhưng bị bất hoạt bởi cefotaxime, ngược lại CTX-M mã hóa các beta-lactamase phổ rộng có khả năng phân giải kháng sinh cefotaxime nhưng bị bất hoạt bởi ceftazidime.

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gene CTX-M và TEM được đọc bằng phần mềm Bioedit để đánh giá kết quả giải trình tự. Thông qua hiển thị kết quả bằng giản đồ chromatogram, trình tự nucleotide của gene CTX-M và TEM được Blast trên ngân hàng gene của NCBI để chọn các gene CTX-M và TEM tương đồng gần nhất. Các gene CTX-M và TEM phân lập từ người chăn nuôi gà có tỉ lệ tương đồng cao với gene CTX-M-3 (AB976673.1) và TEM-1 (FJ668741.1, FJ4052101).

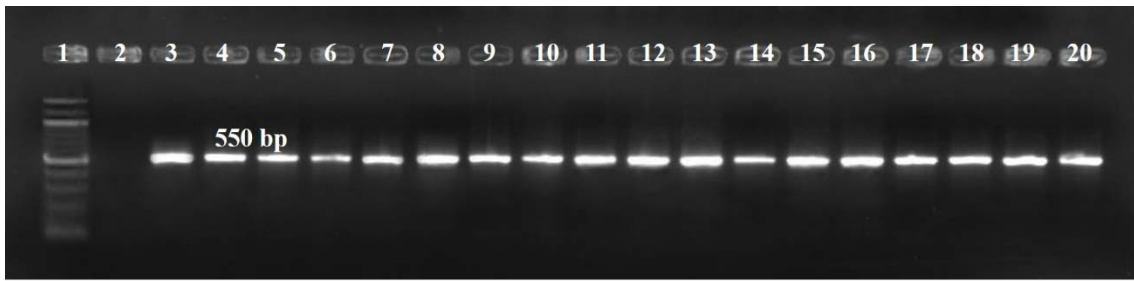
Bảng 3: Tỉ lệ phát hiện gene CTX-M và TEM trên E. coli sinh ESBL phân lập từ người chăn nuôi gà

Gene	Chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL phân lập (n= 21)	
	Số mẫu dương tính	Tỉ lệ %
CTX	19	90,5
TEM	21	100



Hình 2: Hình điện di sản phẩm PCR xác định gene TEM

Giếng 1: Ladder, giếng 2: đối chứng âm, giếng 3: đối chứng dương, giếng 4-20: kết quả dương tính



Hình 3: Hình điện di sản phẩm PCR xác định gene CTX-M

Giếng 1: Ladder, giếng 2: đối chứng âm, giếng 3: đối chứng dương, giếng 4-20: kết quả dương tính

4 KẾT LUẬN

Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh trên người tiếp xúc trực tiếp với gà khá cao (62,5%). Kết quả khảo sát tính nhạy cảm của *E. coli* sinh ESBL đối với kháng sinh và kết quả xác định các gene TEM và CTX-M càng cho thấy khả năng đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL càng cao, có nhiều kiểu hình đa kháng và việc sử dụng các kháng sinh nhóm beta-lactam, đặc biệt là các cephalosporin phổ rộng ngày càng kém hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bonnet, R., Sampaio, J.L.M., Labia, R., et al., 2000.

A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7): 1936-1942.

Boonyasiri, A., Tangkoskul T., Seenama C., Saiyarin J., Tiengrim S., and Thamlikitkul V., 2014.

Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals, and the environment in selected areas in Thailand. *Pathogens and Global Health*, 108(5): 235-245.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. M100-S24, 34(1): 50-57&110-112.

Dahms, C, Hubner N.O, Kossow A., Mellmann A., Dittmann K., and Kramer A., 2015. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS One*. 10(11): e0143326.

Guardabassi L., and Courvalin P., 2006. Mode of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance, p. 1-18. In: Aarestrup F.M (Ed.), *antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press. Washington (D.C.), p. 442.

Hoàng Thị Phương Dung, Nguyễn Thanh Bảo và Võ Thị Chi Mai, 2010. Khảo sát trực khuẩn Gram âm sinh men β -lactamase phổ rộng phân lập tại bệnh viện Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh. *Y học TP. Hồ Chí Minh*, 14(1): 487-490.

Livermore, D., and Woodford, N., 2004. Laboratory detection & reporting of bacteria with extended-spectrum β -lactamases. *Health Protection Agency*, 5-6.

Lucena, M.A.H, Ephrime, B. Metillo, and Jose, M. O., 2012. Prevalence of CTX-M Extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae at a Private Tertiary Hospital in Southern Philippines. *Philippine Journal of Science*, 141(1): 117-121.

Rasheed J.K., Anderson G.J., Yigith H., et al., 2000. Characterization of the extended-spectrum β -lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(9): 2382-2388.

Russo and Johnson, 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5: 449-456.

Võ Thị Chi Mai, Ngô Thị Huỳnh 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 cư đường ruột phân lập tại bệnh viện Chợ Rẫy. *Y học TP. Hồ Chí Minh*, 14(1): 685-689.