

TÌNH HÌNH NHIỄM *Escherichia coli* SINH BETA-LACTAMASE PHỔ RỘNG TRÊN GÀ BỆNH Ở TỈNH VĨNH 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

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 25/10/2016

Title:

Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* on sick chickens in Vinh Long province

Từ khóa:

E. coli, ESBL, bla CTX-M, bla TEM, bla SHV, gà bệnh, Vĩnh Long

Keywords:

E. coli, ESBL, bla CTX-M, bla TEM, bla SHV, sick chickens, Vinh Long province

ABSTRACT

The study was carried out to investigate the presence of extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* (ESBL *E. coli*) isolated from 100 sick chickens in Vinh Long province by the combination disc methods. The results showed that 61% of sick chickens infected with ESBL-producing *E. coli* and they were detected in lungs (8%), livers (7%), muscles (15%) and faeces (56%); the presence of ESBL *E. coli* on broilers (82.14%) was higher than that on layers (34.09%). Two hundred ESBL *E. coli* isolates were selected for the antibiotic susceptibility test to 13 antibiotics by the disc diffusion method. The results showed that these isolates were resistant to 2-12 antibiotics. Resistance was most frequently observed to beta-lactams such as ampicillin (99.5%), cefaclor (94%) and cefuroxime (76%); however, these isolates were still sensitive to amikacin (95.5%), fosfomycin (83%) and doxycycline (75%). Forty multidrug-resistant ESBL producing *E. coli* isolates were selected for the determination of beta-lactamase coding bla CTX-M, bla TEM, bla SHV genes by Polymerase Chain Reaction method. It was additionally shown that bla TEM gene, bla CTX-M gene and bla SHV gene were frequently detected in the tested isolates (90%, 85% and 62.5% 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 100 con gà bệnh ở tỉnh Vĩnh Long bằng phương pháp đĩa kết hợp. Kết quả nghiên cứu cho thấy 61% gà bệnh nhiễm *E. coli* sinh ESBL và những vi khuẩn này được tìm thấy trên phổi (8%), gan (7%), thịt (15%) và phân (56%); sự hiện diện của *E. coli* sinh ESBL trên gà thịt (82,14%) cao hơn trên gà đẻ (34,09%). Hai trăm chủng *E. coli* sinh ESBL được kiểm tra tính nhạy cảm với 13 loại kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chủng vi khuẩn này đề kháng từ 2-12 loại kháng sinh. Sự đề kháng cao nhất đối với các kháng sinh nhóm beta-lactam: ampicillin (99,5%), cefaclor (94%) và cefuroxime (76%). Tuy nhiên, các chủng vi khuẩn này vẫn còn nhạy cảm cao với kháng sinh amikacin (95,5%), fosfomycin (83%) và doxycycline (75%). Bốn mươi chủng *E. coli* sinh ESBL đa kháng được chọn để xác định gene bla TEM, bla SHV, bla CTX-M mã hóa beta-lactamase phổ rộng bằng phương pháp PCR. Kết quả cho thấy, tỷ lệ gene bla TEM, bla CTX-M và bla SHV được phát hiện nhiều ở các chủng kiểm tra (lần lượt là 90%, 85% và 62,5%).

Trích dẫn: Bùi Thị Lê Minh, Lưu Hữu Mạnh và Nguyễn Nhựt Xuân Dung, 2016. Tình hình nhiễm *Escherichia coli* sinh beta-lactamase phổ rộng trên gà bệnh ở tỉnh Vĩnh Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 2): 6-10.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh *E. coli* trên gà hay còn gọi là APEC (Avian pathogenic *Escherichia coli*) là một trong những bệnh nhiễm khuẩn quan trọng ảnh hưởng tới chăn nuôi gà công nghiệp trên thế giới. Gà nhiễm

E. coli có thể dẫn đến nhiều bệnh như nhiễm trùng đường hô hấp, viêm phúc mạc hoại tử, viêm bao tim, viêm gan, viêm vòi trứng, viêm túi bursa, viêm khớp, bại liệt, viêm ruột tiêu chảy (Barnes *et al.*, 2008). Hiện nay, vi khuẩn kháng thuốc ngày càng

nhiều và đề kháng kháng sinh là vấn đề đang được quan tâm nghiên cứu trên thế giới trong đó có vi khuẩn *E. coli* sinh beta-lactamase phổ rộng (Extended spectrum beta-lactamase: ESBL). Kết quả nghiên cứu gần đây của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL ở gà tương đối cao. Ở Nigeria, Sunday *et al.* (2010) nghiên cứu trên 528 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập trên gà khỏe và 223 chủng *E. coli* phân lập trên gà bệnh, kết quả *E. coli* sinh ESBL trên gà khỏe và gà bệnh là 4,3% (25/582) và 28,7% (64/223), *E. coli* sinh ESBL được phát hiện trên gan 16,9% (15/89) và phổi 15,5% (19/123). Tuy nhiên, ở Việt Nam có rất ít nghiên cứu về *E. coli* sinh beta-lactamase phổ rộng trên vật nuôi nói chung và trên gà nói riêng, do đó nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiện trạng nhiễm và mức độ phát hiện các gen mã hóa ESBL ở *E. coli* phân lập từ gà bệnh tại tỉnh Vĩnh Long.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu được thu thập từ 100 con gà bệnh ở 20 hộ và trại chăn nuôi gà công nghiệp ở tỉnh Vĩnh Long. Mỗi con gà thu thập bốn loại mẫu gồm thịt, gan, phổi và phân.

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

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp phân lập *E. coli* sinh beta-lactamase phổ rộng

Mẫu được ria cấy trên môi trường thạch MacConkey có bổ sung ceftazidime 2mg/l, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau nuôi cấy, 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).

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

Các chủng *E. coli* sinh ESBL được kiểm tra tính nhạy cảm với 13 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), fosfomycin (50 µg), trimethoprim + sulfamethoxazole (1,25/23,75 µg). Kết quả xác định mức độ nhạy cảm, trung gian và kháng của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL đối với kháng sinh dựa theo tiêu chuẩn CLSI (2014).

2.2.3 Phương pháp xác định gen mã hóa beta-lactamase phổ rộng

Gen 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. Nghiên cứu sử dụng cặp mồi F: 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3' và R: 5'-TTACTGTCATGCCATCC-3' để khuếch đại đoạn gen bla TEM có chiều dài 351 bp (Rasheed *et al.*, 2000); cặp mồi F: 5'-ACTGAATGAGGCGCTTCC-3' và R: 5'-ATCCGCAGATAAATCACC-3' để khuếch đại đoạn gen bla SHV có chiều dài 297 bp (Gniadkowski *et al.*, 1998) và cặp mồi F: 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3' và R: 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' để khuếch đại đoạn gen bla 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).

2.2.4 Phương pháp phân tích thống kê

Số liệu so sánh tỷ 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 gà bệnh tại tỉnh Vĩnh Long

Bảng 1: Tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL trên gà bệnh tại tỉnh Vĩnh Long

Loại gà	Số con gà khảo sát	Số con gà dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)
Gà thịt	56	46	82,14 ^a
Gà đẻ	44	15	34,09 ^b
Tổng	100	61	61,0

^{a,b}: Những giá trị mang chữ số mũ khác nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p=0,000$)

Tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL trên gà bệnh tại tỉnh Vĩnh Long khá cao 61%, trong đó tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL trên gà thịt (82,14%) cao hơn trên gà đẻ (34,09%) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p = 0,000$). Theo Barnes *et al.* (2008), gà mái bị nhiễm vi khuẩn *E. coli* có thể truyền qua trứng và truyền ngang thông qua việc tiếp xúc với các gia cầm khác, qua phân, nước, thức ăn, hoặc hít

phải bụi bẩn trong môi trường chăn nuôi. Vì vậy, người chăn nuôi cần thường xuyên vệ sinh sát trùng chuồng trại định kỳ để hạn chế sự lây truyền *E. coli* sinh ESBL.

3.2 Kết quả khảo sát *E. coli* sinh ESBL trên các loại mẫu thu thập

Gà bệnh có sự hiện diện *E. coli* sinh ESBL ở nhiều vị trí khác nhau trong cơ thể như gan (7%), phổi (8%), thịt (15%) và chủ yếu hiện diện trong phân (56%). Điều này có thể giải thích do *E. coli* là vi khuẩn thường trú ở đường ruột, chúng được thải chủ yếu qua phân. Vi khuẩn *E. coli* có thể truyền qua đường tiêu hóa, vết thương ngoài da, niêm mạc bị tổn thương. Ở gà trưởng thành, bệnh lây lan chủ yếu qua đường hô hấp. Sau khi xâm nhập qua đường hô hấp, vi khuẩn đi vào mạch ở túi khí hoặc niêm mạc đường hô hấp bị tổn thương do các nguyên nhân như *Mycoplasma*, vi rút Newcastle có độc lực vừa, *Haemophilus paragallinarum* có thể làm tổn thương biểu mô của đường hô hấp trên như niêm mạc mũi, thanh quản, túi khí sẽ tạo điều kiện cho sự bám dính của vi khuẩn *E. coli*. Vi khuẩn đi vào máu gây nhiễm trùng huyết và đến các cơ quan nội tạng gây nên các biến đổi bệnh lý (Barnes *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2009).

Bảng 2: Tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL trên các loại mẫu

Loại mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)
Gan	100	7	7 ^a
Phổi	100	8	8 ^a
Thịt	100	15	15 ^b
Phân	100	56	56 ^c

a,b: Những giá trị mang chữ số mũ khác nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p=0,000$)

3.3 Kết quả kiểm tra tính nhạy cảm của *E. coli* sinh ESBL với một số loại kháng sinh

Vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL phân lập từ gà bệnh tại tỉnh Vĩnh Long nhạy cảm cao với amikacin 95,5%, fosfomycin 83%, và doxycycline 75%, trong khi đó lại đề kháng rất cao với các kháng sinh nhóm beta-lactam (ampicillin 100%, cefaclor 94% và cefuroxime 76%) và trimethoprim+sulfamethoxazole (85%). Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn cho thấy các chủng vi khuẩn đa kháng từ 2 đến 12 loại kháng sinh với 110 kiểu hình đa kháng, điều này làm giới hạn việc lựa chọn cũng như phối hợp kháng sinh trong phòng và trị bệnh cho gà.

Bảng 3: Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL nhạy cảm và đề kháng với kháng sinh

Tên kháng sinh	Số chủng kiểm tra (n = 200)					
	Nhạy		Trung gian		Kháng	
	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Ampicillin	1	0,5	0	0,0	199	99,5
Cefuroxime	41	20,5	7	3,5	152	76,0
Cefaclor	5	2,5	7	3,5	188	94,0
Gentamicin	98	49,0	43	21,5	59	29,5
Streptomycin	49	24,5	25	12,5	126	63,0
Kanamycin	81	40,5	2	1,0	117	58,5
Amikacin	191	95,5	2	1,0	7	3,5
Tetracycline	76	38	44	22,0	80	40,0
Doxycycline	150	75,0	39	19,5	11	5,5
Norfloxacin	76	38,0	37	18,5	87	43,5
Ofloxacin	99	49,5	27	13,5	74	37,0
Fosfomycin	166	83,0	6	3,0	28	14,0
Trimethoprim+sulfamethoxazole	25	12,5	4	2,0	171	85,5

3.4 Kết quả xác định gen blaCTX-M, blaTEM và blaSHV mã hóa ESBL

Vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL mang các gen blaTEM, blaCTX-M và blaSHV mã hóa ESBL với tỷ lệ cao lần lượt là 90%, 80% và 62,5%. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn phát hiện có 6 kiểu hiện diện các gen này trên vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL. Sự hiện diện độc lập gen blaTEM chiếm 2,5% (1/40), gen blaSHV chiếm 5% (2/40). Các chủng

mang đồng thời hai gen blaTEM và blaCTX-M, blaTEM và blaSHV, blaCTX-M và blaSHV, chiếm tỷ lệ lần lượt là 35% (14/40), 7,5% (3/40) và 5% (2/20). Điều đáng chú ý là có 45% (18/40) chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL hiện diện đồng thời ở ba gen blaTEM, blaCTX-M và blaSHV. Theo Livermore and Woodford (2004), các beta-lactamase phổ rộng có mức độ hoạt động kháng lại các cephalosporin khác nhau, blaTEM và blaSHV có khả năng phân giải kháng sinh ceftazidime

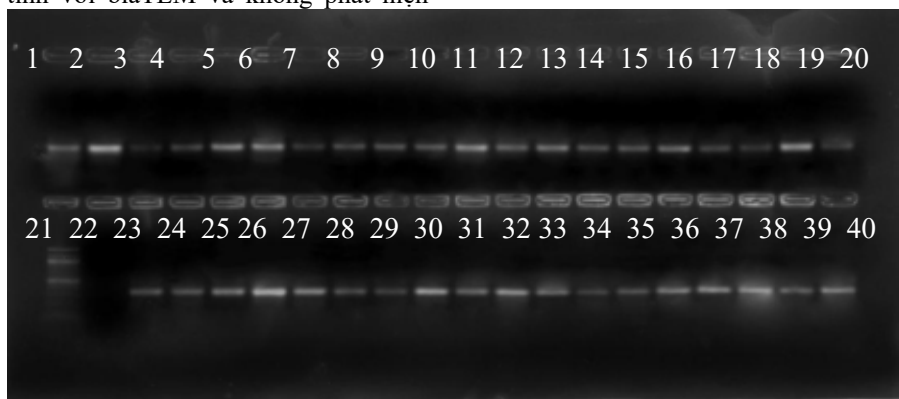
nhưng bị bất hoạt bởi cefotaxime, ngược lại blaCTX-M có khả năng phân giải kháng sinh cefotaxime nhưng bị bất hoạt bởi ceftazidime. Vì vậy, sự hiện diện của nhiều gen mã hóa beta-lactamase phổ rộng trên một chủng *E. coli* sinh ESBL cho thấy khả năng đề kháng kháng sinh do *E. coli* sinh ESBL càng nghiêm trọng, gây khó khăn cho công tác điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *E. coli* nhất là giải thích được vì sao việc sử dụng các cephalosporin phổ rộng ngày càng kém hiệu quả.

Kết quả nghiên cứu của Hồ Thị Kim Hoa và ctv. (2013) trên 15 mẫu phân gà cho thấy sự hiện diện của gen blaTEM là 93,33% (14/15), blaSHV là 13,33% (2/15), các mẫu dương tính với blaSHV đều dương tính với blaTEM và không phát hiện

gen blaCTX-M. Vì vậy cần có các nghiên cứu về gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trên gà tại các vùng miền khác nhau ở Việt Nam để có thể xây dựng bản đồ dịch tễ học về các loại gen này trên gà.

Bảng 4: Tỷ lệ hiện diện gen blaTEM, blaCTX-M và blaSHV

Gen	Số chủng vi khuẩn kiểm tra (n=40)	
	Số chủng vi khuẩn dương tính	Tỷ lệ (%)
BlaTEM	36	90,0
BlaCTX-M	34	85,0
BlaSHV	25	62,5



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen SHV

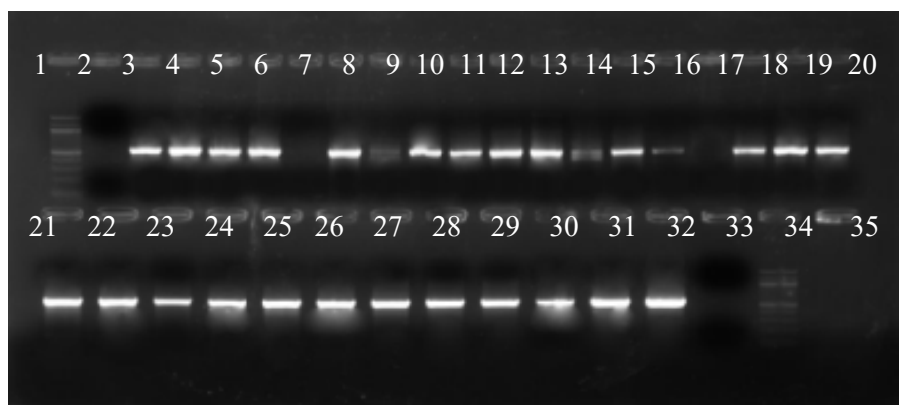
Chú thích: Giếng 21: ladder

Giếng 22: đối chứng âm

Giếng 23: đối chứng dương

Giếng 1; 2; 4-6; 9; 13-17; 19; 24-33; 36-40: kết quả dương tính.

Giếng 3; 7; 8; 10-12; 18; 20; 34; 35: kết quả âm tính



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen blaCTX-M

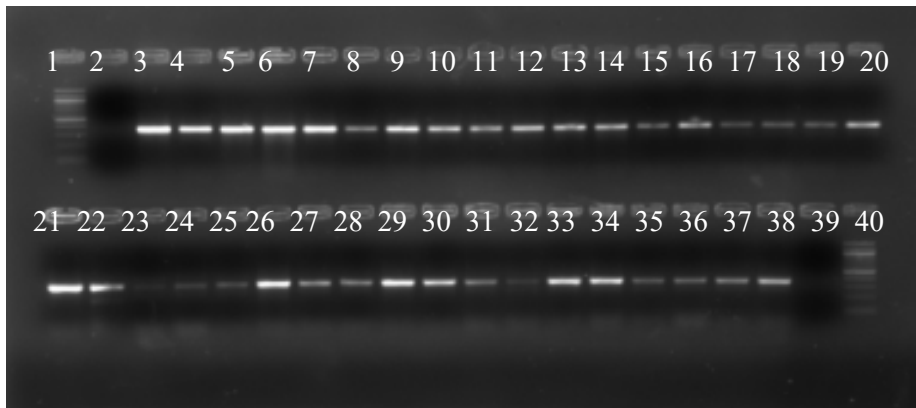
Chú thích: Giếng 1; 40: ladder

Giếng 2; 39: đối chứng âm

Giếng 3; 38: đối chứng dương

Giếng 4-6; 8; 10-15; 18-22; 24-27; 29-31: kết quả dương tính.

Giếng 7; 9; 16; 17; 23; 28: kết quả âm tính



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen blaTEM

Chủ thích: Giếng 1; 40: ladder

Giếng 2,39: đối chứng âm

Giếng 3,21: đối chứng dương

Giếng 4, 6-20, 22, 24-32, 34-36: kết quả dương tính.

Giếng 5, 23, 33, 37, 38: kết quả âm tính

4 KẾT LUẬN

Gà bệnh ở tỉnh Vĩnh Long nhiễm vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL với tỷ lệ cao. Các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL này mang gen blaTEM, blaCTX-M, blaSHV mã hóa beta-lactamase phổ rộng và đề kháng với nhiều loại kháng sinh. Kết quả kiểm tra tính nhạy cảm với kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL sẽ là cơ sở chọn lựa kháng sinh điều trị bệnh *E. coli* trên gà.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barnes H.J, Nolan L.K, and Vaillancourt J.P., 2008. Colibacillosis, Diseases of poultry, 12th edition. Blackwell Publishing Company, 691-737.

Bonnet R., Sampaio J.L.M., Labia R., De Champs C., Sirot D., Chanal C., Sirot J., 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.

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

Gniadkowski Marek, Pawel Grzesiowski, Pawel Grzesiowski, Andwaleria Hryniewicz, 1998. Outbreak of ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae in a pediatric hospital, in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(12):3079-3085.

Hồ Thị Kim Hoa, Huỳnh Thị Xuân Thắm, Cao Nhật Dung, Lê Hữu Ngọc, 2013. Phát hiện sự hiện diện một số gen nhóm β -lactamase phổ rộng (ESBLs) ở vi khuẩn trong nước thải chăn nuôi. Khoa học kỹ thuật thú y, số 3, tr 54-61.

Livermore D., 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. Oclarit, 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.

Ramirez R.M, Almanza Y., Garcia S., Heredia N., 2009. Adherence and invasion of avian pathogenic Escherichia coli to avian tracheal epithelial cells. World J. Microbiol. Biotechnol, 25: 1019-1023.

Rasheed J.K., Anderson G.J., Yigith H., Queenan A.M., Doménech-Salınchez A., Swenson J.M., Biddle J. W., Jacoby G. A., Tenover F. C., 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.

Sunday A.M., Godwin Onyemaechi Egwu & Gideon Dauda Mshelia, 2010. Beta-lactamase Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolated from chickens in Nigeria. Veterinaria Italiana, 46(2): 155-165.