Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ – Khoa học Tự nhiên, 5(2):1198-1207

Open Access Full Text Article

Bài nghiên cứu

Khảo sát tỷ lệ mang gen mã hóa enzym ESBL và Amp-C-β-lactamase của vi khuẩn *Escherichia coli* được phân lập tại các trại chó ở Đắk Lắk

Lê Chí Kiên[1], Võ Quốc Cường[1], Trần Thanh Xuân[1], Đặng Mạnh Hùng[1], Nguyễn Ngọc Mỹ Huyền[2], Phan Thị Phượng Trang[3,*], James Ian Campbell[2], Nguyễn Văn Minh Hoàng[2]

Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Tình hình đề kháng kháng sinh và tỷ lệ sinh β-lactamase phổ mở rộng (ESBL) và AmpC của vi khuẩn *E. coli* trên thế giới, đặc biệt ở Việt Nam, không ngừng lan nhanh những năm gần đây. Tại Việt Nam, đã có các nghiên cứu về *E. coli* sinh ESBL và Amp-C-β-lactamase trên người và động vật, tuy nhiên, nghiên cứu về kháng kháng sinh của *E. coli* thường trú trên thú cưng, đặc biệt là chó chưa được phổ biến. Nghiên cứu này nhằm khảo sát tính đề kháng, sự kháng với cephalosporin thế hệ 3 và penicillin và tỷ lệ mang gen mã hóa ESBL và Amp-C-β-lactamase trên chủng *E. coli* thường trú tại đường ruột được phân lập từ các trại chó ở Đắk Lắk. Nghiên cứu phát hiện kiểu hình ESBL, và AmpC bằng phương pháp đĩa đôi kết hợp (DDST) và thử nghiệm đối kháng ceftazidime-imipenem (CIAT), sử dụng kỹ thuật multiplex PCR phát hiện các kiểu gen ESBL thuộc nhóm A như $bla_{CTX-M(1,2,8,9,25)}$, bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{OXA} và các kiểu gen (Amp-C-β-lactamase) nhóm C như $bla_{MOX-(1;2)}$, $bla_{CMY-(1;2-7;8-11)}$, $bla_{LAT-(1-4)}$, $bla_{DHA-(1;2)}$, bla_{ACC}, $bla_{FOX-(1-5B)}$, bla_{MIR-1}, bla_{ACT-1}. Trong tổng số 312 chủng vi khuẩn phân lập được từ 64 mẫu phết hậu môn, có 269 (86%) chủng *E. coli*, trong đó có 44 chủng *E. coli* sinh enzym ESBL chiếm tỷ lệ 16% và 12 chủng *E. coli* sinh enzym Amp-C-β-lactamase chiếm 4%. Kết quả xác định kiểu gen liên quan đến kiểu hình mã hóa enzym ESBL và Amp-C lần lượt là 39 (15%) và 8 (3%). Phần trăm kháng thuốc cao của các chủng *E. coli* phản ánh thực trạng của việc lạm dụng kháng sinh đang gia tăng. Kết quả của nghiên cứu này góp phần giám sát đề kháng về mặt dịch tễ học.

Từ khoá: đề kháng, Đắk Lắk, chó, E. coli, ESBL, Amp-C-β-lactamase

[1]*Chi cục thú Y vùng V, Việt Nam*

[2]*Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford (OUCRU-HCMC), Việt Nam*

[3]*Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam*

Liên hệ

Phan Thị Phượng Trang, Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: ptptrang@yahoo.com

Lịch sử

- Ngày nhận: 21-12-2020
- Ngày chấp nhận: 23-04-2021
- Ngày đăng: 03-05-2021

DOI : 10.32508/stdjns.v5i2.996

Check for updates

Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

VNU-HCM Press

MỞ ĐẦU

Kháng kháng sinh là tình trạng tự nhiên khi các vi sinh vật thích ứng với thuốc kháng sinh thông qua việc sử dụng chúng không đúng liều lượng theo thời gian, khiến các thuốc này không còn hiệu quả trong việc điều trị bệnh[1]. Kháng sinh β lactam là kháng sinh quan trọng được sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn Gram âm, gồm 4 nhóm kháng sinh chính: penicillin, cephalosporin, monobactam và carbapenem. Tuy nhiên, những năm gần đây việc gia tăng nhanh chóng các chủng vi khuẩn *E. coli* kháng với cephalosporin thế hệ 3, và penicillin phổ rộng (aminopenicillin) đã gây ra những hạn chế đáng kể trong việc điều trị. Theo công bố từ The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy — CDDEP, 2016 (Trung tâm Động lực học Bệnh tật, Kinh tế, Chính sách)[2] về việc đánh giá trên chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ những bệnh nhân nội trú ở những độ tuổi khác nhau tại Việt Nam, có khoảng 71% (68%-74%) chủng kháng với nhóm cephalosporins thế hệ 3 (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) và khoảng 94% (92%-96%) kháng với aminopenicillins (amoxicillin, ampicillin). Enzym β lactamse phổ rộng (ESBL) lớp A và enzym β lactamse (AmpCs) lớp C là hai enzym kháng thuốc điển hình ở vi khuẩn thuộc họ Enterobacterales[3]; chúng thủy phân vòng beta lactam và làm vô hiệu hóa hầu hết các nhóm kháng sinh β lactam. Việc kháng sinh được sử dụng không có kiểm soát trong chăn nuôi đã góp phần vào sự thích nghi và tính chọn lọc của vi khuẩn trong quá trình kháng lại nhóm kháng sinh cephalosporin thế hệ 2, 3 và penicillin của vi khuẩn họ đường ruột Enterobacterales. Trong đó, *E. coli* gây bệnh trên chó thường được người nuôi điều trị bằng kháng sinh rất nhiều. Trên thế giới, nghiên cứu về enzym kháng thuốc ESBL và Amp-C của *E. coli* trên chó đã được công bố trong những năm gần đây[4,5]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, vấn đề này vẫn chưa được khai thác rộng rãi. Chỉ mới có một vài nghiên cứu về kiểu hình, kiểu gen kháng - ESBL ở *E. coli* trên gia súc (heo) hoặc gia cầm (gà, vịt)[6,7]. Nghiên cứu chọn địa điểm tại Đắk Lắk vì đây là một tỉnh có điều kiện khí hậu mát mẻ, se lạnh, vị trí địa

Trích dẫn bài báo này: Kiên L C, Cường V Q, Xuân T T, Hùng D M, Huyền N N M, Trang P T P, Campbell J I, Hoàng N V M. **Khảo sát tỷ lệ mang gen mã hóa enzym ESBL và Amp-C-β-lactamase của vi khuẩn *Escherichia coli* được phân lập tại các trại chó ở Đắk Lắk**. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.;* 5(2):1198-1207.

lý thuận lợi, thổ nhưỡng màu mỡ, ngành chăn nuôi ở Đắk Lắk có nhiều lợi thế để phát triển vượt trội. Tại Đắk Lắk có nhiều trang trại nuôi chó đạt quy mô lớn với diện tích trên 1000 m^2 gồm các dòng Poodle, Pug, Bulldog, Alaska, Husky. Nghiên cứu được tiến hành với hai mục đích chính: (i) Xác định tỷ lệ *E. coli* tiết enzym ESBL và Amp-C-β-lactamase trên kiểu hình được phân lập từ các trại chăn nuôi chó ở Đắk Lắk; (ii) Khảo sát tính đề kháng và xác định tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen mã hóa beta lactamase phổ rộng (ESBL) và Amp-C-β-lactamase.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu

Là các chủng *E. coli* được phân lập từ 64 mẫu phết hậu môn từ các dòng chó lai (Poodle, Pug, Bulldog, Alaska, Husky) có thể trạng khỏe, có phản tăng động, tinh nghịch, mắt trong, sáng, ăn khỏe, từ 3 đến 16 tháng tuổi.

Môi trường và hóa chất

Dung dịch pepton water (CM0509 - Oxoid), môi trường MacConkey Agar (CM0007 - Oxoid), môi trường Nutrient agar (CM0003 - Oxoid) và môi trường Mueller - Hinton (CM0337 - Oxoid). Các môi trường trên được hấp khử trùng ở 121^{o}C, 15 phút trước khi sử dụng.

Các kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu là: ampicillin - AMP (10 μg), amoxicillin-clavulanate - AMC (20/10 μg), piperacillin-tazobactam - TZP (100/10 μg), ceftazidime - CAZ (30 μg) + clavuanic acid - CLA (10 μg), cefotaxime - CTX (30 μg) + clavuanic acid - CLA (10 μg), imipenem - IMP (10 μg), meropenem - MEM (10 μg), gentamicin - CN (10 μg), amikacin - AK (30 μg), trimethoprim- sulfamethoxazole - SXT (1,25/ 23,75 μg), cefotaxime - CTX (30 μg), cefoxitin - FOX (30 μg), ceftazidime - CAZ (30 μg) được bảo quản ở nhiệt độ 4 - 8^{o}C.

Phương pháp nghiên cứu

Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Các mẫu phết hậu môn được thu thập từ các trại nuôi chó trên địa bàn xã Ea Kao, xã Đạt Lý, huyện Ea Kar, Krông Búk, M'Đrắk, Krông Pắc và TP. Buôn Ma Thuột thuộc tỉnh Đắk Lắk từ tháng 7/2019 đến tháng 12/2019

Phương pháp lấy mẫu

Sử dụng đồ bảo hộ sạch được khử trùng bằng dung dịch virkon 9,75%. Tiến hành lấy mẫu bằng các que phết tâm bông đã được tuyệt trùng sẵn, phết nhẹ lên bề mặt hậu môn, sau đó cho vào trong tube nhựa có nắp đậy kín. Các mẫu phết được bảo quản từ 4^0C-8^0C, trong vòng 4 giờ được vận chuyển đến phòng thí nghiệm vi sinh thuộc Chi Cục Thú y Vùng V - RAHO 5 để tiến hành phân lập và định danh.

Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn E. coli

Các mẫu phết được cấy trên môi trường thạch MacConkey (Oxoid), ủ ở 35^0C $\pm$ 2^0C trong 16- 18h, chọn 5 khuẩn lạc nghi ngờ là *E. coli,* sau đó tiến hành kiểm tra bằng test sinh hóa thường quy bởi các phản ứng lên men đường glucose và lactose, sinh hơi và khử lưu huỳnh - Kliger's Iron Agar (KIA), sinh indole và di động - Indole Motility (IM), biến dưỡng citrate (CIT), phân hủy ure (URE) và biến dưỡng glucose - methyl red (MR) và được định danh bằng MALDI-TOF Matrix-assisted laser desorption/ionization.

Phương pháp định tính khoang giấy kháng sinh trong thạch Kirby-Bauer

Mỗi khuẩn lạc *E. coli* được cấy trên Nutrient agar và được thực hiện kháng sinh đồ với 14 loại kháng sinh theo phương pháp Kirby-Bauer (đĩa khuếch tán) trên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA) và đối chiếu theo hướng dẫn của Clinical and Laboratory Standards Institute — CLSI, M100, 30^{th} edition cho Enterobacterales[8]. Xác định kiểu hình ESBL dựa vào phương pháp đĩa đôi kết hợp (Double disk synergy test-DDST)[8], và nhận biết enzym Amp-C bằng phương pháp CIAT (ceftazidime-imipenem antagonism test)[9].

Môi tường thạch Muller-Hinton có đường kính 90 mm, độ dày 4 mm được bảo quản lạnh 4^0C - 8^0C. Chọn 2-3 khuẩn lạc thuần *E. coli* hòa cùng với nước muối vô trùng 0,9%, lắc đều bằng máy lắc vortex, dùng máy đo độ đục (DEN- 1) để đạt được hỗn hợp dịch vi khuẩn có độ đục 0,5 Mc Farland (~ 1 – 4 $\times$ 10^8 CFU/mL). Dùng que tăm bông vô trùng nhúng vào hỗn hợp dịch khuẩn trên ép vào thành ống cho bớt nước rồi ria đều trên mặt thạch đã được để khô ở nhiệt độ phòng. Lấy ống khoanh giấy kháng sinh từ tủ lạnh 4^0C - 8^0C để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút. Đặt các mặt khoanh giấy sao cho áp sát vào mặt thạch, mép ngoài của khoanh giấy cách thành đĩa 15 mm, và cách khoanh khác 20 mm. Để đĩa thạch ở nhiệt độ phòng cho kháng sinh khuếch tán rồi ủ ở nhiệt độ 35^0C $\pm$ 2^0C trong 16–18 giờ. Sau thời gian ủ, dùng thước đo đường kính vùng ức chế, dựa vào thang đo của CLSI Hoa Kỳ và nồng độ khoanh giấy kháng sinh, ta có mức độ nhạy cảm của *E. coli* đối với từng loại thuốc kháng sinh[10].

Phương pháp đĩa kết hợp (DDST) phát hiện vi khuẩn sinh enzym ESBL

Vi khuẩn sinh enzym ESBL được phát hiện dựa trên nguyên tắc hợp lực giữa hai cặp kháng sinh kết hợp cephalosporin thế hệ 3 với ức chế β-lactamase so với đĩa kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 đơn thuần: ceftazidime (30 μg), ceftazidime (30 μg) + clavuanic acid (10 μg) và cefotaxime (30 μg), cefotaxime (30 μg) + clavuanic acid (10 μg). Hai cặp kháng sinh đặt cách nhau 20 mm trên môi trường thạch MHA. Vi khuẩn *E. coli* tiết ESBL khi hiệu số đường kính vòng ức chế giữa một trong hai cặp kháng sinh $\geq$5 mm[8].

Phương pháp phát hiện AmpC beta lactamase - CIAT (Ceftazidime-Imipenem Antagonism Test)

Chuẩn bị hỗn hợp dịch vi khuẩn có độ đục 0,5 Mc Farland, sau đó dùng tăm bông trải đều trên mặt thạch. Đặt kháng sinh ceftazidime (30 μg) ở chính giữa đĩa thạch, sau đó đặt imipenem (10 μg) cách nhau một khoảng cách 20 mm (từ cạnh này sang cạnh khác) so với ceftazidime (30 μg). Để so sánh, một đĩa cefoxitin (30 μg) được đặt cách đĩa ceftazidime một khoảng 20 mm, ủ đĩa thạch trong 16-18 giờ ở 35^0C $\pm$ 2^0C. Vi khuẩn sản xuất AmpC cảm ứng khi có sự đối kháng, được biểu thị bằng việc giảm vòng ức chế xung quanh đĩa ceftazidime (30 μg) tiếp giáp với đĩa imipenem (10 μg) hoặc cefoxitin (30 μg)[9] (Hình 1).

Tiêu chuẩn đánh giá

Đánh giá kết quả kháng sinh đồ, phát hiện vi khuẩn sinh enzym ESBL dựa vào kiểu hình theo tiêu chuẩn của CLSI Hoa Kỳ, và Amp-C-β-lactamase theo hướng dẫn từ tác giả Cantarelli, Vlademir Vicente[9]. Có sử dụng các chủng vi khuẩn kiểm tra chất lượng kháng sinh là *E. coli* ATCC 25922 và *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Chủng *E. coli* ATCC 25922 được dùng làm chứng âm cho thử nghiệm ESBL và AmpC, và *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 làm chủng chứng dương cho thử nghiệm ESBL, và chủng *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 làm chứng dương cho thử nghiệm AmpC.

Phát hiện gen kháng beta lactam phổ rộng (ESBL) và Amp-C- β-lactamase trên chủng vi khuẩn E. coli bằng kỹ thuật multiplex PCR

Kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện gen mã hóa enzym ESBL và Amp-C được thực hiện tại Phòng lab Sinh học phân tử thuộc Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford (OUCRU-HCMC). DNA được tách chiết bằng kit Promega Wizard®, quy trình hướng dẫn các bước theo nhà sản xuất. Phản ứng multiplex PCR gồm: 12,5 ml MyFi master mix 2X (Bioline, UK), 1 ml mỗi mồi xuôi, ngược nồng độ 10 μM, và 1 ml DNA vi khuẩn đã tách chiết, nước đủ 25 ml. Các cặp mồi dùng trong phản ứng PCR được liệt kê trong (Bảng 1).

Chu kỳ nhiệt phát hiện gen mã hóa enzym ESBL và Amp-C-β-lactamase: giai đoạn khởi đầu 95^0C trong 5 phút, 35 chu kỳ ba giai đoạn: giai đoạn biến tính 95^0C trong 45 giây, giai đoạn bắt mồi 30 giây, 55^0C cho các mồi bắt cặp nhóm gen bla_{CTX-M} (I): $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-8}$, $bla_{CTX-M-9}$, $bla_{CTX-M-25}$, 57^0C cho các mồi bắt cặp các nhóm gen ESBL còn lại (II): bla_{TEM}, bla_{OXA}, bla_{SHV} và 62^0C cho các mồi bắt cặp các gen bla_{Amp-C} (III): bla_{CIT}, , bla_{ACC}; bla_{MOX},bla_{DHA}, bla_{EBC}, bla_{FOX} , giai đoạn kéo dài 72^0C trong 1 phút 30 giây; giai đoạn kết thúc chu kỳ 72^0C trong 7 phút, sau đó giữ ở nhiệt độ 4^0C.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di sử dụng gel agarose (Biorad) 1,7%. Thang đo 100 bp (Invitrogen), chủng chứng âm *E. coli* ATCC 25922 và chứng dương *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 mang gen bla_{TEM-1}, bla_{SHV-18}, chủng *Klebsiella pneumoniae* mang gen $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-9}$, chủng *Klebsiella pneumoniae* mang gen bla_{DHA}, các chủng *E. coli* mang gen bla_{CIT} , bla_{EBC}, bla_{MOX}, bla_{ACC}, bla_{FOX}, bla_{OXA} , bla_{SHV}. Sản phẩm PCR được đọc trên máy Gel Doc^{TM} XR$^+$ và Gel Docuenzymtation System (Bio-Rad) có chiếu đèn UV.

Thu thập và xử lý số liệu

Các kết quả số liệu nghiên cứu xử lí bằng phần mềm Excel và phân tích theo phương pháp thống kê mô tả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *E. coli*

Trong 312 chủng vi khuẩn phân lập được từ 64 mẫu phết hậu môn trên chó, có 269 chủng *E. coli* chiếm tỷ lệ 86% được xác định là vi khuẩn *E. coli* vì thỏa các thử nghiệm sinh hóa như: glucose, lactose, indol dương tính, đỏ methyl dương tính, citrat âm tính, urease âm tính, H_2S âm tính, 43 chủng khác chiếm 14%.

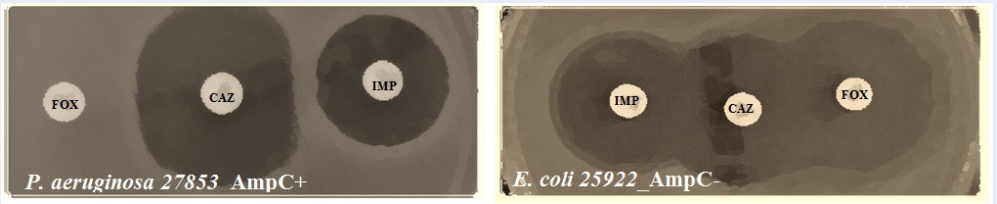
Khảo sát tình hình kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli*

Thực hiện kiểm tra đề kháng của 269 chủng vi khuẩn *E. coli* đã được phân lập với 11 loại kháng sinh khác nhau, sau đó phân tích theo từng nhóm thuốc: (1): penicillin (AMP), (2): β lactam phối hợp (AMC, TZP), (3): cephem (FOX, CTX, CAZ), (4): aminoglycoside (CN, AK), (5): sulfornamide (SXT), và (6):

Bảng 1: Trình tự các cặp mồi nhân bản các gen mã hóa enzym AmpC và ESBL [11]

Multi-PCR	Kiểu hình kháng	Tên gen	Tên mồi	Trình tự (5' - 3')	Kích thước (bp)
I	ESBL	CTX-M-1	M1F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	415
			M1R	AGCTTATTCATCGCCACGTT	
I	ESBL	CTX-M-2	M2F	CGACGCTACCCCTGCTATT	552
			M2R	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	
I	ESBL	CTX-M-9	M9F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	205
			M9R	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	
I	ESBL	CTX-M-8/25	M8F	CGCGTTAAGCGGATGATGC	666
			M25F	GCACGATGACATTCGGG	327
			M8/25R	AACCCACGATGTGGGTAGC	
II	ESBL	TEM: TEM-1, TEM-2	TSO-T-F	TGCGGTATTATCCCGTGTTG	296
			TSO-T-R	TCGTCGTTTGGTATGGCTTC	
II	ESBL	SHV: SHV-1	TSO-S-F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713
			TSO-S-R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
II	ESBL	OXA: OXA-1, OXA-4-30	TSO-O-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
			TSO-O-R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
III	AmpC	MOX: MOX-1, MOX-2,CMY-1, CMY-8 -11	MOXF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520
			MOXR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	
III	AmpC	CIT: LAT-1 đến LAT-4,CMY-2-7, BIL-1	CITF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462
			CITR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
III	AmpC	DHA: DHA-1, DHA-2	DHAF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
			DHAR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
III	AmpC	ACC	ACCF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346
			ACCR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
III	AmpC	EBC: MIR-1T, ACT-1	EBCF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302
			EBCR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
III	AmpC	FOX: FOX-1 đến FOX-5b	FOXF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190
			FOXR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	

PCR: Polymerase Chain Reaction; bp:base pairs



Hình 1: Hình minh họa các chủng vi khuẩn có AmpC (+) và AmpC (-)

Bảng 2: Tỷ lệ các chủng *E. coli* kháng với các nhóm kháng sinh

Nhóm kháng sinh	Số chủng kháng (Tỷ lệ)	Số nhóm kháng sinh	Số chủng kháng (Tỷ lệ) (n=269)
Penicillin	165 (61%)	0	82 (31%)
β-Lactam phối hợp	114 (42%)	1	33 (12%)
		2	41 (15%)
Carbapenems	17 (6%)	3	48 (18%)
Aminoglycoside	75 (28%)	4	28 (10%)
Sulfornamide	118 (44%)	5	32 (12%)
Cephem	78 (29%)	6	5 (2%)

carbapenem (IMP, MEM). Kết quả khảo sát cho thấy 61% vi khuẩn *E. coli* kháng với nhóm penicillin, 44% kháng sulfornamide, 42%, 29% và 28% kháng lần lượt với nhóm β-lactam phối hợp, cephem và aminoglycoside (Bảng 2). Trong 269 chủng *E. coli*, có 48 chủng kháng đồng thời với 3 nhóm thuốc chiếm 18%, đặc biệt có 5 chủng kháng với 6 nhóm thuốc, chiếm 2% (Bảng 2).

Khảo sát sự đề kháng các chủng *E. coli* sinh enzym ESBL và Amp-C-β-lactamase trên kiểu hình

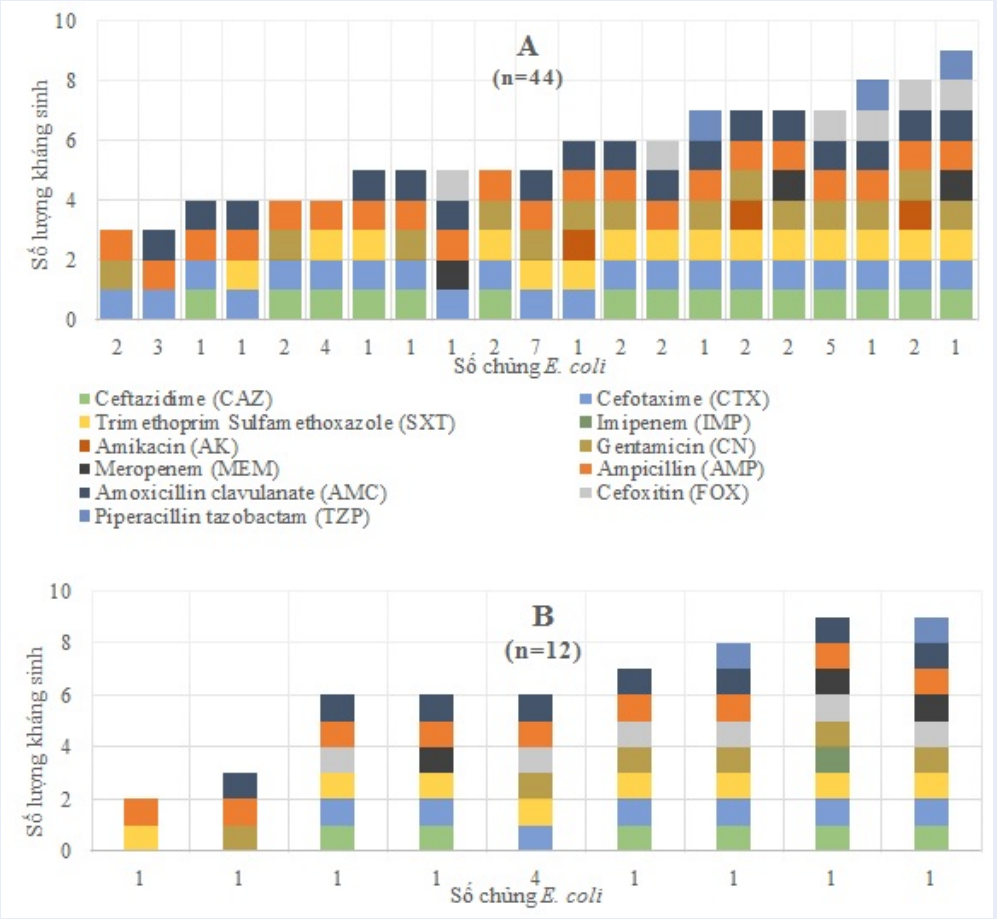
Có 44 chủng *E. coli* phát hiện sinh enzym ESBL và 12 chủng sinh Amp-C-β-*lactamase*, trong đó có 4 chủng vừa phát hiện ESBL và AmpC trong tổng số 269 chủng *E. coli* được phân lập trên chó. Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ các chủng sinh enzym ESBL kháng ampicillin và cefotaxime là 100% và chủng AmpC kháng với ampicillin là 100%, với cefotaxime là 83%.

Chủng ESBL đa phần kháng từ 5 loại kháng sinh chủ yếu gồm: cefotaxime, ampicillin, trimethoprim sulfamethoxazole, amoxicillin clavulanate, gentamicin, đặc biệt có 8/44 chủng kháng với 8 loại kháng sinh, chiếm tỷ lệ 18% và 1/44 chủng kháng với 9 loại kháng sinh, chiếm tỷ lệ 2% (Hình 2).

Chủng sinh enzym Amp-C hầu hết kháng từ 6 loại kháng sinh trong đó có: cefotaxime, ceftazidime, ampicillin, trimethoprim sulfamethoxazole, amoxicillin clavulanate, và cefoxitin, đặc biệt có 2/12 chủng kháng với 9 loại thuốc, chiếm tỷ lệ 17% (Hình 2). Như vậy, các kháng sinh này hầu như không còn hiệu quả trong việc điều trị các trường hợp nhiễm trùng *E.coli*.

Khảo sát tỷ lệ mang gen kháng chủng *E. coli* sinh enzym ESBL và Amp-C-β-lactamase từ kiểu hình

Kết quả phân tích kiểu gen bằng PCR từ 44 chủng vi khuẩn *E. coli* sinh enzym ESBL cho thấy gen CTX-M1, CTX-M9 và TEM chiếm đa số, trong đó phát hện nhiều chủng mang đa gen kháng. Trong 44 chủng, có 53% chủng kháng mang 2 gen khác nhau bla_{CTX-M1}, $bla_{CTX-M-9}$; bla_{CTX-M1}, bla_{TEM}; bla_{CTX-M1}, bla_{CTX-M9}; bla_{CTX-M1}, bla_{OXA}, 13% mang 3 gen khác nhau: bla_{CTX-M1}, $bla_{CTX-M-9}$, bla_{TEM}; bla_{CTX-M1}, $bla_{CTX-M-9}$, bla_{OXA}; bla_{CTX-M1}, bla_{OXA}, bla_{TEM}, đặc biệt phát hiện 2% chủng mang cả 4 gen khác nhau: bla_{CTX-M1}, $bla_{CTX-M-9}$, bla_{TEM}, và bla_{OXA}. Khoảng 11% chủng ESBL còn lại không phát hiện mang gen kháng. Ngoài ra, không phát hiện chủng *E. coli* nào mang gen SHV, hay CTX-M2; CTX-M8; CTX-M25 (Bảng 3), (Hình 3). Trong 12 chủng sinh enzym Amp-C từ kiểu hình, kết qủa PCR có 50% chủng *E. coli* phát hiện mang gen bla_{CIT}, và 17% chủng *E. coli* mang cả hai gen kháng thuốc bla_{CIT} và bla_{DHA}. Gen bla_{CIT} phổ biến trên



Hình 2: Đặc điểm kháng thuốc của các chủng *E. coli* sinh enzym β-*lactamase*. A: chủng *E. coli* mang gen mã hóa ESBL; B: chủng *E. coli* mang gen mã hóa Amp-C β -*lactamase*

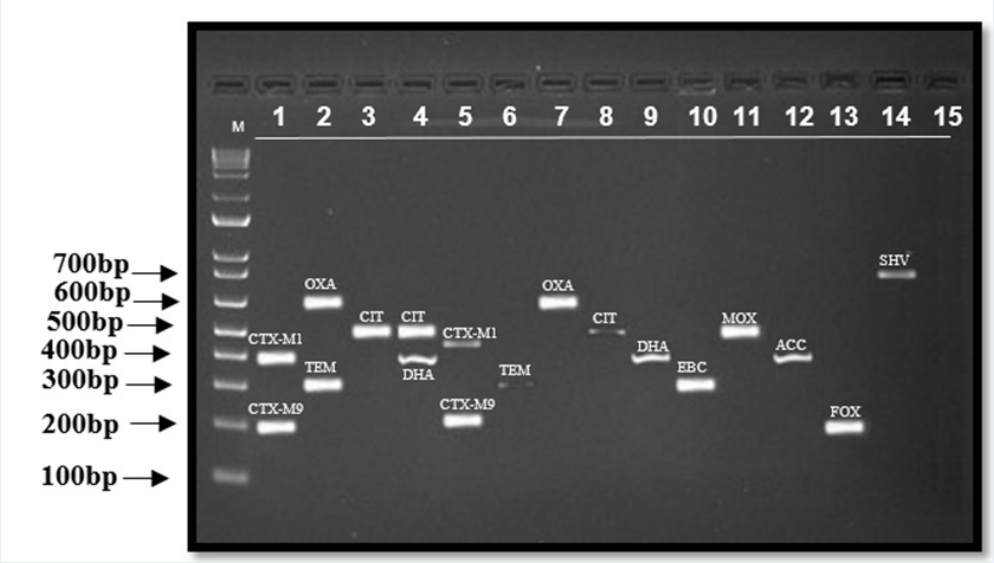
E. coli tiết Amp-C beta lactamase, chiếm tỷ lệ 67%, trong khi đó gen $bla_{CTX-M-1}$ phát hiện 66% trong các chủng *E. coli* sinh ESBL. Theo Oteo et al (2010) và Pitout et al (2009), đây là hai gen kháng thuốc điển hình được phát hiện phổ biến trên *E. coli*[12,13] (Bảng 3), (Hình 3).

Kết quả của nghiên cứu tiến hành phân lập, định danh, và đánh giá sự mang gen kháng thuốc ESBL và Amp-C-β-lactamaes đã góp phần hỗ trợ quá trình điều trị bằng liệu pháp kháng sinh trên động vật. Trong 269 chủng *E. coli* thường trú được phân lập từ những mẫu phết hậu môn trên chó, phát hiện gần 30% chủng kháng với nhiều nhóm kháng sinh như: cephem (FOX, CTX, CAZ), aminoglycoside (CN, AK), và với hơn 40% chủng kháng chéo với sulfornamide (SXT), β-lactam phối hợp (AMC, TZP); hơn 60% kháng với penicillin (AMP). Và 6% kháng với nhóm carpebenem (IPM, MEM), đây có thể là những kháng sinh chưa được người dân sử dụng phổ biến tại khu vực khảo sát, chưa được các nhà phân phối thuốc chăn nuôi giới thiệu rộng rãi. Nhờ vậy mà các kháng sinh này còn khả năng tác dụng trong điều trị các trường hợp nhiễm khuẩn *E. coli*. Nghiên cứu trên thú cưng từng được Meyer và các cộng sự thực hiện đã cho thấy việc các chủng *E. coli* mang các gen mã hóa enzym kháng thuốc β-lactamases[14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát và phát hiện 15% và 3% *E. coli* sinh enzym ESBL và Amp-C trong tổng số 269 chủng *E. coli* thường trú được phân lập trên chó, mang các gen kháng thuốc. Kết quả của nghiên cứu chứng minh được sự hiện diện *E. coli* kháng thuốc trên chó, góp phần hỗ trợ thông tin về dịch tễ địa phương, đây cũng là những thông tin hữu dụng cho các cơ sở chăn nuôi thú cưng, vì vấn đề kháng kháng sinh hiện đang là một trong những vấn đề rất được quan tâm bởi giới chuyên gia và cộng đồng.

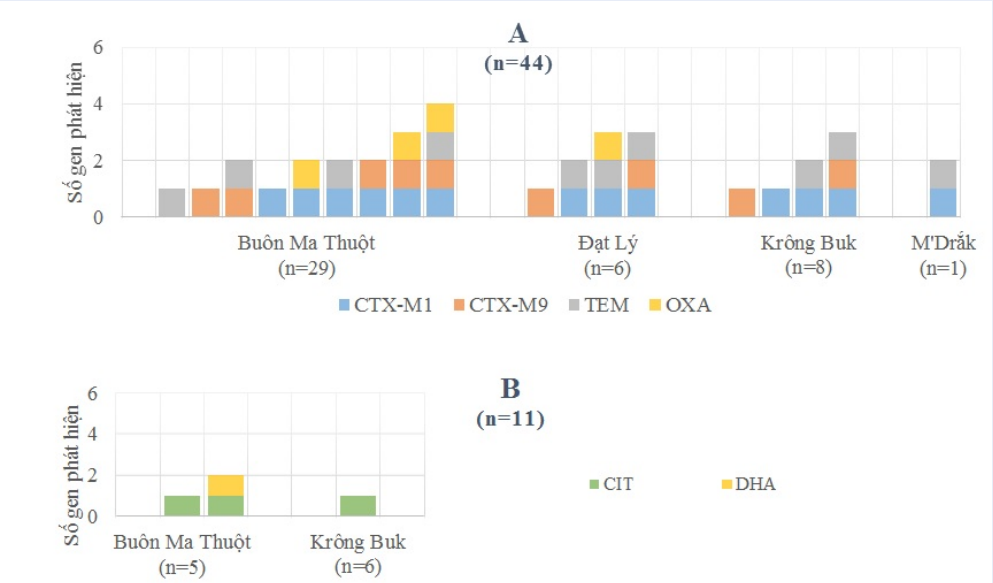
Kết quả phân tích kiểu gen kháng thuốc (mã hóa enzym ESBL và Amp-C) bằng PCR cho thấy sự đa dạng

Bảng 3: PCR phát hiện nhóm gen kháng trên các chủng *E. coli* sinh β-*lactamases*

Kiểu hình	β-lactamases gen	Số gen kháng	Số lượng chủng (Tỷ lệ)
	CTX-M1	1	4 (9%)
	CTX-M9	1	4 (9%)
	CTX-M1, CTX-M9	2	3 (7%)
	TEM	1	1 (2%)
	TEM, CTX-M1	2	13 (30%)
ESBL	TEM, CTX-M9	2	5 (11%)
	TEM, CTX-M9, CTX-M1	3	4 (9%)
	CTX-M1, OXA	2	2 (5%)
	CTX-M1, OXA, CTX-M9	3	1 (2%)
	CTX-M1, OXA, TEM	3	1 (2%)
	TEM, CTX-M9, CTX-M1, OXA	4	1 (2%)
	CIT	1	6 (50%)
Amp-C	CIT và DHA	2	2 (17%)



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm bằng multiplex PCR phát hiện gen mã hóa ESBL và Amp-C-β-lactamases. M: ladder 100 bp (Invitrogen), (1 – 4): chủng *E. coli* phân lập trong nghiên cứu, (5): *Klebsiella pneumoniae* mang gen $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-9}$, (6): *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (7): chủng chứng dương *E. coli* mang gen bla_{OXA}, (8): chủng chứng dương *E. coli* mang gen bla_{CIT}, (9): chủng chứng dương *Klebsiella pneumoniae* mang gen bla_{DHA}, (10): chủng chứng dương *E. coli* mang gen bla_{EBC},(11): chủng chứng dương *E. coli* mang gen bla_{MOX}, (12): chủng chứng dương *E. coli* mang gen bla_{ACC}, (13): chủng chứng dương *E. coli* mang gen bla_{FOX}, (14): chủng chứng dương *E. coli* mang gen bla_{SHV}, (15): chủng chứng âm *E. coli* ATCC 25922



Hình 4: Sự phân bố các gen kháng của chủng *E. coli sinh β -lactamase.* Biểu đồ A: chủng *E. coli* ESBL (+); biểu đồ B: chủng *E. coli Amp-C (+)*

về mặt phân tử, giữa chủng *E. coli* kháng thuốc so với các chủng *E. coli* thông thường, giữa các chủng *E. coli* sinh enzym ESBL và Amp-C với các chủng *E. coli* không sinh enzym. Gen bla_{CIT} và bla_{DHA} là hai trong số các gen được phát hiện nhiều nhất, cùng ghi nhận với nghiên cứu của Smet[15]. Trong tổng số 269 chủng *E. coli* được phân lập, có 177 chủng được phân lập tại Krông Buk từ 36 mẫu phết hậu môn, 49 chủng từ 12 mẫu phết tại Buôn Ma Thuột, 26 chủng từ 6 mẫu phết tại Đạt Lý, 12 chủng từ 7 mẫu phết tại EaKao, 3 chủng từ 1 mẫu phết tại Krông Pắc, còn lại M'Drắk và EaKar, mỗi nơi từ 1 mẫu phết và có 1 chủng. Kết quả phân tích các gen kháng cho thấy sự phân bố chủ yếu tại các địa điểm: Buôn Ma Thuột, Đạt Lý, và Krông Buk (Hình 4). Có 29/49 và 8/177 chủng *E. coli* phân bố lần lượt tại Buôn Ma Thuột và Krông Buk phát hiện mang các gen kháng $bla_{ESBL(CTX-M-1,\ CTX-M9,\ TEM,\ OXA)}$. Các gen kháng $bla_{AmpC(CIT,DHA)}$ cũng được phát hiện chủ yếu ở Buôn Ma Thuột và Krông Buk, lần lượt là 5/49 và 6/177. Còn lại các địa điểm khác (EaKao, Krông Pắc và EaKar) không xác định được gen kháng. Ngoài 269 chủng *E. coli* phân lập được, nghiên cứu còn phát hiện 21 (7%) chủng *Salmonella* spp., 14 (4%) chủng *Campylobacter* spp., và 8 (3%) chủng khác: *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., vv. Các gen kháng thuốc trên *E. coli* phân lập trên chó có khả năng lan truyền ngang sang các chủng vi khuẩn đường ruột (*Enterobacteriacae*) hay *non- Enterobacteriacae* thường trú trên người một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua nguồn thức ăn, nguồn nước, hoặc tiếp xúc (chăm sóc)[16,17].

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh được sự mang gen mã hóa ESBL và Amp-C của các chủng *E. coli* thường trú trên chó, làm cơ sở mở rộng các nghiên cứu về sự lan truyền gen đề kháng sinh giữa động vật (thú cưng) và con người, đây là vấn đề nổi trội được nhiều sự quan tâm những năm gần đây. Phương pháp phát hiện kiểu hình sinh ESBL và AmpC trên *E. coli* có thể là một giải pháp hỗ trợ hiệu quả để phát hiện các gen kháng β-lactamase ESBL và AmpC. Kỹ thuật multiplex PCR được thực hiện để xác định chính xác các gen kháng thuốc, góp phần trong việc giám sát và nghiên cứu dịch tễ học. Một trong những hạn chế trong nghiên cứu này là chúng tôi không xác định được trình tự di truyền của các gen kháng ESBL và AmpC. Kết quả này nhằm cung cấp cở sở dữ liệu cho các cấp quản lý về y tế và chăn nuôi có những biện pháp quản lý, hướng dẫn hiệu quả để tránh được hiện tượng đa kháng thuốc. Vì vậy, giúp các cơ quan chức năng, trung tâm khuyến nông khuyến cáo người dân cách sử dụng kháng sinh phù hợp trong phòng và trị bệnh cho vật nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ từ dự án thuộc Core lab Fund - OUCRU/Wellcome Trust Fund. Cảm ơn các thành

viên trong nhóm Microbiology thuộc Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford (OUCRU-HCMC) và Chi Cục Thú y Vùng V đã nỗ lực thực hiện nghiên cứu thành công.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

AMP Ampicillin
AMC Amoxicillin-clavulanate
TZP Piperacillin-tazobactam
CAZ Ceftazidime
FOX Cefoxitin
GEN Gentamicin
IPM Imipenem
MEM Meropenem
SXT Sulfamethoxazole-trimethoprim
AK Amikacin
CLA Clavuanic acid
CTX Cefotaxime
ATCC Bộ sưu tập chủng vi khuẩn của Hoa Kỳ (American Type Culture Collection)
ESBL Những β-lactamase phổ mở rộng (Extended-spectrum β-lactamases)
Amp-C Chromosomally-inducible Beta-lactamases
CLSI Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm Hoa Kỳ (The Clinical & Laboratory Standards Institute)
CIAT Phương pháp phát hiện AmpC beta lactamase (Ceftazidime-Imipenem Antagonism Test)
DDST Phương pháp đĩa kết hợp (Double Disc Synergy Test)

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Tất cả các tác giả công bố không có xung đột lợi ích với bất cứ tổ chức cá nhân nào.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

- Phan Thị Phượng Trang, Nguyễn Văn Minh Hoàng, James Ian Campbell: Đóng góp ý tưởng, thiết kế thí nghiệm, chỉnh sửa và duyệt lần cuối
- Lê Chí Kiên: soạn thảo bản thảo, chỉnh sửa và duyệt lần cuối
- Nguyễn Ngọc Mỹ Huyền: Làm kháng sinh đồ, PCR, thống kê và phân tích số liệu
- Võ Quốc Cường, Trần Thanh Xuân, Đặng Mạnh Hùng: Thu thập số liệu mẫu, chuẩn bị trang thiết bị thí nghiệm, phân lập định danh, vi khuẩn, làm kháng sinh đồ tại Dak Lak.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. ;Available from: http://www.fao.org/fao-stories/article/en/c/1056781/OK.
2. ;Available from: https://resistancemap.cddep.org/CountryPage.php?countryId=39&country=Vietnam.
3. Nordmann P. Trends in β-lactam resistance among Enterobacterales. Clinical infectious diseases. 1998;27(Supplement_1):S100–S106. PMID: 9710678. Available from: https://doi.org/10.1086/514905.
4. Aslantas Ö, Yilmaz ES. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC β-lactamase (pAmpC) producing Escherichia coli in dogs. Journal of Veterinary Medical Science. 2017;p. 16–0432. PMID: 28450661. Available from: https://doi.org/10.1292/jvms.16-0432.
5. Belas A, et al. Risk factors for faecal colonisation with Escherichia coli producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β-lactamases in dogs. Veterinary Record. 2014;175(8):202. PMID: 24943100. Available from: https://doi.org/10.1136/vr.101978.
6. Nguyen VT, et al. Prevalence and risk factors for carriage of antimicrobial-resistant Escherichia coli on household and small-scale chicken farms in the Mekong Delta of Vietnam. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015;70(7):2144–2152.
7. Nhung NT, et al. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. Frontiers in veterinary science. 2017;4:126. PMID: 28848739. Available from: https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126.
8. ;Available from: https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/.
9. Cantarelli VV, et al. Utility of the ceftazidime-imipenem antagonism test (CIAT) to detect and confirm the presence of inducible AmpC beta-lactamases among Enterobacterales. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2007;11(2):237–239. PMID: 17625769. Available from: https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000200014.
10. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. 2009;.
11. Lan NPH, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of ESBL and AmpC producing organisms associated with bacteraemia in Ho Chi Minh City, Vietnam. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2017;6(1):1–9. PMID: 29046783. Available from: https://doi.org/10.1186/s13756-017-0265-1.
12. Oteo J, et al. AmpC β-lactamases in Escherichia coli: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2010;67(3):270–276. PMID: 20462723. Available from: https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.008.
13. Pitout JDD, et al. Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli isolates from the Calgary Health Region. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(6):2539–2543. PMID: 19364876. Available from: https://doi.org/10.1128/AAC.00061-09.
14. Meyer E, et al. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli. Infection. 2012;40(6):685–687. PMID: 22971936. Available from: https://doi.org/10.1007/s15010-012-0324-8.
15. Smet A, et al. Diversity of extended-spectrum β-lactamases and class C β-lactamases among cloacal Escherichia coli isolates in Belgian broiler farms. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(4):1238–1243. PMID: 18227190. Available from: https://doi.org/10.1128/AAC.01285-07.
16. Schlundt J, et al. Emerging food-borne zoonoses. Revue scientifique et technique-office international des epizooties. 2004;23(2):513–534. PMID: 15702717. Available from: https://doi.org/10.20506/rst.23.2.1506.
17. Newell DG, et al. Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. International journal of food microbiology. 2010;139:S3–S15. PMID: 20153070. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021.

Science & Technology Development Journal – Natural Sciences, 5(2):1198-1207

Open Access Full Text Article

Research article

Carriage of ESBL and Amp-C -β-lactamase among *Escherichia coli* strains isolated from dogs in kennels Dak Lak province

Le Chi Kien[1], Vo Quoc Cuong[1], Tran Thanh Xuan[1], Dang Manh Hung[1], Nguyen Ngoc My Huyen[2], Phan Thi Phuong Trang[3,*], James Ian Campbell[2], Nguyen Van Minh Hoang[2]

Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

The global prevalence of antimicrobial resistance and Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases is continuously widespread among *Escherichia coli* during recent years, especially in Viet Nam. In Viet Nam, there have been researches on ESBL and AmpC-carrying *E. coli* inhabiting animal and human. However, studies of antimicrobial resistance in *E. coli* residing in pets, especially dogs are unavailable. The aim of the study was to investigate the antimicrobial sensitivity testing (AST), the resistance to 3^{rd} cephalosporin and penicillin, also to assess the molecular detection of ESBL and Amp-C-β-lactamase in *E. coli* isolates inhabiting the digestive tract of dogs at kennels Dak Lak. By using double disk synergy test (DDST), and ceftazidime-imipenem antagonism test (CIAT) to detect phenotypic characteristic of *E. coli* strains producing extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) and plasmid-mediated Amp-C-β-lactamase, and by using multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) to confirm the presence of ESBL genes (class A): $bla_{CTX-M(1,2,8,9,25)}$, bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{OXA} and genes encoding AmpC-type beta lactamase (class C): $bla_{MOX-1;2}$, $bla_{CMY-(1;2-7;8-11)}$, $bla_{LAT-(1;4)}$, $bla_{DHA-(1;2)}$, bla_{ACC}, $bla_{FOX-(1-5B)}$, bla_{MIR-1}, bla_{ACT-1}. From of three hundred twelve bacteial strains isolated from sixty-four rectal swabs two hundred sixty-nine *E. Coli,* isolates accounting for 86%, were identified and isolated, forty-four (16%) and twelve (4%) *E. coli* isolates encoding with ESBL andAmp-C-β-lactamases. From molecular diagnosis with regard to phenotype, production of ESBL was shown in thirty-nine (15%) *E. coli* isolates and Amp-C enzymes in eight (3%) *E. coli* isolates. The high percentage of *E. coli* exhibiting antibiotic resistance revealed the accelerated overuse of antibiotics. Result of this study will contribute to the monitoring of epidemiologic resistance.

Key words: resistance, Đak Lak, dogs, E. coli, ESBL, Amp-C-β-lactamase

[1]*Regional Animal Health Office No. 5, Vietnam*

[2]*Oxford University Clinical Research Unit (OUCRU-HCMC), Vietnam*

[3]*Center for Bioscience and Biotechnology, University of Science, VNUHCM, HCMC, Vietnam*

Correspondence

Phan Thi Phuong Trang, Center for Bioscience and Biotechnology, University of Science, VNUHCM, HCMC, Vietnam

Email: ptptrang@yahoo.com

History

- Received: 21-12-2020
- Accepted: 23-04-2021
- Published: 03-05-2021

DOI : 10.32508/stdjns.v5i2.996

Check for updates

Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

VNU-HCM Press

Cite this article : Kien L C, Cuong V Q, Xuan T T, Hung D M, Huyen N N M, Trang P T P, Campbell J I, Hoang N V M **Carriage of ESBL and Amp-C -β-lactamase among *Escherichia coli* strains isolated from dogs in kennels Dak Lak province**. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.;* 5(2):1199-1207.