



KHOA HỌC KỸ THUẬT Thú y

JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1859 - 4751

Tập XXVI • Số 3 - 2019

HỘI THÚ Y VIỆT NAM
VIETNAM VETERINARY ASSOCIATION

MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

- TRẦN THỊ THANH HÀ, TRƯƠNG ANH ĐỨC, LÝ ĐỨC VIỆT, VŨ THỊ HẢO, HOÀNG VĂN TUẤN, NGUYỄN THỊ CHINH, CHU THỊ NHƯ, NGUYỄN THỂ VINH, PHẠM THỊ NGỌC, ĐẶNG VŨ HOÀNG
Phân lập virus dịch tả lợn châu Phi trên môi trường tế bào Porcine Alveolar Macrophages (PAM) 5
- PHẠM MINH HẰNG, PHẠM THỊ THU THÚY, NGUYỄN VIỆT KHÔNG
Yếu tố nguy cơ liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS mức hộ chăn nuôi ở tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh 12
- ĐÀO LÊ ANH, NGUYỄN THỊ LAN, NGUYỄN THỊ HẠNH, NGUYỄN THỊ THU HẰNG, NGUYỄN THỊ HOA, NGUYỄN THỊ NGỌC, LÊ VĂN HÙNG
Một số đặc điểm bệnh lý ở lợn con tiêu chảy do Rotavirus 21
- TẠ PHAN ANH, NGUYỄN VĂN DUY, VƯƠNG LAN ANH, TRẦN THỊ ĐỨC TÁM, NGUYỄN BÁ TIẾP
Ảnh hưởng của nồng độ muối cao và phương thức nuôi đến tỷ lệ phân lập, số lượng và tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* trên giống vịt biển 15 Đại Xuyên 31
- NGUYỄN THỊ ĐÁU, HỒ THỊ VIỆT THU
Đặc điểm di truyền của gen kháng kháng sinh ở vi khuẩn *Vibrio cholerae* phân lập tại tỉnh Trà Vinh 38
- CAM THỊ THU HÀ, PHẠM HỒNG NGÂN, TRƯƠNG LAN OANH, NGUYỄN THỊ TRANG
Khảo sát chất lượng sữa bò tươi tại xã Phù Đồng, huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội 47
- NGUYỄN NGỌC MINH TUẤN, BÙI KHÁNH LINH, NGUYỄN HOÀNG THỊNH, NGUYỄN THỊ THU HẰNG, TRẦN THỊ HẠNH, CHU ĐÌNH TỐI, MAI VŨ THANH
Xác định một số gen gây bệnh của vi khuẩn chịu nhiệt *Campylobacter* spp. phân lập từ thịt lợn và thịt gà tại Việt Nam 54
- NGUYỄN VĂN TUYẾN
Đánh giá mức độ ô nhiễm vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh thực phẩm, đặc điểm sinh học của vi khuẩn *E. coli* trong thịt lợn tại tỉnh Điện Biên 61

NÂNG CAO - THAM KHẢO

- NGUYỄN ĐĂNG THỌ
Các phương pháp chẩn đoán dịch tả lợn châu Phi, chẩn đoán phân biệt với dịch tả lợn cổ điển và một số bệnh đốm khác 71

TRAO ĐỔI KHKT - HOẠT ĐỘNG NGÀNH

- FERNANDO RODRÍGUEZ
Khi nào chúng ta có vaccin phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi - ASF 89
- ĐẬU NGỌC HẢO (dịch)
Cập nhật tình hình dịch tả lợn châu Phi tại Trung Quốc 91
- TRẦN XUÂN HẠNH, NGUYỄN QUANG HUY
Interferon type I và bệnh dịch tả heo châu Phi 94
- HOÀNG KHÁNH HÙNG
Từ nguyên tắc phòng chống dịch bệnh truyền nhiễm đến phương pháp phòng chống dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi và định hướng công tác phòng chống dịch bệnh trong thời gian tới 96
- CEVA VIỆT NAM
Coglapest và dịch vụ kỹ thuật đánh giá miễn dịch bảo hộ dịch tả heo cổ điển (CSF) 99

ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA GEN KHÁNG KHÁNG SINH Ở VI KHUẨN *VIBRIO CHOLERA* PHÂN LẬP TẠI TỈNH TRÀ VINH

Nguyễn Thị Đâu¹, Hồ Thị Việt Thu²

TÓM TẮT

Trong số 25 chủng *Vibrio* spp. phân lập được từ các loại mẫu nước sông, nước biển, thức ăn có nguồn gốc thủy sản tại tỉnh Trà Vinh vào tháng 12 năm 2014, có 6 chủng được định danh là *Vibrio cholerae* và được xác định tính nhạy cảm đối với 8 loại kháng sinh. Bằng phương pháp Kirby-Bauer (CLSI, 2010), đã xác định được các chủng đề kháng kháng sinh bao gồm: streptomycin (50%), ampicillin (17%), tetracycline (33%), trimethoprim-sulfamethoxazole (33%) và vancomycin (67%). Bằng phương pháp PCR, đã phát hiện được 2 chủng *Vibrio cholerae* trong tổng số 6 chủng kiểm tra chứa gen kháng kháng sinh *tetA*, gen mã hóa kháng tetracycline, các nhóm gen *blaSHV*, *aac(3)-IV* và *dhfrI* mã hoá đề kháng với kháng sinh β -Lactam, Aminoglycosid, Trimethoprim đã không phát hiện được ở nghiên cứu này.

Trình tự nucleotide đoạn gen của 2 chủng *Vibrio cholerae* trong nghiên cứu này so sánh với các chủng phân lập được tại Thái Lan, Nhật Bản, Trung Quốc, Indonesia, Brazil và Ấn Độ cho thấy mức độ tương đồng là 97% với 10 chủng; tương đồng 96% với 1 chủng và tương đồng 94% với 2 chủng. Cây phả hệ về chủng loài cũng chứng tỏ mối quan hệ gần của những chủng mang gen kháng kháng sinh luôn có nguy cơ tiềm ẩn, dễ dàng thu nhận và lây truyền các gen kháng từ các yếu tố di truyền như plasmid, integrons, transposons (gen nhảy). Đột biến gen kháng thuốc của vi khuẩn *V. cholerae* luôn hiện diện ngoài môi trường và trong thức ăn có nguồn gốc từ hải sản.

Từ khoá: *Vibrio cholerae*, gen kháng kháng sinh, trình tự tương đồng, Trà Vinh.

Genetic characteristics of antibiotic resistance genes in *Vibrio cholerae* isolated in Tra Vinh province

Nguyen Thi Dau, Ho Thi Viet Thu

SUMMARY

Out of 25 *Vibrio* spp. strains isolated from the river, sea water and feed having origin from fish in Tra Vinh province in December, 2014, there were 6 strains classified as *Vibrio cholerae* strains and they were tested for antibiotic resistance with 8 antibiotics. By Kirby-Bauer method, the antibiotic resistance strains were determined, including 50% of the strains were resistant to streptomycin, 17% were resistant to ampicillin, 33% were resistant to tetracycline, 33% were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and 67% were resistant to vancomycin. The PCR analysis results also showed that there were 2 out of 6 *Vibrio cholerae* strains containing antibiotic resistance *tetA* gene encoding for tetracycline resistance, the antibiotic resistance gene groups (*blaSHV*, *aac(3)-IV* and *dhfrI*) encoding for resistance to antibiotics: β -lactam, aminoglycosid, trimethoprim were not detected in this study.

The nucleotide sequence similarity level of the *TestAF* and *TestAR* genes of the isolated strains in this study in comparison with those of the other isolated strains in Thailand, Japan, China, Indonesia, Brazil and India was 97% with 10 strains; 96% with 01 strains and 94% with 02 strains. The result of phylogenetic tree analysis also showed close relationship of the strains carrying antibiotic resistance genes are always potential risks, easy to receive and transfer the antibiotic resistance genes from genetic factors, such as: plasmids, integrons, transposons. The antibiotic resistance mutation genes in *V. cholerae*, are always present in the environment and seafood.

Keywords: *Vibrio cholerae*, antibiotic resistance gene, homological sequence, Tra Vinh.

¹ Trường Đại học Trà Vinh

² Đại học Cần Thơ

I. GIỚI THIỆU

Vibrio cholerae là vi khuẩn Gram âm, tác nhân của bệnh dịch tả trên người, gây tiêu chảy cấp tính và mất nước, dịch bệnh xảy ra với các hình thức dịch địa phương và đại dịch. *V. cholerae* đã được phân loại hơn 200 nhóm huyết thanh. Trong số này, chỉ có nhóm huyết thanh O1 và O139 là gây dịch bệnh (Kaper, 1995; Faruque, 1998). Có nhiều loại kháng sinh sử dụng không còn hoặc ít tác dụng với vi khuẩn này, trong đó có *V. cholerae*, đang là vấn đề phức tạp trong điều trị bệnh và là mối quan tâm đối với sức khỏe cộng đồng. Nhiễm sắc thể được chứng minh là yếu tố di truyền gen kháng thuốc của vi khuẩn (Ghosh et al., 2011). Việc thu nhận và lây truyền các gen kháng kháng sinh giữa các loài vi khuẩn trong môi trường là do các yếu tố di truyền như plasmid, integrons và transposons (gen nhảy) (Ghosh et al., 2011).

Thực phẩm và nước ô nhiễm vi khuẩn kháng kháng sinh là một mối đe dọa lớn đối với sức khỏe cộng đồng. Bên cạnh đó, thuốc kháng sinh thường được bổ sung vào thức ăn cho động vật đã góp phần làm tăng nguy cơ kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh trên người (Smith et al., 1999), điều này có thể khẳng định trong thực tế hiện tượng kháng kháng sinh đang gia tăng cả trong lĩnh vực chăn nuôi và y tế công cộng (Teuber, 2001; Bywater, 2004).

Đề cập nhật về hiện trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *V. cholerae* phân lập từ môi trường và thức ăn hải sản, đặc biệt là ở vùng đồng bằng sông Cửu Long, nơi có nhiều điều kiện để vi khuẩn lây lan như có nhiều sông ngòi, nơi phát triển nghề nuôi nghêu và tôm, cùng với mục tiêu nhằm xác định mối liên quan về đặc điểm di truyền của gen kháng kháng sinh ở *V. cholerae* phân lập trên môi trường nước và trên mẫu nghêu, chúng tôi đã tiến hành xác định đặc điểm di truyền của

gen kháng kháng sinh, từ đó xác định tính tương đồng của gen kháng kháng sinh của *V. cholerae* phân lập được tại tỉnh Trà Vinh với những chủng *V. cholerae* phân lập từ môi trường, thức ăn hải sản ở Việt Nam và trên thế giới.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp xác định sự đề kháng kháng sinh

Hai mươi lăm chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. phân lập được từ các loại mẫu nước sông, nước biển, thức ăn có nguồn gốc thủy sản tại tỉnh Trà Vinh trong tháng 12 năm 2014. Môi trường chuyên biệt dùng nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *Vibrio* như Alkaline peptone water (APW: 400086-Mumbai, India), Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS: 64271 Darmstadt, Germany), Saline Nutrient Agar (SNA: 64271 Darmstadt, Germany); bộ định danh vi khuẩn Gram âm với bộ test IDS 14GMR (Nam Khoa).

Phương pháp nuôi cấy, kiểm tra đặc tính sinh hoá để phát hiện và phân biệt các loài *Vibrio* được thực hiện theo quy trình ISO/TS 21872-2:2009 (E). Kiểm tra tính miễn cảm kháng sinh theo phương pháp chuẩn (CLSI, 2010: Clinical and Laboratory Standards Institute) với môi trường thạch Mueller-Hinton (MHA). Chọn 8 loại kháng sinh thường dùng trong điều trị bệnh tả do *Vibrio*: streptomycin (10µg), norfloxacin (10µg), ampicillin (10µg), tetracycline (30µg), azithromycin (30µg), amoxicillin-clavulanic acid (30µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25µg) và vancomycin (30µg).

Phương pháp PCR được thực hiện với các cặp môi trường ứng với gen kháng kháng sinh *bla_{SHV}*, *aac(3)-IV*, *tetA* và *dhfrI*, (bảng 1) (Maynard et al., 2003) và giải trình tự tìm đoạn gen tương đồng trên Genbank bằng chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Bảng 1. Trình tự nucleotid các cặp môi trong phản ứng PCR xác định gen kháng kháng sinh

Nhóm kháng sinh	Môi	Trình tự nucleotide của môi (5' → 3') Môi xuôi / Môi ngược	Độ dài (bp)
β-Lactam	<i>bla_{SHV}</i>	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	768
Aminoglycosid	<i>aac(3)-IV</i>	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC AGTTGACCCAGGGCTGTCCG	286
Tetracycline	<i>tetA</i>	GTGAAACCC AACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	888
Trimethoprim	<i>dhfrI</i>	AAGAATGGAGTTATCGGGAATG GGGTA AAAACTGGCCTAAAATTG	931

(Nguồn: Maynard et al., 2003)

2.2. Phương pháp giải trình tự

2.2.1. Quy trình tách chiết DNA từ khuẩn lạc

Chọn 10 khuẩn lạc trên môi trường thạch không chọn lọc (SNA: saline nutrient agar), cho vào tube chứa 2,2 ml có sẵn bi sắt vô trùng và lắc đều bằng máy vortex, sau đó thêm 1 ml dung dịch Lysis buffer, lắc đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, dùng pipette tách phần dung dịch (400 µl) chuyển sang tube mới. Cho một lượng tương đương Ethanol 95%, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, bỏ phần nước trong phía trên. Kết tủa được rửa bằng Ethanol 70% trong 500 µl, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Sấy khô phần tủa (DNA) trong 10 phút ở 45°C; sau đó hòa tan DNA thu được trong 100 µl TE 0.1X và trữ ở -20°C.

2.2.2. Phát hiện gen kháng kháng sinh bằng kỹ thuật PCR

Các gen kháng kháng sinh định hướng phát hiện bao gồm *bla_{SHV}*, *aac(3)-IV*, *tetA* và *dhfrI* với 4 cặp môi tương ứng có trình tự nucleotid được trình bày trong bảng 1 (Maynard et al., 2003). Thành phần 1 phản ứng PCR bao gồm: DNA tổng số khoảng 25µl; 2,5µl buffer 1X (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH 9.0, Triton X-100), 2µl MgCl₂, 4µl cho mỗi dNTP, 1µl mỗi xuôi và 1µl mỗi ngược, 0,25µl Taq DNA polymerase. Chu

kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95°C trong 10 phút, sau đó lặp lại 30 chu kỳ với các bước như sau: Biến tính ở 95°C trong 1 phút, gắn môi ở 53°C trong 1 phút, tổng hợp DNA ở 72°C trong 1 phút. Cuối cùng phản ứng được duy trì ở 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 1X ở 100V trong 90 phút và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000, thang chuẩn 100 bp. (công ty Fermentas).

2.2.3. Phân tích trình tự gen và thiết lập cây phả hệ

Sản phẩm PCR (DNA) được gửi giải trình tự tại công ty Macrogen Inc (Hàn Quốc). Các trình tự được phân tích và đọc bằng phần mềm BioEdit, sau đó so sánh với các trình tự nucleotid trong đồng trên Genbank và suy diễn với trình tự nucleotid tương ứng bằng chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), từ đó thiết lập cây phát sinh loài, sử dụng phương pháp Neighbor-joining, ký hiệu Gen-DKKS-T1-TraVinhVN-2014 và Gen-DKKS-T3-TraVinhVN-2014, quan sát cây phát sinh loài bằng phần mềm Treeview.

Các chủng vi khuẩn sử dụng trong so sánh và thiết lập cây phát sinh loài trong nghiên cứu này được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Các chủng vi khuẩn sử dụng so sánh và phân tích với trình tự các chủng *Vibrio cholerae*: Gen DKKS-T1-TraVinhVN-2014 và gen DKKS-T3-TraVinhVN-2014

Chủng vi khuẩn <i>Vibrio cholerae</i>	Nơi phân lập	Năm phân lập	Mẫu phân lập	Mã số Genbank
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 vcmD	Japan	2005		AB213657.1
<i>Vibrio cholerae</i> O395 chromosome I	China	2008	Nước	CP001235.1
<i>Vibrio cholerae</i> LMA3894-4 chromosome	Brazil	2011	Nước	CP002555.1
<i>Vibrio cholerae</i> MS6 DNA	Thailand	2014	Phân bệnh nhân	AP014524.1
<i>Vibrio cholerae</i> M66-2 chromosome I	Indonesia	2008		CP001233.1
<i>Vibrio cholerae</i> IEC224 chromosome I,	“Brazil: Belem”	2012		CP003330.1
<i>Vibrio cholerae</i> O1 str. 2010EL-1786	Haiti	2010	Nước	CP003069.1
<i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236 chromosome 1	Bangladesh	2009		CP001485.1
<i>Vibrio fluvialis</i> MATE-AshVFD69	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263361.1
<i>Vibrio fluvialis</i> MATE -AshVFD53	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263360.1
<i>Vibrio cholerae</i> clone FLH214558	USA	2006		DQ772843.1
<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-VCD43	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263362.1
<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-AshVCD44	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263363.1

2.3. Xử lý số liệu

Xử lý kết quả bằng phần mềm BioEdit (phân tích kết quả giải trình tự), phần mềm MEGA 5.05.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định tính miễn cảm kháng sinh của *V. cholerae*

Kết quả khảo sát sự nhạy cảm và kháng kháng sinh của 6 chủng thuộc *V. cholerae* được thể hiện qua bảng sau:

Bảng 3. Kết quả xác định tính miễn cảm kháng sinh của *V. cholerae*

Kháng sinh	Ký hiệu	Số mẫu kiểm tra	Nhạy cảm		Trung gian		Kháng	
			Số mẫu	%	Số mẫu	%	Số mẫu	%
Streptomycin	STH	6	3	50	0	0	3	50
Norfloxacin	NOR	6	6	100	0	0	0	0
Ampicillin	AMP	6	5	83	0	0	1	17
Tetracyclin	TCY	6	4	67	0	0	2	33
Azithromycin	AZM	6	4	67	0	0	2	33
Amoxicillin-clavulanic acid	AMC	6	5	83	0	0	1	17
Sulfamethoxazole Trimethoprim	STX	6	4	67	0	0	2	33
Vancomycin	VAM	6	2	33	0	0	4	67

Các kết quả trên cho thấy, các chủng *V. cholerae* nhạy cảm với nhiều loại kháng sinh

được sử dụng trên lâm sàng như norfloxacin 100%, ampicillin 83% và amoxicillin-

clavulanic acid 83%. Ngoài ra, *V. cholerae* đề kháng với vancomycin 67%, streptomycin 50%, tetracycline 33%, azithromycin 33%, trimethoprim-sulfamethoxazole 33% và vancomycin 67%. Các chủng *V. cholerae* phân lập ở miền Bắc Việt Nam từ năm 2007 đến 2010 luôn nhạy với các loại kháng sinh như ciprofloxacin 100% (nhóm Fluroquinolone bao gồm norfloxacin, ciprofloxacin), ampicillin 98%, azithromycin 95%. Đặc biệt đề kháng với trimethoprim-sulfamethoxazole 100%, tetracycline 29% (Huu Dat Tran *et al.*, 2012).

3.2. Kết quả phát hiện gen kháng thuốc của vi khuẩn *V. cholerae*

Trong các chủng *V. cholerae* đã phân lập, có nhiều chủng đa kháng kháng sinh, chủng O3.2 kháng với 3 loại kháng sinh tetracycline, vancomycin, azithromycin; chủng O1.2 kháng với 3 loại kháng sinh ampicillin, vancomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole; chủng N8 kháng với 2 loại kháng sinh tetracycline, vancomycin; chủng 81V1 kháng với 2 loại kháng sinh là azithromycin và amoxicillin-clavulanic acid; chủng Ng3 kháng với 2 loại kháng sinh streptomycin và vancomycin.

Bảng 4. Kết quả phát hiện gen kháng kháng sinh của *V. cholerae*

Mã code (n=6)	Kháng kháng sinh	Gen kháng kháng sinh	Các gen được phát hiện
O3.2 (T1)	TCY, VAM, AZM	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	<i>tetA</i>
O1.2 (T2)	AMP, VAM, STX	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-
N8 (T3)	TCY, VAM	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	<i>tetA</i>
85V1 (T4)	STX	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-
81V1 (T5)	AZM, AMC	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-
Ng3 (T6)	STH, VAM	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-

Ghi chú: STH (streptomycin), AMP (ampicillin), AMC (amoxicillin-clavulanic acid), AZM (azithromycin), STX (Sulfamethoxazole-Trimethoprim), TCY (tetracycline) và VAM (vancomycin).

Từ năm 2008 - 2010, tại Việt Nam đã phát hiện các chủng *V. cholerae* đa kháng với các loại kháng sinh: ampicillin, tetracycline và trimethoprim-sulfamethoxazole (Tran *et al.*, 2012). Điều đó cho thấy các chủng kháng thuốc sẽ tiềm ẩn nguy cơ lan truyền đến các nước lân cận. Hầu hết các *V. cholerae* O1 phân lập ở Thái Lan từ năm 2003 đến năm 2011 đều có khả năng kháng lại trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline - các loại thuốc được sử dụng thường xuyên để điều trị bệnh tiêu chảy cấp và bệnh tả (Supawat *et al.*, 2009).

Phần lớn các chủng *V. cholerae* phân lập ở Việt Nam vẫn còn nhạy cảm với kháng sinh azithromycin (95%), đây là loại kháng sinh được sử dụng để điều trị bệnh tiêu chảy ở nhiều nước

(de Saussure, 2009). Nhìn chung, những chủng *V. cholerae* phân lập ở Việt Nam có những đặc điểm kháng kháng sinh tương tự như những chủng phân lập ở Ấn Độ và Thái Lan (Jain *et al.*, 2011).

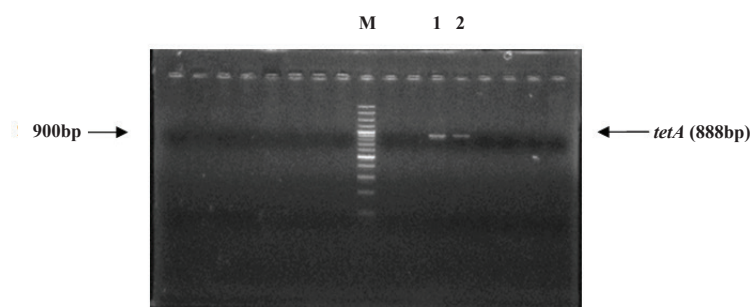
3.3. Xác định gen kháng kháng sinh của *V. cholerae* bằng kỹ thuật PCR

Kết quả cho thấy các sản phẩm PCR có kích thước khoảng 888bp, tương ứng với đoạn gen *tetA* được phát hiện ở 2 chủng *V. cholerae*. Gen *tetA* có trình tự bảo tồn đặc trưng cho *V. cholerae* nên các sản phẩm PCR quan sát được đều thuộc loài vi khuẩn này.

Qua nghiên cứu, chưa phát hiện chủng *V. cholerae* mang gen kháng kháng sinh *bla_{SHV}*

aac(3)-IV và *dhfrI*. Chủng *V. cholerae* (T1) phân lập từ môi trường nước biển và chủng *V. cholerae* (T3) phân lập từ ngẫu nhiên mang gen kháng kháng sinh tetracycline, thuộc nhóm kháng sinh Aminoglycosid. Như vậy, một số chủng trong nghiên cứu không chứa gen kháng kháng sinh tetracycline (*tetA*), nhưng chúng vẫn có khả năng kháng với tetracycline. Kết quả này cũng tương tự như kết quả của Dang và cs. (2006). Nghiên cứu của Thungapathra *et al.* (2002) đã cho thấy trong tổng số 94 chủng thuộc *Vibriosis* phân lập được, có 43 chủng chứa R-plasmid đề kháng với ampicillin, neomycin, tetracycline, gentamycin,

streptomycin, sulfonamide, furazolidone và chloramphenicol. Những kết quả nghiên cứu khác cũng cho thấy vi khuẩn *Vibrio* spp. kháng với một số loại thuốc có trong thức ăn hải sản. Cơ chế kháng phổ biến là thông qua plasmid chứa gen kháng thuốc và gen kháng này được gắn vào vi khuẩn qua các yếu tố như integrons, transposons (gen nhảy). Đây là một yếu tố quyết định tính kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* spp. Hơn nữa, vi khuẩn *Vibrio* spp. có khả năng truyền các gen kháng kháng sinh mã hoá plasmid sang người một cách trực tiếp hoặc gián tiếp (Raissy *et al.*, 2012).



Hình 1. Sản phẩm khuếch đại đoạn gen *tetA*
M: thang chuẩn 100bp, 1: *V. cholerae* T1, 2: *V. cholerae* T3

Ở Việt Nam, sự bùng phát bệnh dịch tả vào những 1995, 2000 và 2002 bởi những gen khác nhau của *V. cholerae* O1 (Ehara *et al.*, 2004). Nhiều giả thiết cho rằng những nhóm vi khuẩn kháng thuốc luôn hiện diện trong hệ vi khuẩn ngoài môi trường, chúng sinh sản rất nhanh; hoặc chúng có thể lan truyền từ các nước khác và từng nhóm sẽ tạo ra sự bùng phát dịch bệnh. Mặt khác, trong một nhóm vi khuẩn sẽ trải qua quá trình trao đổi gen, chèn thêm hoặc xoá các gen kháng kháng sinh, từ đó xuất hiện một nhóm vi khuẩn kháng thuốc mới (Ehara *et al.*, 2004).

Hầu hết những chủng thuộc *Vibrio* phân lập từ Việt Nam đều đa kháng thuốc, phổ biến nhất là nalidixic acid, cotrimoxazole và tetracycline. Tetracycline là kháng sinh dùng

phổ biến trong điều trị bệnh tả, 29% số chủng *V. cholerae* phân lập ở miền Bắc Việt Nam từ năm 2007 đến 2010 kháng với tetracycline (Huu Dat Tran *et al.*, 2012). Cả hai kháng sinh tetracycline và doxycycline thuộc nhóm kháng sinh tetracycline và sẽ có hiện tượng kháng chéo giữa các nhóm vi khuẩn thuộc *Vibrio*. Nếu sử dụng doxycycline để điều trị bệnh do *V. cholerae* O1 thì tetracycline cần phải được theo dõi thường xuyên (Fluit *et al.*, 2005).

3.4. Kết quả giải trình tự, so sánh trình tự các đoạn gen kháng kháng sinh

Nghiên cứu đã giải mã được đoạn gen *DKKS-T1-TraVinhVN-2014*, *DKKS-T3-TraVinhVN-2014* thuộc vi khuẩn *V. cholerae*. Kết quả so sánh trình tự được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Mức độ tương đồng đoạn gen kháng kháng sinh của *V. cholerae* (T1 và T3) với các trình tự trên Genbank bằng công cụ BLAST

Số hiệu gen	Chủng	Điểm	Che phủ	Ý nghĩa	Tương đồng
AB213657.1	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 vcmD	909	95%	0.0	97%
CP001235.1	<i>Vibrio cholerae</i> O395 (I)	1534	84%	0.0	97%
AP014524.1	<i>Vibrio cholerae</i> MS6 DNA, (I)	1534	84%	0.0	97%
CP001233.1	<i>Vibrio cholerae</i> M66-2 (I)	1534	84%	0.0	97%
CP003330.1	<i>Vibrio cholerae</i> IEC224 (I)	1534	84%	0.0	97%
CP003069.1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 str. 2010EL-1786	1534	84%	0.0	97%
CP001485.1	<i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236 (I)	1534	84%	0.0	97%
DQ772843.1	<i>Vibrio cholerae</i> clone FLH214558-USA-2006	1134	83%	0.0	97%
CP002555.1	<i>Vibrio cholerae</i> LMA3894-4 chromosome I	1516	85%	0.0	96%
EU263362.1	<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-AshVCD43	832	95%	0.0	94%
EU263363.1	<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-AshVCD44	826	95%	0.0	94%
EU263361.1	<i>Vibrio fluvialis</i> MATE-AshVFD69	837	95%	0.0	94%
EU263360.1	<i>Vibrio fluvialis</i> MATE -AshVFD53	837	95%	0.0	94%

Dựa vào kết quả giải trình tự các đoạn gen, so sánh với các trình tự tương đồng trên Genbank (BLAST), trong nghiên cứu này đã chọn ra những trình tự tương đồng cao với trình tự đoạn gen gồm các mã số: AB213657.1, CP001235.1, AP014524.1, CP001233.1, CP003330.1, CP003069.1, CP001485.1, DQ772843.1, CP002555.1, EU263362.1, EU263363.1, EU263361.1, EU263360.1.

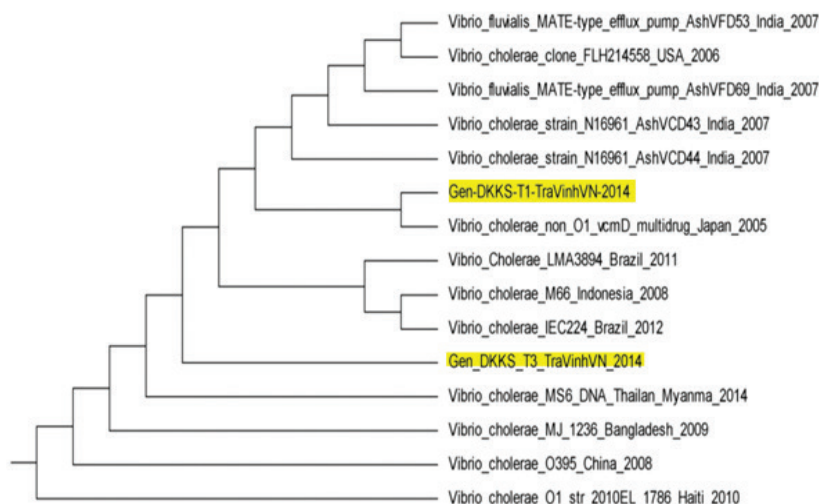
Từ giản đồ phả hệ thể hiện rõ về cơ chế tiến hóa liên quan đến các chủng kháng kháng sinh phân lập ngoài môi trường, từ thức ăn hải sản và từ bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng. Trong nghiên cứu này, 2 chủng *V. cholerae* phân lập tại Trà Vinh có mang gen mã hoá kháng kháng sinh tetracycline phân lập trên mẫu nước và mẫu nghêu có tỷ lệ tương đồng về trình tự nucleotide với các chủng khác ở Thái Lan, Nhật Bản, Trung Quốc, Indonesia, Brazil và Ấn Độ, tương đồng 97% với 8 chủng; tương đồng 96% với 1 chủng và tương đồng 94% với 4 chủng (bảng 5).

Kết quả cây phát sinh chủng loài cũng chỉ ra rằng các chủng từ Việt Nam có mối liên hệ gần với nhiều chủng *V. cholerae* khác như *V. cholerae* non-O1 vcmD phân lập tại Nhật Bản

năm 2005, *V. cholerae* LMA3894 phân lập tại Brazil năm 2011, chủng *V. cholerae* M66 phân lập tại Indonesia năm 2008 và chủng *V. cholerae* IEC224 phân lập tại Brazil năm 2012.

Chủng *V. cholerae* non-O1 vcmD là chủng đa kháng kháng sinh mang gen *cmD* có cơ chế bơm kháng sinh ra khỏi màng tế bào giúp tế bào vi khuẩn có thể kháng với nhiều loại kháng sinh. Ngoài ra, chủng *V. cholerae* trong nghiên cứu của chúng tôi cũng có mối liên hệ tương đối gần với các chủng khác, bao gồm chủng *V. cholerae* 2010EL-1786, *V. cholerae* O395 phân lập tại Trung Quốc năm 2008, *V. cholerae* MJ-1236 phân lập tại Bangladesh năm 2009, *V. cholerae* MS6 phân lập tại Thái Lan năm 2014, *V. cholerae* non-O1 vcmD phân lập tại Nhật Bản năm 2005, 2 chủng *V. cholerae* N16961 phân lập tại Ấn Độ năm 2007, *V. cholerae* clone FLH214558 phân lập tại Mỹ năm 2006 và đặc biệt có mối liên hệ xa nhất với loài *V. fluvialis* phân lập tại Ấn Độ năm 2007, loài khác nhau thì có mối liên hệ di truyền về kháng kháng sinh khác nhau, mặc dù chúng đều có chung nguồn gốc là Vibrios.

Một nghiên cứu khác cho thấy nhiễm sắc thể 1 và 2 của chủng MS6 đã thường xuyên



Hình 2. Cây phát sinh chủng loài của *Vibrio cholerae* về kháng kháng sinh
(Tamura K., 2004; Tamura K., Peterson D, 2011)

được sửa đổi bởi sự truyền gen từ các loài thuộc *Vibrio* sau khi phân kỳ từ một tổ tiên chung, do đó những chủng có mối liên hệ gần sẽ có những đặc điểm tương tự về gen kháng kháng sinh (Kazuhisa *et al.*, 2014).

Trong khi đó chủng *V. cholerae* N16961 đã được chứng minh có sự di truyền gen đa kháng thuốc mã hóa cho gen *EmrD-3* (Smith, 2009, Floyd, 2013). Các chủng phân lập ở Thái Lan từ năm 2003 đến năm 2004 cũng cho thấy 100% acid amin tương đồng với các acid amin chủng N16961. Tuy nhiên, gen TCPA của *V. cholerae* O1 ET chủng trong năm 2007 và sau đó đã có một đột biến ở vị trí amino acid 64 và điều này cũng được tìm thấy ở chủng *V. cholerae* 2010EL1786 (GenBank: CP003069), chủng này đã từng gây ra dịch bệnh ở Haiti (Reimer *et al.*, 2011).

Ở Việt Nam năm 2000, những chủng *V. cholerae* O1 đề kháng tetracycline là do gen *tetA*, gen kháng trimethoprim cũng không được tìm thấy trong thời điểm này. Các chủng phân lập vào năm 2002 lại nhạy cảm với tất cả các loại thuốc kiểm tra. Từ năm 2010 - 2011, những chủng *V. cholerae* phân lập tại Việt Nam mang gen kháng kháng sinh tương tự như chủng phân lập tại Ấn Độ và Thái Lan, đã tạo ra một biến thể mới của *V. cholerae* O1 (Jain *et al.*, 2011).

Hai chủng trong nghiên cứu này có gen kháng kháng sinh tương tự với các chủng so sánh và nguy cơ về sự di truyền gen kháng kháng sinh là rất cao trong những chủng thuộc loài *V. cholerae*.

IV. KẾT LUẬN

Từ 6 chủng *V. cholerae* được thử nghiệm về tính kháng kháng sinh, tỷ lệ kháng với streptomycin là 50%, ampicillin là 17%, tetracycline là 33%, trimethoprim-sulfamethoxazole là 33% và vancomycin là 67%. Có 2 chủng *V. cholerae* trong tổng số 6 chủng được kiểm tra chứa gen *tetA* - gen mã hóa kháng tetracycline; các nhóm gen *bla_{SHV}*, *aac(3)-IV* và *dhfrI* mã hoá cho nhóm kháng sinh β -lactam, Aminoglycosid, Trimethoprim chưa được phát hiện trong nghiên cứu này.

Tỷ lệ tương đồng về trình tự nucleotide của 2 chủng *V. cholerae* mang gen kháng kháng sinh tetracycline so sánh với các chủng khác có tương đồng 97% với 8 chủng, tương đồng 96% với 1 chủng và tương đồng 94% với 4 chủng. Cây phát sinh chủng loài cũng chứng tỏ mối quan hệ gần của những chủng mang gen kháng kháng sinh luôn có nguy cơ tiềm ẩn trong những chủng *V. cholerae* ngoài môi trường và trong thức ăn có nguồn gốc hải sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bywater, R. J, 2004. *Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU*. J. Vet. Med. B. 51: 361-363.
2. Dang, H., Zhang, X., Song, L., Chang, Y. and Yang, G, 2006. *Molecular characterizations of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture waters of China*. Marine Pollution Bulletin, 52 (11), 1494-1503.
3. Ehara, E, B. M. Nguyen, D. T. Nguyen, C. Toma, N. Higa, and M. Iwanaga, 2004. *Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic Vibrio cholerae O1 in Viet Nam*. Epidemiol. Infect. 132, 595–600.
4. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ, 1998. *Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev 62: 1301–1314.
5. Fluit, A. C., Florijn, A., Verhoef, J. & Milatovic, D, 2005. *Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tetracycline and amoxiciline*. Antimicrob Agents Chemother, 49: 1636–1638.
6. Floyd JT, Kumar S, Mukherjee MM, He G and Varela MF, 2013. *A review of the molecular mechanisms of drug efflux in pathogenic bacteria: A structure-function perspective*. Inc, Vol (3) 15-66.
7. Ghosh A, Ramamurthy T, 2011. *Antimicrobials & cholera: are we stranded?* J. Med Res 133: 225–231.
8. Huru Dat Tran, Munirul Alam, Nguyen Vu Trung, Hubert P. Endtz, and Heiman F. L. Wertheim, 2012. *Multi-drug resistant Vibrio cholerae O1 variant El Tor isolated in northern Viet Nam between 2007 and 2010*. Journal of Medical Microbiology, 61: 431–437.
9. Jain, M., Goel, A. K., Bhattacharya, P., Ghatole, M. & Kamboj, D. V, 2011. *Multidrug resistant Vibrio cholerae O1 El Tor carrying classical ctxB allele involved in a cholera outbreak in South Western India*. Acta Trop 117, 152–156.
10. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM, 1995. *Cholera*. Clin Microbiol Rev 8:48–86.
11. Kazuhisa Okada, Mathukorn Na-Ubol, Ichiro Nakagawa, Siriporn Chantaroj, et al, 2014. *Comparative Genomic Characterization of a Thailand–Myanmar Isolate, MS6, of Vibrio cholerae O1 El Tor, which Is Phylogenetically Related to a ‘US Gulf Coast’ Clone*. Volume 9 | Issue 6 | .
12. Raissy M; Moumeni M; Ansari M; Rahimi E, 2012. *Antibiotic resistance pattern of some Vibrio strains isolated from seafood*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 11(3): 618-626
13. Reimer, A. R., Van Domselaar, G., Stroika, S., Walker, M., Kent, H., Tarr, C., Talkington, D., Rowe, L., Olsen-Rasmussen, M. & other authors, 2011. *Comparative genomics of Vibrio cholerae from Haiti, Asia, and Africa*. Emerg Infect Dis 17: 2113–2121.
14. Tamura K., Nei M., and Kumar S, 2004. *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
15. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S, 2011. *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution.
16. Teuber, M, 2001. *Veterinary use and antibiotic resistance*. Curr. Opin. Microbiol. 4: 493-499.
17. Thungapathra, M., Amita Sinha, K. K., Chaudhuri, S. R., Garg, P., Ramamurty, T., Nair, G. B. and Ghosh, A, 2002. *Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac(6)-Ib, dfrA5, dfrA12, and ereA2 in class I integrons in non-O1, non- O139 Vibrio cholerae strains in India*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(9): 2948-55.
18. Smith KP, Kumar S and Varela MF, 2009. *Identificaton, cloning, and functional characterizaton of EmrD-3, a putative multidrug efux pump of the major facilitator superfamily from Vibrio cholerae O395*. Arch Microbiol. 191:903-11.
19. Smith, K. E., et al, 1999. *Quinolone-resistant Campylobacter jejuni infections in Minnesota*. N. Engl. J. Med. 340: 1525-153
20. Supawat, K., Huttayananont, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N. & Mootsikapun, P, 2009. *Antimicrobial resistance surveillance of Vibrio cholerae in Thailand from 2000 to 2004*. J Med Assoc, S82–S86.
21. Clinical and Laboratory Standards Intitute (CLSI, 2010). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
22. Iso/TS-1:2007. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp.*

Ngày nhận 24-1-2019

Ngày phản biện 2-3-2019

Ngày đăng 1-5-2019