

Bài báo nghiên cứu

**KHẢO SÁT PHÁT HIỆN *ESCHERICHIA COLI*
SINH NEW DELHI METALLO- β -LACTAMASE (*Bla_{NDM-1}*)
TRÊN CHÓ KHỎE MẠNH Ở CÁC TRẠI THÚ CÙNG ĐẮK LẮK**

Lê Chí Kiên², Võ Quốc Cường², Trần Thanh Xuân²,
Đặng Mạnh Hùng², Nguyễn Ngọc Mỹ Huyền¹, Trần Thị Bích Chiêu¹,
Phan Thị Phương Trang^{3*}, James Ian Campbell¹, Nguyễn Văn Minh Hoàng¹

¹Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford (OUCRU-HCMC)

²Chi Cục Thú y Vùng V, Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Phan Thị Phương Trang – Email: ptptrang@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 23-3-2021; ngày nhận bài sửa: 22-4-2021; ngày duyệt đăng: 09-6-2021

TÓM TẮT

Từ những năm 80 của thế kỉ XX, carbapenemase được coi là vũ khí cuối cùng để chống lại các vi khuẩn Gram âm đa kháng thuốc. Việc phát hiện các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen kháng kháng sinh mới: New Delhi metallo- β -lactamase (*bla_{NDM-1}*) trên người đã được biết đến trong những năm qua; tuy nhiên, rất ít các nghiên cứu được tiến hành trên động vật tại Việt Nam. Mục đích của nghiên cứu là khảo sát tính đề kháng và đánh giá kiểu hình, kiểu gen của các chủng *E. coli* kháng carbapenem trên chó khỏe mạnh ở Đắk Lắk. Khoảng 269 chủng *E. coli* được phân lập từ 64 mẫu phết hậu môn trên chó, được tiến hành khảo sát đề kháng bằng phương pháp định tính Kirby-Bauer với 11 loại kháng sinh khác nhau. Sự kết hợp của phương pháp bất hoạt Carbapenem cải tiến (mCIM) và EDTA – Carbapenem cải tiến EDTA-CIM (eCIM) để phát hiện kiểu hình *E. coli* sản sinh carbapenemase và PCR được thực hiện để xác định các gen kháng metallo- β -lactamases (NDM, VIM, IMP). Kết quả nghiên cứu phát hiện 4/269 chủng *E. coli* kháng với Carbapenem, 1/4 chủng phát hiện metallo- β -lactamase dựa trên kiểu hình mCIM và eCIM, dương tính với NDM-1 trên kiểu gen bằng PCR. Nghiên cứu mang ý nghĩa cập nhật thông tin cao bởi đây là phát hiện *E. coli* mang gen kháng NDM-1 trên chó khỏe mạnh đầu tiên tại Việt Nam.

Từ khóa: chó; Đắk Lắk; *Escherichia coli*; NDM-1

1. Đặt vấn đề

Carbapenem là nhóm kháng sinh β -lactam phổ mở rộng rất quan trọng trong các trường hợp nhiễm trùng do trực khuẩn Gram âm đa kháng ở người và động vật. Từ những năm 2000, sự lan nhanh của các vi khuẩn, đặc biệt các chủng có sản xuất extended spectrum beta-lactamases (ESBL) và plasmid-mediated AmpC beta lactamase, kháng carbapenem đã gây ra những cản trở trong quá trình điều trị (Temkin, & Elizabeth, 2014). Năm 2017, Tổ chức

Cite this article as: Le Chi Kien, Vo Quoc Cuong, Tran Thanh Xuan, Dang Manh Hung, Nguyen Ngoc My Huyen, Tran Thi Bích Chiêu, Phan Thi Phuong Trang, James Ian Campbell, & Nguyen Van Minh Hoang (2021). Carriage of New Delhi metallo- β -lactamase (*bla_{NDM-1}*) producing-*Escherichia coli* strains isolated from healthy dogs in kennels, Dak Lak Province. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 18(6), 976-986.

Y tế Thế giới (WHO) đã công bố vi khuẩn họ đường ruột kháng carbapenem thuộc danh sách những siêu vi khuẩn kháng kháng sinh ở cấp độ cao nhất (World Health Organization, 2017). Các “Superbug” (siêu vi khuẩn) này có khả năng bất hoạt carbapenem nhờ vào enzyme carbapenemase được mã hóa bởi các gen thông qua trung gian plasmid hoặc transposon (gen nhảy) (Elshamy et al., 2020). Dựa trên cấu trúc phân tử, carbapenemase được phân thành 3 nhóm chính (A, B và D). Trong đó, gen kháng New Delhi metallo β -lactamase (NDM) thuộc nhóm B được cho là quan trọng nhất của carbapenemase. NDM-1 được phân lập đầu tiên từ một bệnh nhân người Thụy Điển từng sinh sống ở New Delhi, Ấn Độ (Yong et al., 2009). Tính đến nay, đã có 24 các biến thể của NDM (NDM-1 đến NDM-24) được xác định (Wu et al., 2019). Trên thế giới, những năm gần đây, có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn sinh carbapenemase lan truyền giữa người, động vật và môi trường sống (Tamta et al., 2020, Zhai et al., 2020; Li et al., 2019). Trong mười năm qua, các báo cáo về *E. coli* mang gen kháng NDM trên động vật đã nổi lên như một cảnh báo và thách thức lớn đối với loài người (Shaheen et al., 2013; Cui et al., 2018). Các nhà khoa học từ các quốc gia như Ba Lan, Algeria, Thụy Sĩ, Mĩ, Hi Lạp, và Hàn Quốc đã có những công bố đầu tiên liên quan đến việc sự tồn tại gen kháng NDM trên các plasmid từ các chủng *E. coli* trên chó (Fielt et al., 2014, Yousfi et al., 2015, Peterhans et al., 2018, States, 2019; Ramadan et al., 2020). Tại Việt Nam, vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* mang gen NDM đã có dấu hiệu lan rộng trên người và trong các môi trường bệnh viện (Hoang et al., 2019). Tuy nhiên, nhóm kháng sinh này lại không được kiểm soát chặt chẽ trong các cơ sở chăn nuôi. Theo thống kê từ Cục Thú Y Việt Nam, cả nước có khoảng 7,7 triệu con chó nuôi trong gần 3,9 triệu hộ nuôi chó từ năm 2016 (Viet Nam Department of Animal, 2016). Năm 2019, một khảo sát về sở hữu vật nuôi khoảng 19% người dân thành thị ở Việt Nam sở hữu ít nhất một con chó (Statista Research Department, 2020). Tuy nhiên, vẫn chưa có một công bố cụ thể nào về sự lưu truyền gen kháng NDM trên chó tại Việt Nam. Những năm gần đây, ngành công nghiệp vật nuôi ở nước ta có xu hướng nở rộ, Đắc Lắc lại là nơi phát triển mô hình bán lẻ và chăm sóc thú cưng (chó, mèo) nằm trong top đầu của cả nước. Nghiên cứu tiến hành thu các mẫu phết hậu môn trên chó khỏe mạnh đang được bảo hộ tại các cơ sở chăn nuôi thú cưng. Sau đó tiến hành khảo sát đề kháng, xác định kiểu hình và kiểu gen kháng của chủng *E. coli* sinh carbapenemase. Đây là nghiên cứu phát hiện sự hiện diện gen kháng NDM đầu tiên trên động vật tại Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

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 phần 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 (CM-0003-Oxoid), môi trường Mueller-Hinton (CM0337-

Oxid) và 0,5M EDTA (Sigma-aldrich). Các môi trường trên được hấp khử trùng ở 121°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°C - 8°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. 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'Đrăk, Krông Pắc và Thành phố Buôn Ma Thuột thuộc tỉnh Đắk Lắk từ tháng 7/2019 đến tháng 12/2019

2.2.2. 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°C-8°C, 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.

2.2.3. Phương pháp phân lập, định danh, kháng sinh đồ vi khuẩn *E. coli*

Các mẫu phết được cấy trên môi trường thạch MacConkey (Oxid), ủ ở 35°C ± 2°C trong 16-18h; chọn 5 khuẩn lạc nghi ngờ là *E. coli*, sau đó tiến hành định danh bằng MALDI-TOF Matrix-assisted laser desorption/ionization.

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, 30th edition (Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm Hoa Kỳ) cho *Enterobacteriaceae*. Môi trường thạch Muller-Hinton có đường kính 90 mm, độ dày 4 mm được bảo quản lạnh 4°C-8°C. 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 × 10⁸ 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 khoan giấy kháng sinh từ tủ lạnh 4°C-8°C để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút. Đặt các mặt khoan giấy sao cho áp sát vào mặt thạch, mép ngoài của khoan giấy cách thành đĩa 15 mm, và cách khoan khác 20 mm. Để đĩa thạch ở nhiệt độ phòng cho kháng sinh khuếch tán rồi ủ ở nhiệt độ 35°C ± 2°C trong 16-18h. Sau thời gian ủ, dùng thước đo đường kính vùng ức chế, dựa vào thang đo của Viện tiêu

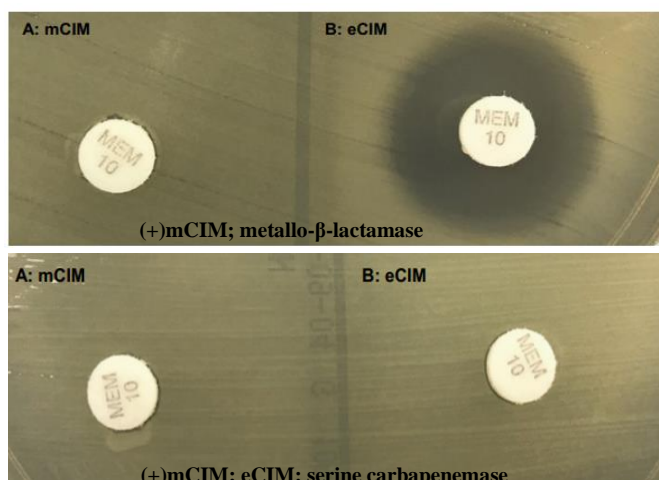
chuẩn lâm sàng xét nghiệm Hoa Kỳ và nồng độ khoanh giấy kháng sinh, ta có mức độ nhạy cảm của *E. coli* đối với từng loại thuốc kháng sinh.

2.2.4. Phương pháp Modified Carbapenem inactivation method (mCIM) phát hiện vi khuẩn sinh enzym carbapenemase

Vi khuẩn *E. coli* kháng với Imipenem hoặc Meropenem được tiếp tục kiểm tra trên mCIM (phương pháp bất hoạt Carbapenem cải tiến) theo hướng dẫn từ Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, M100, 30th edition (Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm Hoa Kỳ). Thử nghiệm dựa trên nguyên tắc về khả năng thủy phân kháng sinh Carbapenem (MEM, 10 μ g) nhờ vào sự hiện diện enzym carbapenemase sản xuất từ vi khuẩn *E. coli*. Thu đủ khuẩn lạc trên 1 μ l khay cấy nhựa (Oxoid,UK) hòa cùng 2ml Mueller-Hinton broth (MHB) trong ống thủy tinh, sau đó vortex trong 20 giây. Cho đĩa MEM – 10 μ g hòa trong hỗn hợp dịch vi khuẩn trong 4 giờ \pm 15 phút, ủ tại nhiệt độ 35 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C. Hỗn hợp dịch khuẩn *E. coli* ATCC 25922 có độ đục 0,5 McFarland được sử dụng làm chủng chỉ định miễn cảm meropenem, được quét trên đĩa thạch Mueller-Hinton trước thời gian trên khoảng 15 phút. Đĩa MEM – 10 μ g sau khi hết thời gian ủ, đặt trên đĩa thạch MH đã chuẩn bị trước đó (không quá 4 kháng sinh trên một đĩa thạch MH), sau đó tiếp tục ủ ở nhiệt độ 35 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C từ 18 đến 24 giờ. Vi khuẩn *E. coli* thử nghiệm sản xuất carbapenemase, đĩa kháng sinh MEM bị thủy phân, mất đi hoạt tính, xuất hiện vòng ức chế trong khoảng 6-15mm; ngược lại *E. coli* không sản xuất carbapenemase, đường kính vòng ức chế \geq 19mm (Hình 1).

2.2.5. Phương pháp EDTA-Modified Carbapenem inactivation method (eCIM) nhận biết nhóm enzym carbapenemase

Thử nghiệm eCIM dùng để phân biệt các carbapenemase có serine hoặc ion kẽm (metallo- β -lactamase) ở vị trí hoạt động, khi thực hiện kết hợp với phương pháp mCIM. Thử nghiệm có độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%, được thông qua bởi Clinical and Laboratory Standards Institute (Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm) như là một phương pháp xác định *Enterobacteriaceae* sinh metallo- β -lactamase khi kết quả mCIM dương tính. Với mỗi 2ml MHB ống thủy tinh, cho vào 20 μ l dung dịch EDTA 0.5M. Sau đó thu đủ 1 μ l khuẩn lạc *E. coli* thử nghiệm cho vào ống thủy tinh có chứa EDTA, tiến hành tương tự các bước được mô tả ở phương pháp mCIM. Đĩa MEM – 10 μ g từ mCIM và eCIM được đặt trên cùng đĩa thạch MH đã được quét dung dịch chủng vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922. Kết quả của thử nghiệm eCIM có ý nghĩa khi mCIM dương tính. Hiệu số đường kính vòng ức chế MEM giữa mCIM và eCIM \geq 5 mm, thử nghiệm phát hiện metallo β lactamase, vi khuẩn *E. coli* sản xuất metallo β carbapenemase có ion kẽm tại vùng hoạt động sẽ bị ức chế bởi EDTA, do đó đường kính vòng ức chế MEM trên eCIM mở rộng so với trên mCIM. Ngược lại, hiệu số đường kính vòng ức chế \leq 4mm, thử nghiệm phát hiện serine carbapenemase (Hình 1).



Hình 1. Hình minh họa chứng vi khuẩn *A. mCim* (+); *B. eCim* phát hiện metallo-β-lactamase; *B. eCim* phát hiện serine carbapenemase

2.2.6. Tiêu chuẩn đánh giá

E. coli ATCC 25922 sử dụng để kiểm tra chất lượng kháng sinh và là chủng chỉ định miễn cảm Meropenem. *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 làm chứng âm cho phương pháp mCIM, chủng *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 làm chứng âm cho phương pháp eCIM. *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2146 là chứng dương cho thử nghiệm mCIM và eCIM.

2.2.7. Phát hiện gen kháng metallo-β-lactamase bằng kỹ thuật Multiplex PCR

Kỹ thuật PCR dùng để phát hiện gen mã hóa enzyme metallo-β-lactamase 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 μl MyFi master mix 2X (Bioline, UK), 1 μl mỗi mỗi xuôi, ngược nồng độ 10μM, và 1 μl DNA vi khuẩn đã tách chiết, nước đủ 25 μl. Các cặp mồi dùng trong phản ứng PCR được liệt kê trong (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi mang gen mã hóa carbapenemase

Tên gen	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)	Tham khảo
NDM-1	NDMF	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	(Poirel et al., 2011)
	NDMR	CGGAATGGCTCATCACGATC		
IMP-1	IMPF	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	232	(Poirel et al., 2011)
	IMPR	GGTTTAATAAAACAACCACC		
VIM-1	VIMF	GATGGTGTGTTGGTCGCATA	390	(Poirel et al., 2011)
	VIMR	CGAATGCGCAGCACCAG		

Chu kỳ nhiệt phát hiện gen mã hóa enzyme metallo-β-lactamases : 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ ba giai đoạn 95°C trong 45 giây, 58°C trong 30 giây cho các gen (*bla_{NDM-1}*, *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}*), 72°C trong 1 phút 30 giây; cuối cùng là một chu kỳ 72°C trong 7 phút. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di sử dụng Agarose (Biorad) 1,7%. Thang đo 100bp (Invitrogen), chủng chứng âm *E. coli* ATCC 25922 và *Klebsiella pneumoniae* mang gen *bla_{NDM-1}*. Sản phẩm PCR khuếch đại dưới đèn UV bằng thiết bị Gel Doc™ XR+ Gel Docuencymtation System (Bio-Rad).

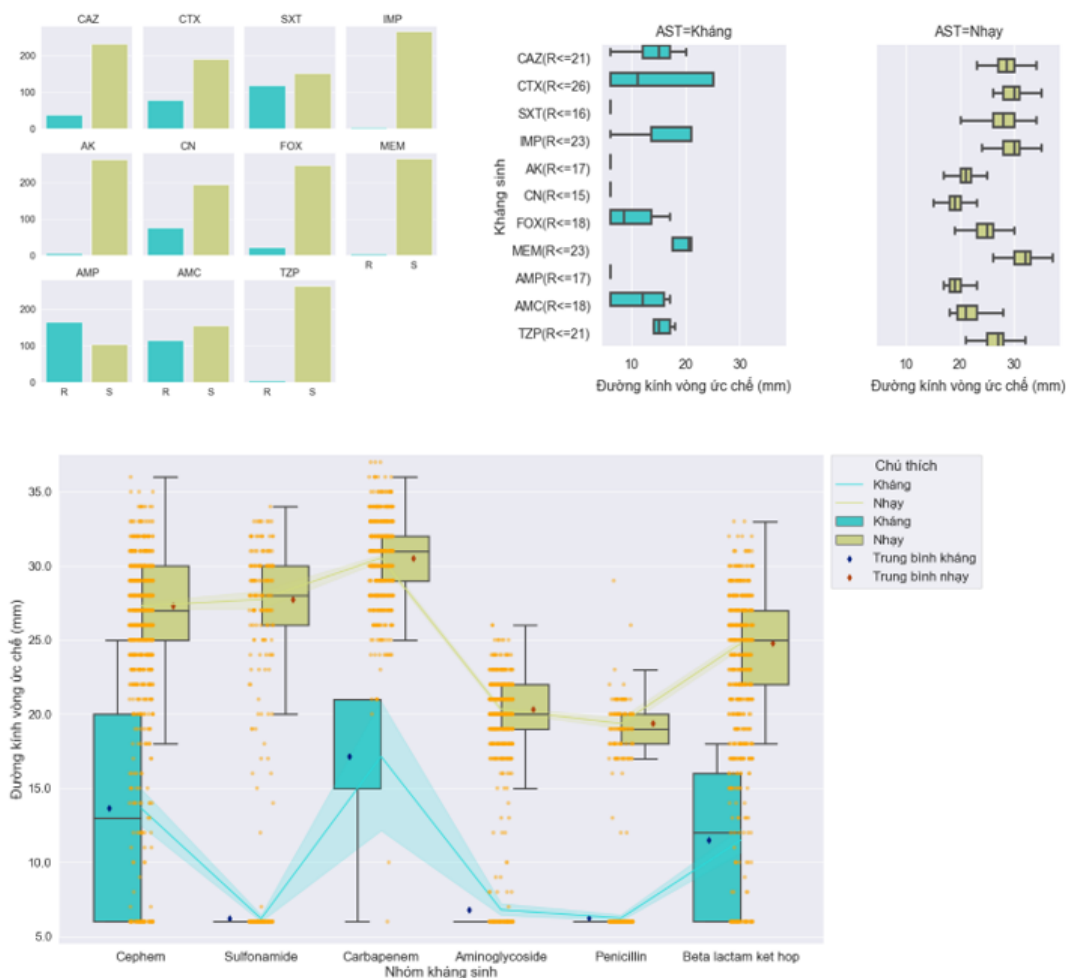
2.2.8. Thu thập và xử lý số liệu

Các kết quả số liệu nghiên cứu xử lý bằng phần mềm Python (phiên bản 3.9.2) và phân tích theo phương pháp thống kê mô tả.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát tình hình kháng kháng sinh của 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 được định danh bởi MALDI-TOF, chiếm tỉ lệ 86%. Kết quả kháng sinh đồ (n=269) bằng phương pháp khuếch tán đĩa Kirby-Bauer có 61% kháng với Ampicillin (165/269), tỉ lệ kháng cao với các kháng sinh: Trimethoprim-sulfamethoxazole (44%, 118/269), Amoxicillin-clavulanate (42%, 114/269), Cefotaxime (29%, 78/269), Gentamicin (28%, 75/269), Ceftazidime (14%, 37/269), tỉ lệ kháng với các kháng sinh còn lại: Cefoxitin (8%, 22/269), Amikacin (6/269), Piperacillin-tazobactam (5/269) chiếm 2%, Meropenem (4/269), và Imipenem (3/269) chiếm 1% (Hình 2).



Hình 2. Kết quả kháng sinh đồ của 269 chủng vi khuẩn E.coli với 11 loại kháng sinh, 6 nhóm kháng sinh

Đường kính vòng ức chế đối từng loại kháng sinh khi so sánh 2 nhóm kết quả kháng sinh đồ: kháng và nhạy cũng có sự khác biệt. Đối với nhóm *E. coli* kháng kháng sinh, đường kính ức chế của Trimethoprim-sulfamethoxazole, Amikacin, Gentamicin, Ampicillin gần như bằng 6mm, tức kháng hoàn toàn. Trong khi các kháng sinh Cefotaxime, Amoxicillin-clavulanate, Ceftazidime, và Cefoxitin, các đường kính còn dao động mạnh trong vùng bị ức chế (6-26 mm). Imipenem, Meropenem, và Piperacillin-tazobactam đang bước vào chu kỳ kháng, dự báo sẽ có sự dao động mạnh do các đường kính dao động gần vùng bị ức chế. Đối với nhóm *E. coli* nhạy cảm với kháng sinh, Ampicillin và Amoxicillin-clavulanate là hai kháng sinh có dấu hiệu bước vào ngưỡng kháng, các kháng sinh còn lại vẫn còn dao động trong ngưỡng an toàn.

Đường kính vòng ức chế đối từng nhóm kháng sinh khi so sánh 2 nhóm kết quả kháng sinh đồ: kháng và nhạy tương ứng với 6 nhóm kháng sinh lần lượt là Cephem (FOX, CAZ, CTX), Sulfonamide (SXT), Carbapenem (IMP, MEM), Aminoglycoside (CN, AK), Penicillin (AMP), và Beta lactam kết hợp (AMC, TZP). Với nhóm *E. coli* kháng, đường kính vòng ức chế dao động khoảng 6 mm đối với nhóm Sulfonamide, Aminoglycoside, và Penicillin với mean- M_k (điểm trung bình) kháng lần lượt là 6 mm, 7mm, và 6 mm.

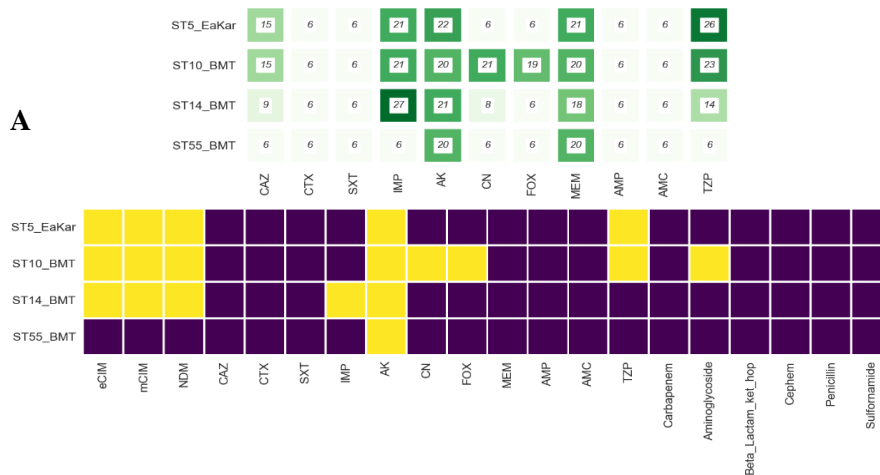
Nhóm Cephem và Beta lactam kết hợp dao động trong khoảng 6-17mm với M_k lần lượt 12 mm và 11 mm, trong khi Carbapenem là 15-23 mm ($M_k=14$ mm), mặc dù chỉ phát hiện 4 chủng *E. coli* kháng với Carbapenem. Với nhóm *E. coli* nhạy cảm, các đường kính dao động không quá rộng, trong đó Cephem với điểm trung bình nhạy ($M_s=27$ mm) và Beta lactam kết hợp ($M_s=25$ mm) dao động trong khoảng 5 mm, các nhóm kháng sinh còn lại (Sulfonamide, Carbapenem, Aminoglycoside, Penicillin) dao động trong khoảng 2-4 mm.

3.2. Khảo sát tình hình kháng kháng sinh và kiểu hình, kiểu gen của vi khuẩn *E.coli* sinh carbapenemase

Trong 269 chủng *E.coli* được phân lập từ 64 mẫu phết hậu môn trên chó, khảo sát đề kháng có 4 chủng kháng với Meropenem, 3 chủng kháng với Imipenem, trong đó có 3 chủng kháng cả Imipenem và Meropenem. Cả 4 chủng *E. coli* này đều có tỉ lệ kháng 100% với các kháng sinh như: Ceftazidime, Cefotaxime, Trimethoprim-sulfamethoxazole, Meropenem, Ampicillin, và Amoxicillin-clavulanate. Tuy nhiên, các chủng này vẫn còn mẫn cảm đối với các kháng sinh: Amikacin (4/4), Imipenem (1/4), Gentamicin (1/4), Cefoxitin (1/4). Kết quả kiểm tra trên kiểu hình từ mCIM và eCIM trên 4 chủng kháng Carbapenem, phát hiện 1 chủng *E. coli* (ST55_BMT) có mCIM(+) và eCIM (+). Tiến hành chạy PCR để xác định gen kháng metallo- β -lactamsae, phát hiện chủng này mang gen kháng NDM-1 (Hình 3).

Nghiên cứu đã phát hiện 1 chủng *E. coli* (ST55_BMT) mang gen kháng NDM-1 được mã hóa trên plasmid phân lập từ 64 mẫu phết hậu môn trên chó khỏe mạnh tại Đắc Lắc (1/269), có thể nói đây là phát hiện rất mới ở Việt Nam. Chủng (ST55_BMT) *E. coli* kháng hầu như toàn bộ các kháng sinh đã kiểm tra (10/11) ngoại trừ kháng sinh Amikacin, và đường kính vòng ức chế hầu hết bằng 6 mm, chứng tỏ chủng này đã vô hiệu hóa hoàn toàn các kháng sinh trên, và cực kỳ nguy hiểm nếu sự lây lan này xảy ra. Việc *E. coli* mang gen kháng metallo- β -lactamase (bla_{NDM-1}) là vấn đề nóng trong những năm gần đây vì mối nguy hiểm

với sức khỏe cộng đồng. Động vật nuôi hay chó là một trong những nguồn lây truyền gen kháng kháng sinh tiềm ẩn do việc tiếp xúc gần gũi với con người. Các gen kháng thuốc trên *E. coli* phân lập trên chó có khả năng lan truyền ngang sang các chủng vi khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*) hay *non-Enterobacteriaceae* thường trú trên người một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua nguồn thức ăn, nguồn nước, hoặc tiếp xúc (chăm sóc) (Schlundt et al., 2004); Newell et al., 2010).



Hình 3. Khảo sát kháng sinh đồ, kiểm tra kiểu hình bằng mCIM và eCIM, kiểu gen bằng PCR của 4 chủng *E. coli* kháng Carbapenem. Biểu đồ nhiệt (A) biểu thị đường kính vòng ức chế (từ nhỏ đến lớn: màu xanh đậm dần) và mô tả kết quả kháng sinh đồ tương ứng với từng loại kháng sinh (màu vàng: kháng; màu tím: nhạy; kết quả kiểm tra vi khuẩn sản xuất carbapenemase bằng mCIM và eCIM (màu vàng: mCIM(-); màu tím: mCIM(+)/eCIM(+)). (B) Hình gel: kết quả điện di mẫu ST55_BMT, từ trái sang phải: chủng *E. coli* mCIM(+) và eCIM(+); chủng control chủng *K.leb pneumo* mang gen NDM-1; M:thang đo 100 bp (chủ thích 1, 2, 3 thay vì từ trái sang phải)

Việc lan truyền gen kháng metallo-β-lactamase giữa các chủng *E. coli* trong môi hệ giữa người và động vật nuôi (trong đó có chó) đã được đề cập trong các bài báo (Grönthal et al., 2018). Tuy nhiên, về chủ thể lan truyền gen kháng là người hay chó vẫn còn là một dấu chấm hỏi. Trong nghiên cứu này, gen kháng kháng sinh NDM được phát hiện nhưng chưa thể kết luận được nguồn gốc hay chủ thể lây truyền, vì cần phải có những kỹ thuật phân tích cao hơn như pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) và sequencing. Tuy nhiên, có ý kiến cho rằng, khả năng cao các gen kháng NDM lan truyền từ người sang chó vì sự phổ biến của NDM trên người cao hơn trên động vật, vì vốn dĩ kháng sinh Carbapenem chỉ được phép sử dụng trên người trong các trường hợp nhiễm trùng do vi khuẩn đa kháng thuốc. Và về lịch sử hiện hành gen kháng kháng sinh, gen NDM đầu tiên được tìm thấy trên người tại Ấn Độ vào năm 2009, trong khi các NDM trên chó chỉ mới được phát hiện trong vòng năm

năm qua. Tại nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện 1 chủng *E. coli* mang gen NDM phân lập từ chó, cho thấy động vật là một trong những nguồn lây truyền gen kháng carbapenemase. Kết quả sẽ là một câu hỏi mở cho các nghiên cứu đi sâu vào nguồn gốc lan truyền gen kháng NDM tại Việt Nam, góp phần trong việc kiểm soát sự lây lan của chúng ra toàn cầu.

4. Kết luận

Nghiên cứu phát hiện *E. coli* mang gen NDM-1 trên chó là trường hợp đầu tiên công bố tại Việt Nam. Kết quả sẽ mang lại nhiều thông tin bổ ích cho các cơ sở thú y, trung tâm khuyến nông và mở ra nhiều động lực nghiên cứu về kháng kháng sinh trên động vật vì carbapenemase là vấn đề đang nóng và cần được khai thác nhiều trên thế giới, đặc biệt tại Việt Nam.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- Cui, L., Lei, L., Lv, Y., Zhang, R., Liu, X., Li, M., Zhang, F., & Wang, Y. (2018). blaNDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from a companion dog in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 24-27. doi: 10.1016/j.jgar.2017.10.021
- Elshamy, A. A., & Aboshanab, K. M. (2020). A review on bacterial resistance to carbapenems: Epidemiology, detection and treatment options. *Future Science OA*, 6(3). doi: 10.2144/fsoa-2019-0098
- Fiett, J., Baraniak, A., Izdebski, R., Sitkiewicz, I., Zabicka, D., Meler, A., Filczak, K., Hryniewicz, W., & Gniadkowski, M. (2014). The first NDM metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae isolate in Poland: Evolution of IncFII-type plasmids carrying the blaNDM-1 gene. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 58, Issue 2, pp. 1203-1207). doi: 10.1128/AAC.01197-13
- Grönthal, T., Österblad, M., Eklund, M., Jalava, J., Nykäsenoja, S., Pekkanen, K., & Rantala, M. (2018). Sharing more than friendship – transmission of NDM-5 ST167 and CTX-M-9 ST69 *Escherichia coli* between dogs and humans in a family, finland, 2015. *Eurosurveillance*, 23(27). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.27.1700497
- Hoang, C. Q., Nguyen, H. D., Vu, H. Q., Nguyen, A. T., Pham, B. T., Tran, T. L., Nguyen, H. T. H., Dao, Y. M., Nguyen, T. S. M., Nguyen, D. A., Tran, H. T. T., & Phan, L. T. (2019). Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) Production by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern Vietnam and Appropriate Methods of Detection: A Cross-Sectional Study. *BioMed Research International*, 2019. doi: 10.1155/2019/9757625
- Li, J., Bi, Z., Ma, S., Chen, B., Cai, C., He, J., Schwarz, S., Sun, C., Zhou, Y., Yin, J., Hulth, A., Wang, Y., Shen, Z., Wang, S., Wu, C., Nilsson, L. E., Walsh, T. R., Börjesson, S., Shen, J., ... & Wang, Y. (2019). Inter-host transmission of carbapenemase-producing *Escherichia coli* among humans and backyard animals. *Environmental Health Perspectives*, 127(10), 1-11. doi:

- 10.1289/EHP5251
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., der Giessen, J. van, & Kruse, H. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139(SUPPL. 1), S3-S15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021
- Peterhans, S., Stevens, M. J. A., Nüesch-Inderbilen, M., Schmitt, S., Stephan, R., & Zurfluh, K. (2018). First report of a blaNDM-5-harboursing Escherichia coli ST167 isolated from a wound infection in a dog in Switzerland. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15, 226–227. doi: 10.1016/j.jgar.2018.10.013
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119-123. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
- Ramadan, H., Gupta, S. K., Sharma, P., Ahmed, M., Hiott, L. M., Barrett, J. B., Woodley, T. A., Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2020). Circulation of emerging NDM-5-producing Escherichia coli among humans and dogs in Egypt. *Zoonoses and Public Health*, 67(3), 324-329. doi: 10.1111/zph.12676
- Schlundt, J., Toyofuku, H., Jansen, J., & Herbst, S. A. (2004). Emerging food-borne zoonoses. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 23(2), 513-533. doi: 10.20506/rst.23.2.1506
- Shaheen, B. W., Nayak, R., & Boothe, D. M. (2013). Emergence of a New Delhi metallo-β-Lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical Escherichia coli isolates recovered from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2902–2903. doi: 10.1128/AAC.02028-12
- States, U. (2019). *crossm Complete Genome Sequence of a Carbapenem-Resistant Escherichia coli Isolate with bla NDM-5 from a Dog in the. July, 22-23.*
- Statista Research Department (2020). Pet types owned among urban citizens in Vietnam in 2019. Retrieved from <https://www.statista.com/statistics/1114699/vietnam-pet-ownership-among-urban-citizens/>
- Tamta, S., Vinodh, V. K., Pruthvishree, B. S., Karthikeyan, R., Rupner, R. N., Chethan, G. E., Dubal, Z. B., Sinha, D. K., & Singh, B. R. (2020). Faecal carriage of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and New Delhi metallo beta-lactamase(NDM) producing Escherichia coli between piglets and pig farmworkers. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 73(November 2019), 101564. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101564
- Temkin, & Elizabeth (2014). *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae biology, epidemiology, and management.pdf.*
- Viet Nam Department of Animal (2016). National Program for Rabies Control and Elimination, 2017-2021. Retrieved from Viet Nam Department of Animal (2016). National Program for Rabies Control and Elimination, 2017-2021.
- World Health Organization (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed Retrieved from <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM metallo-β-lactamases and their bacterial producers in health care settings. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2). doi: 10.1128/CMR.00115-18

- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 53, Issue 12, pp. 5046-5054). doi: 10.1128/AAC.00774-09
- Yousfi, M., Mairi, A., Bakour, S., Touati, A., Hassissen, L., Hadjadj, L., & Rolain, J. M. (2015). First report of NDM-5-producing Escherichia coli ST1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria. *New Microbes and New Infections*, 8, 17-18. doi: 10.1016/j.nmni.2015.09.002
- Zhai, R., Fu, B., Shi, X., Sun, C., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Walsh, T. R., Cai, C., Wang, Y., & Wu, C. (2020). Contaminated in-house environment contributes to the persistence and transmission of NDM-producing bacteria in a Chinese poultry farm. *Environment International*, 139(March). doi: 10.1016/j.envint.2020.105715

**CARRIGAE OF NEW DELHI METALLO- β -LACTAMASE (Bla_{NDM-1}) PRODUCING-
ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM HEALTHY DOGS IN KENNELS,
DAK LAK PROVINCE**

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

¹Oxford University Clinical Research Unit (OUCRU-HCMC), Vietnam

²Regional Animal Health Office No. 5, Vietnam

³University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

*Corresponding author: Phan Thi Phuong Trang – Email: ptptrang@hcmus.edu.vn

Received: March 23, 2020; Revised: April 22, 2021; Accepted: June 09, 2021

ABSTRACT

Carbapenem antibiotic, which was presented during 1980s, have acted as the last line of defense against multidrug-resistant Gram-negative organisms. The occurrence of *E. coli* carrying the new carbapenemase: New Delhi metallo- β -lactamase (bla_{NDM-1}) in human has been known for many years. However, limited studies have been conducted on animal in Viet Nam. This study aimed to investigate the antimicrobial susceptibility testing of *E. coli* and evaluate the phenotype and genotype of carbapenem-resistance *E. coli*. About 269 *E. coli* isolates were isolated from sixty-four rectal swabs in dogs to check the antimicrobial susceptibility testing (AST) for different 11 types of antimicrobials. In this study, we combined modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-modified carbapenem inactivation method EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase producing *E. coli* and Polymerase Chain reaction method (PCR) for detecting and distinguishing three main types of the metallo- β -lactamases genes (NDM, VIM, IMP). The result of antimicrobial susceptibility testing by Kirby-Bauer method showed that 4/269 isolates had resistance to Carbapenem, 1/4 isolate was detected with metallo- β -lactamase by mCIM and eCIM and confirmed with NDM-1 gene by PCR. These findings provide up-to-date information on the first detection of *E. coli* carrying resistance genes (bla_{NDM-1}) in healthy dogs in Vietnam.

Keywords: dogs; Đak Lak; *Escherichia coli*; NDM-1