

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

=====

NGUYỄN THỊ TUYẾT MAI

**ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ**

**CỦA *Escherichia coli* MANG GEN *mcr-1***

**KHÁNG COLISTIN PHÂN LẬP TỪ NGƯỜI VÀ VẬT NUÔI,**

**THỰC PHẨM VÀ NƯỚC TẠI XÃ THANH HÀ, HÀ NAM,**

**NĂM 2015**

**Chuyên ngành: Vi sinh y học**

**Mã số: 62 72 01 15**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2022**

**CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH  
TẠI VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

**Người hướng dẫn khoa học:**

1. TS. Trần Huy Hoàng
2. PGS. TS. Vũ Thị Tường Vân

- Phản biện 1:     ***PGS.TS. Đinh Đoàn Long***  
                          – Trường Đại học Y Dược – Đại học Quốc gia  
                          Hà Nội
- Phản biện 2:     ***PGS.TS. Lê Thu Hồng***  
                          – Học viện Quân y
- Phản biện 3:     ***TS. Hoàng Thị Bích Ngọc***  
                          – Bệnh viện Nhi Trung ương

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện  
học tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Vào hồi.. ...giờ ....., ngày .....tháng .....năm 2022.

*Có thể tìm hiểu luận án tại:*

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

## **DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Nguyễn Thị Tuyết Mai**, Phạm Duy Thái, Trần Thị Vân Phương, Nguyễn Hiệp Lê Yên, Vũ Thị Tường Vân, Đặng Đức Anh, Trần Như Dương, Nguyễn Thị Lan Phương, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Huy Hoàng (2017), “Mối liên hệ kiểu gen của các chủng *Escherichia coli* mang gen kháng colistin (mediate colistin resistant – *mcr-1*) phân lập tại hà nội và hà nam năm 2015-2016. *Tạp chí y học Dự phòng*, tập 27(9):tr57-64.
2. **Nguyễn Thị Tuyết Mai**, Phạm Duy Thái, Trần Vân Phương, Nguyễn Hiệp Lê Yên, Vũ Thị Tường Vân, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Huy Hoàng (2017)”, “Ứng dụng kỹ thuật pcr phát hiện gen *mcr-1* kháng colistin trên các chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu phân động vật thu thập tại hà nam năm 2016”. *Tạp chí y học Việt Nam*. 456 (2):tr90-94.
3. Bích Vu Thị Ngọc, Thanh Le Viet, **Mai Nguyen Thi Tuyen**, Thuong Nguyen Thi Hong, Diep Nguyen Thi Ngoc, Duyet Le Van, Loan Chu Thi, Hoang Tran Huy, John Penders, Heiman Wertheim, H. Rogier van Doorn: (2022) “Characterization of Genetic Elements Carrying *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* from the Community and Hospital Settings in Vietnam” *Microbiology spectrum*, 10(1):1356-21.
4. **Nguyễn Thị Tuyết Mai**, Vũ Thị Ngọc Bích, Phạm Duy Thái, Hoàng Thị An Hà, Hoàng Thị Mai Hương, Trần Huy Hoàng, Vũ Thị Tường Vân (2022): “Một số đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ người, động vật, thức ăn và môi trường tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam năm 2015”. *Tạp chí y học Việt Nam*. 32 (3): tr125-35.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng kháng sinh không hợp lý trong bệnh viện, trong chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản dẫn tới tình trạng kháng kháng sinh (KKS) của vi khuẩn gia tăng không ngừng và ngày càng trầm trọng. Sự có mặt của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* gây bệnh ở người, động vật đã và đang là một cảnh báo lớn đối với sức khỏe cộng đồng. Đặc biệt, khi các chủng vi khuẩn gây bệnh này kháng cùng lúc với carbapenem và colistin thì việc điều trị các bệnh nhiễm trùng do các vi khuẩn gram âm mang gen *mcr-1* trở thành một thách thức vô cùng lớn. Thức ăn bị ô nhiễm bởi các chủng vi khuẩn mang gen *mcr-1*, sự phát tán các chủng này thông qua chuỗi thức ăn (thịt động vật, rau, nước) là những nguy cơ làm xuất hiện và gia tăng tỉ lệ các chủng vi khuẩn gram âm đường ruột mang gen *mcr-1* kháng colistin ở người và động vật nuôi. Tuy nhiên, hiện nay, tại khu vực miền Bắc Việt Nam chưa có nghiên cứu đầy đủ nào về vấn đề này trong toàn bộ cộng đồng bao gồm người, động vật nuôi, môi trường tự nhiên xung quanh (thức ăn và nước)-nơi có thể lan truyền vi khuẩn mang các gen kháng do bị ô nhiễm từ các nguồn trong cộng đồng. Vì vậy, đánh giá tình trạng mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* nằm trên đường tiêu hóa của người, nằm ở các “ổ chứa” của động vật nuôi, của môi trường (thức ăn, nước), đánh giá cách thức lan truyền gen này bằng cách xác định các đặc điểm sinh học phân tử của chúng là vấn đề cần thiết để kiểm soát đồng bộ các nguy cơ phát triển và gia tăng khả năng kháng colistin. Những bằng chứng khoa học này sẽ giúp xác định một số các yếu tố nguy cơ có thể tạo ra các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh đặc biệt nguy hiểm tại Việt Nam, là cơ sở khoa học để đề ra biện pháp ngăn chặn và giảm thiểu sự gia tăng các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh colistin. Xuất phát từ tình hình thực tế cấp thiết đó, chúng tôi tiến hành đề tài:

“Đặc điểm sinh học phân tử của *Escherichia coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập từ người và vật nuôi, thực phẩm và nước tại xã Thanh Hà, Hà Nam, năm 2015” với 2 mục tiêu:

1. *Xác định tỷ lệ chủng E. coli mang gen mcr-1 kháng colistin phân lập được từ phân người và vật nuôi, thực phẩm, nước tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, Hà Nam, năm 2015.*
2. *Xác định một số đặc điểm sinh học phân tử chủng E. coli mang gen mcr-1 đã phân lập được*

## ĐIỂM MỚI VỀ KHOA HỌC VÀ GIÁ TRỊ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

Nghiên cứu đã xác định được các ST của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* đang lưu hành trong cộng đồng (56 loại ST khác nhau, 3 loại ST thường gặp là ST10, ST48 và ST206)

Nghiên cứu đã xác định được các đơn vị sao chép plasmid của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin đang lưu hành trong cộng đồng: Có 7 loại đơn vị sao chép đơn mang gen *mcr-1* bao gồm là IncI2, IncP, InX4, IncFIA, IncHI1B, IncN và IncX1. Có 20 loại plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2, được tìm thấy ở các chủng *E. coli* ở người, động vật và nước. Sự kết hợp hay gặp nhất là giữa IncHI2 với các đơn vị sao chép khác và IncH với IncF. Từ đó làm sáng tỏ cơ chế lây lan của các chủng này trong cộng đồng chủ yếu thông qua các plasmid này.

Nghiên cứu đã xác định được cấu trúc của một số đơn vị sao chép plasmid phổ biến và các transposon mang gen *mcr-1* của chủng *E. coli* lưu hành trong cộng đồng, từ đó cung cấp thêm những hiểu biết về mặt gen học của các chủng này.

Kết quả của luận án này đã cung cấp các bằng chứng khoa học về việc lan truyền gen *mcr-1* kháng colistin ở các chủng *E. coli* trong cộng đồng. Bằng chứng khoa học này sẽ giúp đưa ra các biện pháp ngăn chặn đường lan truyền gen KKS một cách hiệu quả trong chương trình giám sát KKS.

### CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án được trình bày trên 118 trang, không kể các phần hành chính, danh mục bài báo đã xuất bản, tài liệu tham khảo và các phụ lục.

Cấu trúc chính của luận án gồm: Phần đặt vấn đề 3 trang (bao gồm cả mục tiêu); Phần tổng quan tài liệu 35 trang; Phần đối tượng và phương pháp nghiên cứu 23 trang; Phần kết quả nghiên cứu 27 trang; Phần bàn luận 23 trang; Phần kết luận 2 trang; Đóng góp mới của luận án 1 trang; Phần kiến nghị 1 trang.

Luận án gồm 18 bảng, 4 biểu đồ, 18 hình.

Luận án bao gồm 126 tài liệu tham khảo và 42 trang phụ lục

## CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Sự đề kháng kháng sinh

Kháng sinh có tác dụng ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn, nhưng khi trong môi trường có kháng sinh mà vi khuẩn vẫn phát triển thì được coi là sự đề kháng kháng sinh.

#### 1.1.1. Đột biến kháng thuốc

Khi đột biến xảy ra, kháng sinh đã loại bỏ hết quần thể nhạy cảm và chỉ còn các vi khuẩn kháng kháng sinh chiếm ưu thế. Các đột biến kháng thuốc thông qua các cơ chế sau: Làm thay đổi đích tác động; Thay đổi các con đường chuyển hóa thông qua sự thay đổi mạng lưới điều hòa; Làm giảm tính thấm của màng nguyên sinh chất, giảm sự hấp thu thuốc; Cơ chế bơm đẩy (efflux pump)

#### 1.1.2. Lây truyền ngang từ gen chuyển (Horizontal Gene Transfer-HGT)

Tiếp hợp thường sử dụng các yếu tố di truyền động (mobile genetic elements- MGEs) là phương tiện để chia sẻ các thông tin di truyền có giá trị trong đó có yếu tố kháng kháng sinh. MGEs quan trọng nhất là *plasmid* và *transposon*-có vai trò quan trọng trong việc phát triển và lây lan các vi khuẩn kháng kháng sinh trên lâm sàng.

*Plasmid*: Plasmid là các phân tử ADN vòng nằm ngoài nhiễm sắc thể và có khả năng tự nhân lên. Một số plasmid có vai trò quan trọng trong vi sinh y học là plasmid mang gen đề kháng kháng sinh và kim loại nặng (R-plasmid), plasmid sinh độc tố, plasmid chứa yếu tố độc lực (khả năng bám dính và xâm nhập vào tế bào). Các gen trên plasmid cũng có thể được truyền dọc qua các thế hệ hoặc lây truyền ngang sang vi khuẩn khác thông qua biến nạp, tiếp hợp và tải nạp. Đây cũng là một các thức chủ yếu làm gia tăng sự lan truyền gen KKS một cách nhanh chóng ở cùng loài và khác loài vi khuẩn. *Transposon*: Transposon là những đoạn ADN chứa một hay nhiều gen, có hai đầu tận cùng là những chuỗi nucleotid lặp lại ngược chiều nhau (IR: inverted repeats) có thể chuyển vị trí từ phân tử ADN này sang phân tử ADN khác như từ plasmid vào nhiễm sắc thể hoặc ngược lại hoặc từ plasmid này sang plasmid khác.

#### 1.1.3.5. Các gen kháng kháng sinh.

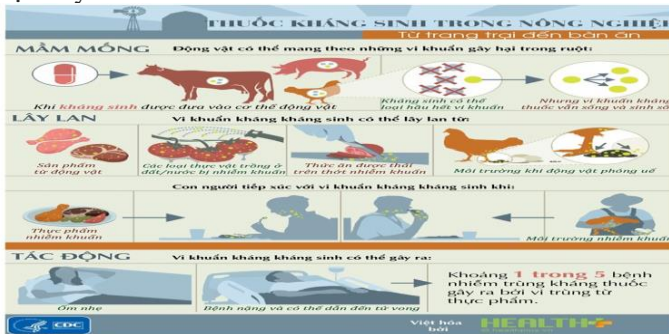
Một số các gen kháng kháng sinh của các nhóm kháng sinh khác nhau

**Bảng 1.1 Bảng tổng hợp gen KKS của các nhóm KS thường gặp**

Nhóm kháng sinh	Các gen kháng quan trọng
<b><i>β</i>-lactam</b>	<i>AmpC</i> β-lactamase <i>ESBL</i> : <i>bla</i> <sub>TEM</sub> -, <i>bla</i> <sub>SHV</sub> -, <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> - Carbapenemase: Nhóm A (KPC, SME, IMI, NMC, GES); Nhóm B (NDM, IMP, VIM, SPM, GIM), nhóm D (OXA-).
<b>Aminoglycosid</b>	Gen methylase: <i>armA</i> , <i>npmA</i> , <i>rmtA</i> , <i>rmtB</i> , <i>rmtC</i> , and <i>rmtD</i> Gen tạo các enzyme biến đổi: AAC (acetyltransferase), ANT (nucleotidyltransferase hoặc adenylyltransferase), APH (phosphotransferase)
<b>Chloramphenicol</b>	CAT: <i>catA</i> và <i>catB</i> . <i>cmlA</i> và <i>floR</i>
<b>Glycopeptid</b>	<i>vanA</i> và <i>vanB</i> : nằm trên plasmid và hoặc NST <i>vanC1</i> , <i>vanC2/3</i> , <i>vanD</i> , <i>vanE</i> , và <i>vanG</i> : chỉ nằm trên NST
<b>Quinolon</b>	<i>GyrA</i> và <i>GyrB</i> : trực khuẩn gram âm; <i>parC</i> và <i>parE</i> : vi khuẩn gram dương đều nằm trên NST <i>qnr</i> ( <i>qnr A,B,C,D,S</i> ), <i>aac(6)-Ib</i> , <i>qepA</i> : nằm trên plasmid
<b>Sulfonamid và trimethoprim</b>	Kháng sulfonamid: <i>folP</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> và <i>sul3</i> Kháng trimethoprim: <i>folA</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrB</i> , <i>dfrK</i>
<b>Polymycin</b>	<i>lpxA</i> , <i>lpxC</i> or <i>lpxD</i> <i>mcr-1</i> đến <i>mcr-10</i>

## 1.2. Sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi

Tình trạng lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi tại Việt Nam cũng rất phổ biến, khi chăn nuôi, người dân thường cho lợn, gà ăn cám trộn kháng sinh để phòng bệnh nhưng không có sự kiểm soát về liều lượng. Lây truyền KKS qua chuỗi thức ăn là một trong các vấn đề cần giải quyết hiện nay



**Hình 1.4: Lây truyền kháng kháng sinh qua chuỗi thức ăn**

(nguồn: <http://healthplus.vn>)

### **1.3. Colistin**

#### **1.3.1. Cơ chế tác dụng**

Màng tế bào vi khuẩn là vị trí tác dụng ban đầu của colistin. Bằng cách liên kết với lipopolysaccharides (LPS) và phospholipids ở màng ngoài tế bào vi khuẩn gram âm, colistin có thể diệt khuẩn với nhiều cơ chế hoạt động khác nhau.  $Ca^{2+}$  và  $Mg^{2+}$  là hai ion có tác dụng ổn định phân tử LPS. Colistin lại là một phân tử cationic, do vậy bằng cách cạnh tranh thế chỗ các cation này từ những nhóm phosphate của màng lipid dẫn đến sự gián đoạn màng ngoài tế bào, rò rỉ các chất bên trong, gây chết vi khuẩn. Bên cạnh đó, thuốc cũng liên kết với lipid A - một phần của nội độc tố hoặc phân tử LPS, và trong nhiều nghiên cứu tiến hành trên động vật, thuốc đã ngăn chặn được tác dụng và độc tính của vi khuẩn.

#### **1.3.2. Sự đề kháng với colistin**

Đầu tháng 2/2015, một nhóm khoa học người Trung Quốc, Liu and cộng sự trong quá trình giám sát hàng ngày sự kháng kháng sinh đã công bố tìm thấy gen *mcr-1* kháng colistin ở vi khuẩn *E. coli* lây truyền qua plasmid. Tiếp theo phát hiện đầu tiên của Liu và cộng sự, cho đến nay có ít nhất trên 30 nước trên thế giới, ở tất cả các châu lục, có các nghiên cứu phát hiện ra chủng vi khuẩn mang gen *mcr-1*. Tại Việt Nam, Surbhi Malhotra-Kumar và cộng sự thực hiện sàng lọc phát hiện gen *mcr-1* bằng phương pháp PCR và giải trình tự Sanger trên 24 chủng *E. coli* sinh ESBL trong năm 2014-2015 được phân lập từ mẫu phết trực tràng của gà và lợn tại 2 trang trại ở Văn Lâm, Hưng Yên và Hoài Đức, Hà Nội. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào đi sâu về các đặc tính sinh học phân tử để đưa ra các cơ sở khoa học về cơ chế lây truyền của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin từ các nguồn khác nhau tại Việt Nam.

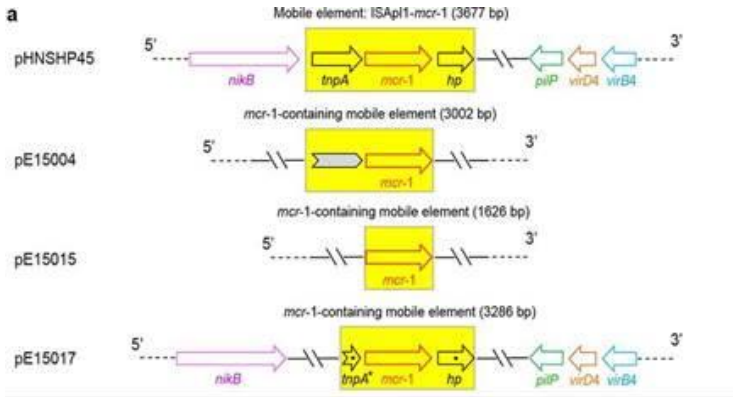
### **1.3.3. Một số đặc điểm về gen *mcr-1* và plasmid của các chủng *E. coli* kháng colistin**

#### **1.3.3.1 Một số đặc điểm về gen *mcr-1***

##### **Cấu trúc plasmid mang gen *mcr-1***

Trong nghiên cứu của Liu và cộng sự, bằng phương pháp giải trình tự gen đã phân tích được cấu trúc của 4 plasmid mang gen *mcr-1* từ 04 chủng *E. coli* phân lập được kháng colistin (hình 1.7)





**Hình 1.7: Cấu trúc của 04 plasmid mang gen *mcr-1* bằng giải trình tự của các chủng *E. coli* phân lập được:**

pHNSHP45: plasmid từ chủng *E. coli* của phân lợn; 03 plasmid khác (pE15004, pE15015 và pE15017) được phân lập từ ba chủng *E. coli* lâm sàng (E15004, E15015 và E15017).

Nghiên cứu về plasmid typing mang *mcr-1* cho thấy các tít plasmid phổ biến hiện nay là: IncHI2, IncI2 và IncP.

#### **1.4. Các kĩ thuật sinh học phân tử sử dụng trong phát hiện các gen kháng kháng sinh**

##### **1.4.1. Phân tích các plasmid**

Đây cũng là cơ chế kháng kháng sinh quan trọng nhất do phần lớn các gen kháng kháng sinh của vi khuẩn đều nằm trên các plasmid và có thể lây truyền trong phạm vi loài các loài vi khuẩn khác thông qua hình thức tiếp hợp.

##### **1.4.2. Nghiên cứu khả năng truyền plasmid kháng kháng sinh**

Thông qua hình thức tiếp hợp các plasmid sẽ được chuyển từ tế bào cho sang tế bào nhận qua ống pili thông qua hình thức bơm đẩy. Ở Việt Nam kỹ thuật này cũng được sử dụng để phân tích đặc tính của các vi khuẩn mang plasmid kháng kháng sinh.

##### **1.4.3. Kỹ thuật PCR phát hiện gen kháng kháng sinh**

Nguyên lý: Tổng hợp ADN trong tế bào được nhân lên theo cơ chế bán bảo tồn. Với một cặp mồi đặc hiệu, một đoạn ADN nào đó sẽ được

tổng hợp sau mỗi chu kỳ nhiệt của PCR. Đoạn gen đặc hiệu sẽ được phát hiện trên thạch điện di.

#### **1.4.4. Kỹ thuật điện di xung trường (PFGE)**

Nguyên lý: Kỹ thuật này được sử dụng những enzym phù hợp để cắt ADN thành các phân đoạn khác nhau, các phân đoạn này được điện di để phân tách các đoạn từ 1-1000kb. Kỹ thuật này cho phép xác định mối liên quan và nguồn gốc của các chủng vi khuẩn ở các vùng và thời gian khác nhau dựa trên sự so sánh các đoạn ADN của các chủng vi khuẩn.

#### **1.4.5. Kỹ thuật giải trình tự gen**

Đây là một phương pháp chính xác nhất để xác định các đặc tính kháng kháng sinh của vi khuẩn. Các phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới lần đầu ra đời vào năm 2005 đã khắc phục những hạn chế của phương pháp giải trình tự truyền thống trước đó. Mặc dù phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sẽ chỉ tạo ra các đoạn trình tự (read) ngắn hơn và có độ chính xác thấp hơn so với các đoạn ADN được giải trình tự bằng phương pháp Sanger nhưng bù lại với số lượng read rất lớn bao phủ khắp vùng ADN cần giải trình tự sẽ được ráp lại để có trình tự ADN cuối cùng với độ chính xác cao hay còn gọi là giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequence - WGS). Độ chính xác của kỹ thuật WGS phụ thuộc rất nhiều vào bước phân tích dữ liệu thu được từ quá trình giải trình tự. Độ tin cậy của dữ liệu thường được căn cứ vào coverage. Coverage được sử dụng cho mục đích so sánh các hệ gen để tìm sự khác biệt ở từng nucleotide là 20X.

### **1.5. Các vấn đề cần giải quyết trong nghiên cứu**

- Tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng (môi trường nước, thức ăn) như thế nào?
- Liệu các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin có tồn tại trong hệ tiêu hóa của những người lành có tiếp xúc với môi trường và thức ăn bị ô nhiễm với các chủng vi khuẩn này không?
- Mức độ đề kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin như thế nào?

- Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin có đặc điểm sinh học phân tử như thế nào? Cơ chế lan truyền của các chủng này như thế nào?

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Địa điểm nghiên cứu:

- Địa điểm thu thập mẫu: xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam bao gồm bảy thôn: An Hòa, Dương Xá, Quang Trung, Ứng Liêm, Hòa Ngãi, Mậu Chủ, Thạch Tổ. Địa điểm thực hiện các xét nghiệm phân tích vi sinh: Phòng thí nghiệm Kháng sinh-Khoa Vi khuẩn-Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

- Địa điểm thực hiện xét nghiệm giải trình tự toàn bộ bộ gen của vi khuẩn (WGS): Phòng thí nghiệm Kháng sinh-Khoa Vi khuẩn-Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

#### 2.2. Thiết kế nghiên cứu:

Sử dụng thiết kế mô tả cắt ngang cho toàn bộ nghiên cứu

#### 2.3. Thời gian nghiên cứu: năm 2015

Toàn bộ các mẫu sử dụng cho nghiên cứu được thu thập trong nghiên cứu VN V1.1 Hà Nam “*Xác định tình trạng kháng kháng sinh của hệ vi khuẩn chí trên người tình nguyện khoẻ mạnh ở Việt Nam và các tác động của việc sử dụng kháng sinh trong cộng đồng*” tại thời điểm năm 2015. Tất cả các mẫu sau khi thu nhận lưu giữ trong tủ -70°C tại phòng thí nghiệm kháng kháng sinh, khoa vi khuẩn, viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

#### 2.4. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu 1 là toàn bộ các chủng *E. coli* được phân lập từ các mẫu nghiên cứu cấy trên môi trường chọn lọc MAC có colistin 0.5µg/ml . Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu 2 là các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được ở mục tiêu 1.

#### 2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu

##### Cỡ mẫu cho mục tiêu 1

Áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho nghiên cứu ước tính một tỷ lệ:

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \times \frac{p \times (1-p)}{d^2} \quad (1)$$

Trong đó: n: số chủng cần nghiên cứu; p: Tỷ lệ dự đoán;  $Z_{1-\alpha/2}$ : Hệ số tin cậy, với độ tin cậy là 95% ( $Z_{(1-\alpha/2)} = 1,96$ ); d: độ chính xác tuyệt đối ( $d=0.05$ )

- Với tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin trong phân người theo các nghiên cứu trước đã báo cáo là 17,6%, nên số mẫu phân người cho việc xác định tỷ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* là 222 ( $n= 222$ ).

- Với tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin trong phân động vật theo các nghiên cứu trước đã báo cáo là 7,9%, nên số mẫu phân động vật cho việc xác định tỷ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* là 112 ( $n= 112$ ).

- Với tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin trong thực phẩm theo các nghiên cứu trước đã báo cáo là 15%, nên số mẫu thực phẩm cho việc xác định tỷ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* là 189 ( $n=189$ )

- Với tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin trong nước theo báo cáo của nghiên cứu trước là 10%, nên số mẫu nước cho việc xác định tỷ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* là 138 ( $n=138$ )

Từ công thức tính cỡ mẫu trên, nghiên cứu đã tiến hành lựa chọn mẫu như sau: Mẫu của nghiên cứu được lựa chọn từ các mẫu phân của người, động vật nuôi trong nhà, thức ăn và nước (nước mưa, nước giếng, nước tưới) của 80 hộ gia đình tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam. Chúng tôi thu thập được số lượng mẫu như sau (Bảng 2.1)

**Bảng 2.1: Số lượng mẫu các chủng loại mẫu trong nghiên cứu**

Loại mẫu	Số lượng
Mẫu phân người	265
Mẫu phân động vật nuôi	122
Mẫu thức ăn	179
Mẫu nước	159

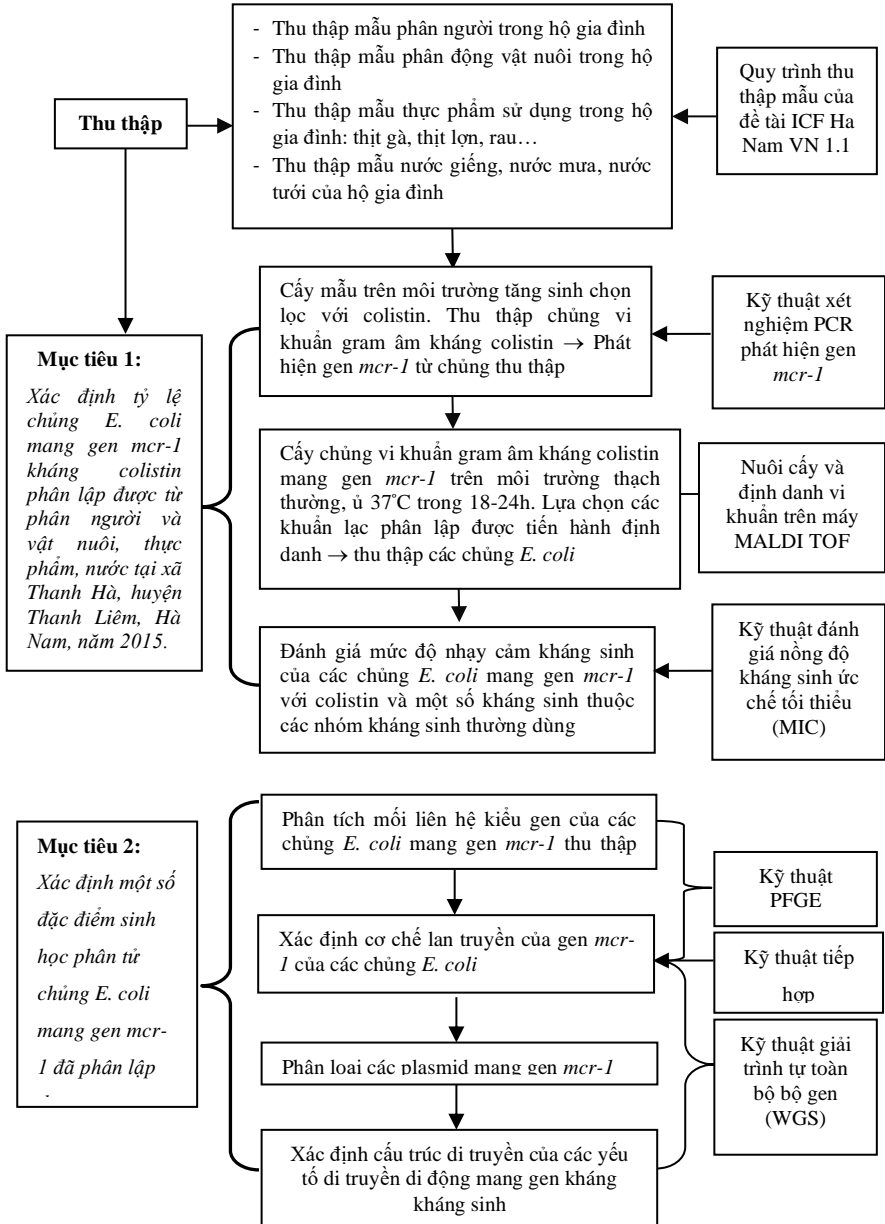
### **Cỡ mẫu cho mục tiêu 2:**

Kỹ thuật PFGE: Toàn bộ các chủng *E. coli* kháng colistin mang gen *mcr-1* đã được lựa chọn để đánh giá tính nhạy cảm kháng sinh bằng kỹ thuật định lượng kháng độ kháng sinh ức chế tối thiểu (MIC)

Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen (WGS): Lựa chọn các chủng đại diện và có chủ đích từ nhóm chủng đã làm PFGE: của các nhóm gen tương đồng > 90% từ kết quả PFGE thu được sẽ được lấy đại diện. Nếu không có các nhóm tương đồng >90% từ PFGE sẽ sử dụng toàn bộ. Số

lượng các chủng *E. coli* đã phân lập để giải trình tự là: 98 chủng trong đó có 87 chủng mang gen *mcr-1*.

### - Sơ đồ tóm tắt các bước nghiên cứu



## 2.6. Xử lý và phân tích số liệu

- Quản lý số liệu bằng phần mềm excel
- Phân tích đặc tính SHPT: Sử dụng phần mềm FinchTIVI, DNA-blast, Bio-numeric-6.5, Inter plasmid Analyzing tool
- Kết quả được trình bày dưới dạng bảng, đồ thị, biểu đồ

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập được trong nghiên cứu

**Bảng 3.2:** Tỷ lệ mẫu có chứa chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được từ phân người, phân động vật, thực phẩm và nước

Loại mẫu	Tổng số mẫu	Số mẫu có chủng <i>Enterobacteriaceae</i> mọc trên môi trường MAC + 0.5 $\mu\text{g/ml}$ colistin	Tỷ lệ mẫu có <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i>	
			Số lượng	Tỷ lệ (%)
Phân người (PN)	265	221(83,3%)	97	36,6
Phân động vật nuôi (PĐVN)	122	97 (79,5%)	42	34,4
Thức ăn (TĂ)	159	72 (72,5%)	6	3,8
Nước (N)	179	156 (87,1%)	15	8,4
Tổng số	725	546 (75,3%)	160	22,1

Trong tổng số 725 mẫu phân người, phân động vật, thức ăn, nước được cấy trên môi trường thạch MacConkey có chứa 0,5  $\mu\text{g/ml}$  colistin có 546 mẫu có mọc các khuẩn lạc màu hồng (khuẩn lạc *Enterobacteriaceae*) (75,3%).

Tất cả các loại mẫu: phân người, phân động vật, thức ăn, nước đều phát hiện có các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*. Tỷ lệ mẫu được xác định có chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bao gồm: phân người 36,6%; phân động vật 34,4%; thức ăn 3,8%; nước 8,4%.

### 3.1.4. Mức độ nhạy cảm colistin của các chủng *E. coli* mang gen kháng *mcr-1*

**Bảng 3.3. Kết quả thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu colistin của các chủng *E. coli* mang gen kháng *mcr-1* được phân lập**

Loại mẫu	Tổng số chủng(n)	MIC Colistin ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		$\leq 2$	4	8	$\geq 16$
PN	236	137(58,1%)	87 (36,9%)	7 (2,97%)	5(2,12%)
PĐVN	99	71(71,7%)	23 (23,2%)	1 (1,01%)	4 (4,04%)
TĂ	16	6 (37,6%)	3 (18,6%)	2(12,5%)	5 (31,3%)
N	47	24 (51,1%)	15 (31,9%)	1 (2,13%)	7(14,9%)
<b>Tổng số</b>	398	238 (59,8%)	128(32,2%)	11 (2,8%)	21 (5,2%)

\**Ghi chú:* PN: phân người; PĐVN: phân động vật nuôi; TĂ: thức ăn; N: nước

Khi đánh giá mức độ nhạy cảm với colistin của 398 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* thông qua thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu bằng kỹ thuật vi pha loãng, kết quả nghiên cứu cho thấy: số chủng có biểu hiện kiểu gen mà không có biểu hiện kiểu hình chiếm tỷ lệ cao ở tất cả các loại mẫu: mẫu phân động vật nuôi là 71,7%, phân người là 58,1%). Trong số 160 chủng mang gen *mcr-1* có biểu hiện kiểu hình kháng colistin, đa số có MIC colistin là 4  $\mu\text{g/ml}$  -128/160 chủng (chiếm 80% số chủng kháng colistin). Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có biểu hiện kiểu hình kháng colistin được tìm thấy ở trên cả 4 loại mẫu: phân người, phân động vật nuôi, thức ăn và nước (Bảng 3.3).

### 3.1.5. Tỷ lệ phân bố của gen *mcr-1* trên NST và plasmid của các chủng *E. coli*

**Bảng 3.4. Sự phân bố của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên NST và plasmid**

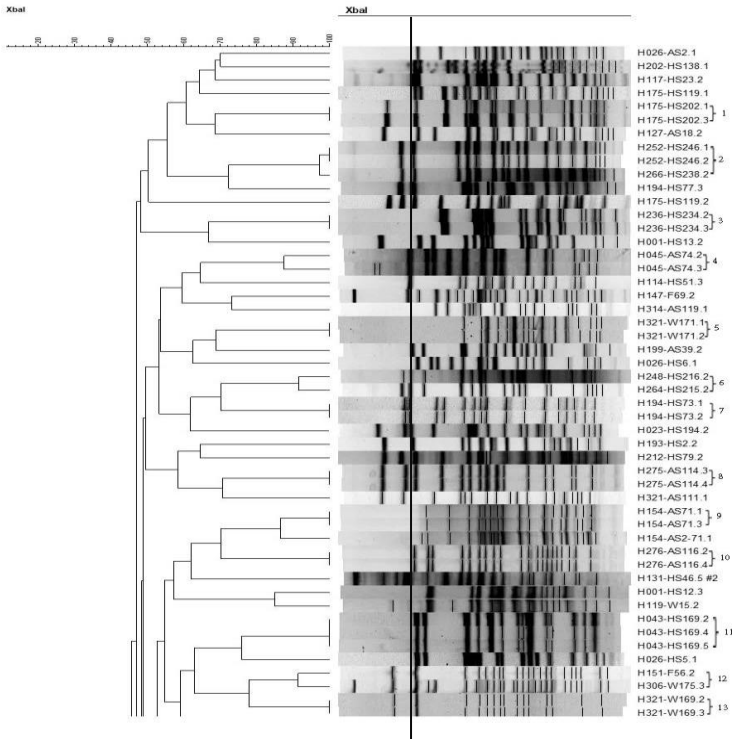
Loại mẫu	<i>mcr-1</i> subtype	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên NST	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên Plasmid	Chủng mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên NST và Plasmid	Tổng số
PN	<i>mcr-1.1</i>	10	35	0	45
PĐVN	<i>mcr-1.1</i>	5	23	1	29
TĂ	<i>mcr-1.1</i>	3	0	0	3
N	<i>mcr-1.1</i>	5	4	1	10
Tổng số	<i>mcr-1.1</i>	23	62	2	87
		$p < 0,001$			

\* *Ghi chú:* PN: phân người; PĐVN: phân động vật; TĂ: thức ăn; N: nước

Nhận xét: Gen *mcr-1* kháng colistin ở các chủng *E. coli* được tìm thấy ở cả trên NST và plasmid. Số lượng gen *mcr-1* nằm trên plasmid chiếm 71,2% (n=62) và trên NST là 26,4% (n=23). Đặc biệt có 2 chủng có gen *mcr-1* nằm đồng thời trên NST và plasmid trong đó 01 chủng phân lập từ nước và 01 chủng từ động vật. 100% gen *mcr-1* có subtype là *mcr-1.1*

### 3.2. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được trong nghiên cứu

#### 3.2.1. Môi liên hệ về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn mang gen *mcr-1*



**Hình 3.2: Hình đại diện Cây phả hệ thể hiện mối liên hệ kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại Hà Nam**

Kết quả phân tích kiểu gen của 240 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bằng kỹ thuật PFGE (từ hình 3.3-3.6) cho thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu có sự đa dạng về kiểu gen. Kết quả phân tích Phylogenetic tree đã xác định được 58 cụm chủng có kiểu gen tương đồng cao với mức độ giống nhau về kiểu gen  $\geq 90\%$ . Trong số

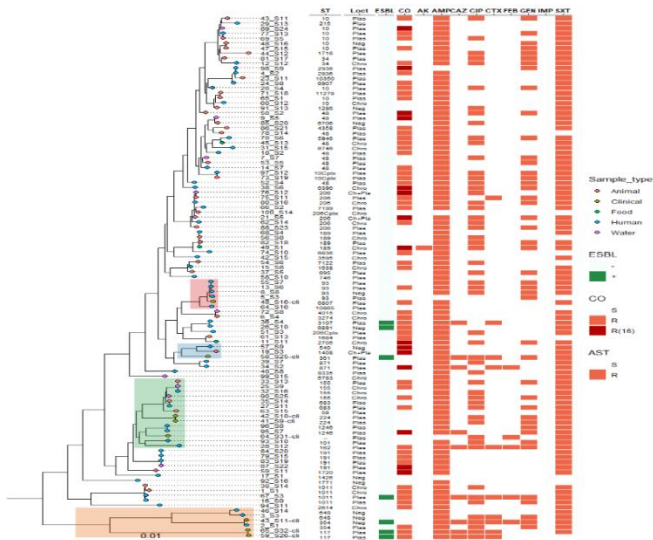


các cụm chủng có kiểu gen giống nhau, các cụm chủng có các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* giống nhau được phân lập từ cùng 1 mẫu chiếm 68.9% (40 cụm chủng). 18 cụm chủng giống nhau còn lại là các chủng phân lập được từ các mẫu phân người, phân động vật nuôi, thức ăn và nước trong cùng một hộ và giữa các hộ khác nhau.

### 3.2.2. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen

#### 3.2.3.1. Đặc điểm phân bố các sequence type của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu

Nghiên cứu đã lựa chọn được 98 chủng để giải trình tự toàn bộ hệ gen nhằm phân tích sâu hơn về đặc điểm sinh học phân tử cũng như sự phân bố của các STs của các chủng *E. coli* trong cộng đồng.



**Hình 3.7: Cây phân loại core genome và sequence type của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại Hà Nam**

Hình 3.7 cho thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người, phân động vật nuôi và môi trường nước có sự phân bố rất đa dạng về kiểu gen. Có 56 các sequence types (STs) khác nhau.

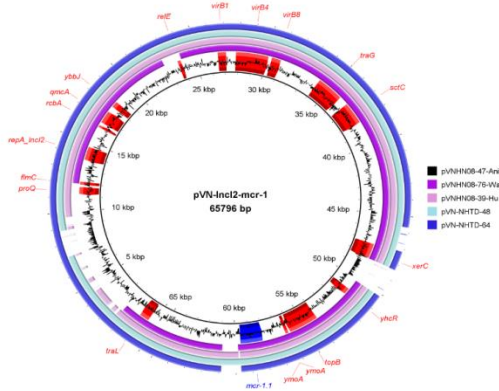
### 3.3. Kết quả xác định đặc điểm plasmid, cơ chế lan truyền qua trung gian plasmid và cấu trúc di truyền động của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1*

**Bảng 3.10: Số lượng và loại plasmid mang các gen *mcr-1***

STT	Replicon formula (In silico)	Số chủng (short read)	Kích thước (Kb)	Loại mẫu
1	IncFIA	3	150 - 300	Phân người + động vật
2	IncFIA : IncFIC : rep2327	1	50 - 100	Phân động vật
3	IncFIB : IncHI1B	2	100 - 150	Phân động vật + nước
4	IncFIB : IncHI1B : IncHI1B	2	150 - 200	Phân người + động vật
5	IncFIB : IncHI1B : IncHI1B : IncN	1	100 - 150	Phân động vật
6	IncFIB : IncHI1B : IncHI2A : IncHI2 : IncN	1	>300	Phân người
7	IncFIB : IncHI1B : IncN	2	50 - 150	Phân người + động vật
8	IncFIB : IncI2	1	<50	Phân người
9	IncFIC : rep2244 : IncHI2A : IncHI2	1	>300	Phân người
10	IncHI1B	3	50 - 100	Phân người + nước
11	IncHI1B : IncHI1B	1	100 - 150	Phân người
12	IncHI1B : IncHI1B : rep2327	1	50 - 100	Phân người
13	IncHI1B : IncHI2A : IncHI2	2	200 - 300	Phân động vật
14	IncHI1B : IncHI2A : IncHI2 : IncN	4	>300	Phân người + động vật
15	IncHI1B : IncX1	2	100 - 150	Phân người + động vật
16	IncHI1B : IncX2	1	100 - 150	Phân người
17	IncHI1B : rep2327	1	100 - 150	Phân động vật
18	IncHI2A : IncHI2	3	200 - 300	Phân người + động vật
19	IncHI2A : IncHI2 : IncI2	2	>300	Phân người
20	IncHI2A : IncHI2 : IncN	1	200 - 300	Nước
21	IncHI2A : IncHI2 : IncY	2	200 - 300	Phân người + động vật
22	IncHI2A : IncI2 : IncN : IncHI2	1	200 - 300	Phân người
23	IncI2	8	50 - 100	Phân người + động vật+ nước
24	IncN	1	50 - 100	Phân động vật
25	IncP	7	50 - 100	Phân người + động vật
26	IncX1	1	<50	Phân người
27	IncX4	5	<50	Phân người + động vật
28	undetected	6	<50	Phân người + động vật

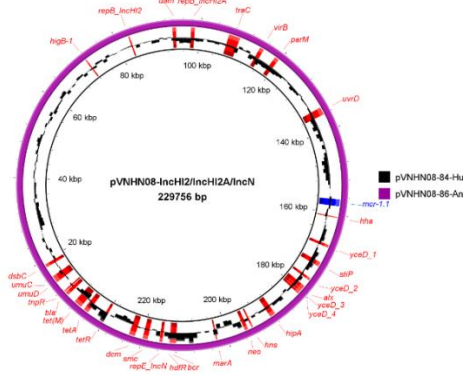
Có nhiều loại plasmid mang gen *mcr-1*, trong đó có các plasmid mang một đơn vị sao chép (single replicon) và plasmid mang nhiều đơn vị sao chép (multireplicon). Sự kết hợp của các loại replicon đơn trên tạo ra 20 loại multireplicon plasmid khác nhau. Các replicon đơn thường gặp trong cộng đồng là IncI2 (n=8, 12,1%), IncP (n=7, 10,6%), IncX4 (n=5, 7,6%)

### 3.3.3. Xác định cấu trúc của các yếu tố di truyền di động mang gen *mcr-1*



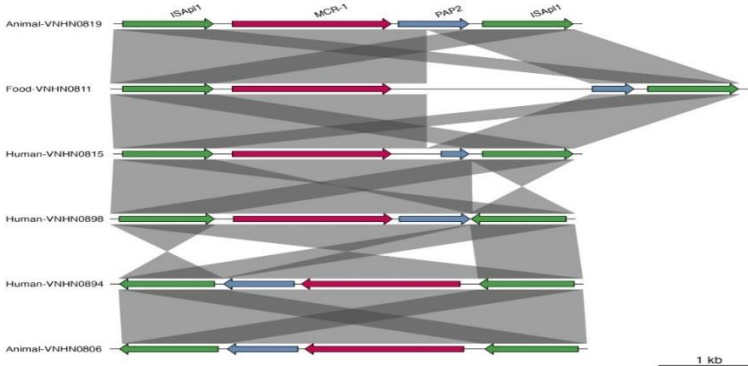
**Hình 3.8: Cấu trúc plasmid IncI2 mang gen *mcr-1***

Sử dụng dữ liệu long-read và short-read để so sánh trình tự của plasmid IncI2 của phân người, động vật, nước trong cộng đồng nghiên cứu và mẫu từ lâm sàng với pVNHN08-47-Ani-màu đen của phân động vật, pVNHN08-76-Wa-tím là của mẫu nước, pVNHN08-39-Hu-màu hồng là mẫu của phân người, pVN-NHTD-48 và pVN-NHTD-64-màu xanh lam và xanh da trời là của bệnh nhân trên lâm sàng



**Hình 3.9: Cấu trúc plasmid IncHI2/IncHI2A/IncN mang gen *mcr-1***

Sử dụng dữ liệu long-read và short-read để so sánh trình tự của plasmid IncHI2/IncHI2A/IncN của phân người và động vật. pVNHN08-84-Hu-màu đen là của phân người, pVNHN08-86-An-màu tím là của động vật



**Hình 3.10.** Cấu trúc di truyền động transposon của 6 mẫu đại diện của gen *mcr-1* trên NST của các chủng *E. coli* phân lập từ phân người, động vật, thức ăn trong nghiên cứu. ISAp11: mũi tên màu xanh lam; gen *mcr-1*: mũi tên màu đỏ; PAP2: mũi tên màu xanh da trời.

## CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

### 4.1. Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập được từ người, động vật nuôi, thực phẩm và nước tại xã Thanh Hà huyện Thanh Liêm, Hà Nam giai đoạn 2015

#### 4.1.1. Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập được từ người, động vật nuôi, thực phẩm và nước

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tại các hộ gia đình tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam cho thấy tỷ lệ các mẫu có chứa chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin cao ở người và động vật nuôi khi so sánh với các nghiên cứu của Liu và cs ở Trung Quốc, tỷ lệ tương ứng là 36.6% và 34,4%, chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin cũng tìm thấy ở các mẫu thức ăn tại các hộ gia đình (3.8%) và mẫu nước bao gồm nước giếng sinh hoạt, nước mưa, nước tưới (8.4%) (Bảng 3.2).

Nghiên cứu này của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam khảo sát đồng bộ thực trạng các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* cả ở người, động vật và môi trường (nước, thức ăn) của một khu vực thuộc thôn Bắc Bộ.

Các nghiên cứu tại Trung Quốc, Nhật Bản, Pháp trên phân động vật, phân nông dân, thức ăn trong thời gian 2015-2016 cho thấy tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* tương ứng là 21% chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở phân động vật ở Trung Quốc; 8,47% và 4,84% *E. coli* mang gen *mcr-1* ở phân động vật và ở phân người nông dân làm việc tại nông trại tại Nhật; Tại Pháp 5,9% *E. coli* mang gen *mcr-1* ở thức ăn.

#### **4.1.2. Mức độ nhạy cảm colistin của các chủng *E. coli* mang gen kháng *mcr-1***

Trong số 398 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được có 160 chủng (40,2%) có biểu hiện kiểu hình kháng colistin (MIC >2 $\mu$ g/ml), các chủng *E. coli* biểu hiện kiểu hình kháng colistin có mang gen *mcr-1* gặp ở cả 4 loại mẫu (phân người, phân động vật, nước, thức ăn) (Hình 3.1). Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin có MIC = 4 $\mu$ g/ml chiếm tỷ lệ nhiều nhất (80%), tuy nhiên có 21 chủng có MIC >16 (5,2%) bao gồm: 5 chủng phân lập từ mẫu phân người, 4 chủng từ mẫu phân động vật, 7 chủng từ mẫu nước và 5 chủng từ thức ăn. Một số nghiên cứu trên thế giới cũng thấy tỉ lệ biểu hiện kiểu hình của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* cao như trong nghiên cứu của Katarzyna Cwiek và cs tại trang trại ở Ba Lan thấy có 52,9% các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có biểu hiện kiểu hình và 88,8% có MIC colistin là 8  $\mu$ g/ml. Một số các nghiên cứu khác trên thế giới cũng thấy kết quả MIC colistin các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ các trang trại chủ yếu là 8  $\mu$ g/ml.

#### **4.1.3. Sự phổ biến của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên NST và plasmid**

Khi giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*, nghiên cứu của chúng tôi xác định được gen *mcr-1* nằm trên cả NST và plasmid, tuy nhiên tỷ lệ gen *mcr-1* nằm trên plasmid cao hơn nhiều so với nằm trên NST (71,3% so với 26,4% -  $p < 0.001$ ). Toàn bộ 87 chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có subtype *mcr-1.1*. Nghiên cứu của chúng tôi cũng xác định được 2 chủng (2,3%) *E. coli* có gen *mcr-1* nằm trên cả nhiễm sắc thể và plasmid bao gồm 1 chủng phân lập từ phân động vật và 1 chủng phân lập từ nước.

Nhiều nghiên cứu ghi nhận gen này tồn tại trên plasmid, tuy nhiên, một số nghiên cứu đã tìm thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên NST.

## **4.2. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được trong nghiên cứu**

### **4.2.1. Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bằng kỹ thuật PFGE**

Kết quả PFGE cho thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có sự rất đa dạng về kiểu gen (hình 3.3 đến 3.6). Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có mối liên quan đến nhau với độ tương đồng về kiểu gen  $\geq 90\%$  chiếm 61,3% (147/240 chủng) được phân bố trong 58 nhóm kiểu gen. 38,7% các chủng (93/240) không có mối liên hệ về kiểu gen và có sự phân bố kiểu gen đa dạng.

Kết quả đánh giá các mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật PFGE, chúng tôi thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* tại cộng đồng nghiên cứu của chúng tôi vừa có tính ổn định về các kiểu gen, tạo ra các nhóm kiểu gen lây truyền trong các hộ gia đình, vừa có tính đa dạng với các kiểu gen không có mối liên quan. Kết quả này phù hợp với sự phân bố gen *mcr-1* trên NST và plasmid đã được làm rõ ở phần trên.

### **4.2.2. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen**

Nhằm nghiên cứu sâu hơn về cơ chế lan truyền của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng tại một vùng nông thôn Bắc Bộ Việt Nam, nghiên cứu của chúng tôi đã lựa chọn 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*

#### **4.2.3.1. Đặc điểm phân bố các sequence type của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu**

Kết quả giải trình tự 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* short-read, trên cây phân loại core genome và sequence type (hình 3.6) cho thấy trong 94 chủng (7 chủng phân lập từ bệnh phẩm lâm sàng), có 56 các STs khác nhau. Các STs thường gặp chung cho cả 4 loại mẫu bao gồm ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%). ST10 là ST thường gặp của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong khu vực và trên thế giới ở cả người, động vật và môi trường. ST48 là ST được ghi nhận

nhiều tại Trung Quốc trên các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ động vật.

Chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có ST206 là chủng ít gặp, được ghi nhận rải rác trên động vật và ở bệnh nhân trên lâm sàng. Tuy nhiên chủng này lại là chủng nổi trội có cả ở người, động vật và trong môi trường nước trong nghiên cứu của chúng tôi nhưng chưa tìm thấy ở các chủng thu nhận từ lâm sàng.

#### 4.2.3.2. Xác định các đặc điểm plasmid của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1*

Phân tích mô phỏng trên máy tính các plasmid mang gen *mcr-1* của 64 chủng dựa trên dữ liệu giải trình tự short-read cho thấy các plasmid tồn tại ở 2 dạng: các plasmid 1 đơn vị sao chép duy nhất (single-replicon plasmid) và các plasmid có nhiều đơn vị sao chép kết hợp với nhau trong cùng một yếu tố di truyền động (multi-replicon plasmid).. Đây là nghiên cứu đầu tiên của Việt Nam xác định các loại đơn vị sao chép của plasmid của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên tất cả các loại mẫu (người, động vật, môi trường) trong cộng đồng bằng kỹ thuật WGS. Nghiên cứu của Malhotra-Kumar và cộng sự đã giải trình tự 1 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại trang trại ở Văn Lâm, Hưng Yên xác định có 4 loại plasmid là IncFII, IncF1A, IncF1B và IncX1 replicon. Nghiên cứu của Yamaguchi và cs trên mẫu phân người tại tỉnh Thái Bình năm 2017 cũng ghi nhận 5 loại plasmid chỉ chứa 1 đơn vị sao chép là IncI2, IncP1, IncHI2, Inc X4 và IncY.

Kết quả trên cũng cho thấy tính đa dạng của các plasmid của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng, thể hiện nhiều nhất trong cộng đồng người khỏe mạnh. Các plasmid có kích thước rất đa dạng, kích thước plasmid nhỏ nhất là <50 Kb, plasmid lớn nhất có kích thước >300 Kb. Có 7 loại plasmid chứa 1 đơn vị sao chép mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng trong các mẫu nghiên cứu bao gồm là IncI2 (n=8, 12,1%), IncP (n=7, 10,6%), IncX4 (n=5, 5, 7,6%), IncFIA (n=3, 4,5%), IncHI1B (n=3, 4,5%), IncN (n=1, 1,5%) and IncX1 (n=1, 1,5%) tìm thấy ở người, động vật và nước. Các loại plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu phát hiện được bao gồm sự kết hợp của các loại plasmid IncHI2, IncN, IncX1 and IncR. Có

20 loại đơn vị sao chép khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2, được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* ở người, động vật và nước.

Để đánh giá cơ chế lan truyền qua trung gian plasmid, chúng tôi lựa chọn một số chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên các loại plasmid khác nhau để làm kỹ thuật tiếp hợp.

#### 4.2.3.3. Xác định chế lan truyền qua trung gian plasmid của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1*

Kết quả thử nghiệm tiếp hợp đã thành công truyền gen *mcr-1* từ chủng cho sang chủng *E. coli* J53 17/24 chủng (70,8%) bao gồm cả các chủng có plasmid chứa một đơn vị sao chép và plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép (Bảng 3.12). Kết quả cho thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid trong cộng đồng nghiên cứu bao gồm cả plasmid chứa một đơn vị sao chép và plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép đều có khả năng truyền gen *mcr-1* cho các chủng khác. Thử nghiệm này của chúng tôi có tỉ lệ truyền gen thành công cao hơn nghiên cứu của Lê Quốc Phong và cs. Có thể do chúng tôi chọn các chủng đã biết có gen *mcr-1* nằm trên plasmid và sử dụng chủng nhận khác nhau dẫn đến sự khác biệt này.

#### 4.2.3.4. Xác định cấu trúc di truyền động của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1*

Chúng tôi đã tiến hành giải trình tự 10 chủng đại diện cho 6 đơn vị sao chép của plasmid sử dụng phương pháp MinION (Oxford Nanopore Technologies) giải trình tự nanopore. Kết quả của kỹ thuật long-read đã khẳng định những phát hiện của kết quả mô phỏng trên máy tính của kỹ thuật short-read bao gồm 3 loại plasmid chứa đơn vị sao chép duy nhất IncI2 (n=2), IncP (n=1), IncHI2 (n= 1) và 2 plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép IncHI2 và IncHI2A trong cộng đồng. Chúng tôi cũng sử dụng 2 chủng có nguồn gốc từ lâm sàng để so sánh. Nanopore cũng được sử dụng để xác định gen *mcr-1* nằm trên NST (n=2).

Kết quả cho thấy plasmid IncI2 mang gen *mcr-1* của các chủng *E.coli* phân lập ở các mẫu thu thập từ động vật cũng giống với plasmid IncI2 của các chủng *E.coli* phân lập ở các mẫu thu thập từ người trong cộng đồng (tỷ lệ bao phủ :90%) và cũng giống với IncI2 từ bệnh nhân



trên lâm sàng (tỷ lệ bao phủ:98%) với khoảng đồng nhất từ 81%-100% (Hình 3.8). Chúng tôi cũng quan sát thấy tỷ lệ bao phủ 100% khi so sánh trình tự trên dữ liệu long-read của 2 plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép Inc (HI2:HI2A:N) từ chủng *E. coli* phân lập từ phân người và động vật (Hình 3.9). Kết quả này gợi ý rằng sự có mặt của plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* là do sự lây truyền ngang trong cộng đồng vi khuẩn của người, động vật, môi trường và bệnh nhân trên lâm sàng.

Chúng tôi cũng dựng cấu trúc của transposon của 10 chủng đại diện dựa trên dữ liệu thu được từ nền tảng kỹ thuật Nanopore. Có 6 dạng cấu trúc khác nhau của gen *mcr-1* với sự có mặt hoặc không có mặt của ISAp11 đã được phát hiện trên cả NST và plasmid. Trong số các chủng mang gen *mcr-1* trên NST (n=6) có 5 chủng có chứa đầy đủ cấu trúc của transposon Tn6330 là ISAp11-pap2-mcr-1-ISAp11. Một chủng còn lại có sự kết hợp giữa ISAp11 và IS91 (ISAp11-*mcr-1*-IS91) (Hình 3.10). Có 2 biến thể (ISAp11 và IS1A) chúng tôi tìm thấy ở 2 plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép Inc (HI2:HI2A) và Inc(HI2:HI2A:N) plasmid (mẫu pVNHN08-95 and pVNHN08-84). Chúng tôi không phát hiện được transposon Tn6330 đầy đủ được trên plasmid. Tuy nhiên, Yamaguchi và cộng sự lại phát hiện transposon Tn6330 đầy đủ ISAp11-pap2-mcr-1-ISAp11 trong nghiên cứu của mình.

Tóm lại, nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng có sự xuất hiện với tỷ lệ cao các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng tại một xã thuộc vùng nông thôn Bắc Bộ ở Việt Nam. Các chủng này nằm trên cả NST và plasmid. Các kết quả gen học giống nhau cũng gợi ý có sự lây lan giữa người và động vật thông qua thức ăn và môi trường nước ô nhiễm với *E. coli* mang gen *mcr-1*. Qua đó, chúng tôi cũng thấy rằng việc giám sát tính kháng colistin cần phải có sự đánh giá và giám sát đồng bộ cả ở trên người, động vật và môi trường ô nhiễm. Các giải pháp giảm thiểu sự gia tăng tỷ lệ đề kháng colistin không chỉ giám sát sử dụng kháng sinh colistin trên lâm sàng hay ngăn chặn việc sử dụng colistin trong chăn nuôi mà còn cần phải đưa ra các biện pháp để giảm thiểu sự ô nhiễm thức ăn và môi trường nước với các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*.

### 4.3. Hạn chế và hướng nghiên cứu tiếp theo

Nghiên cứu có giới hạn về thời gian, kinh phí, cỡ mẫu thực hiện và trong khuôn khổ của một luận án nghiên cứu sinh không thể giải quyết được toàn bộ các vấn đề liên quan tới khía cạnh dịch tễ, vi sinh và sinh học phân tử. Vì vậy cần thiết có các nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ nguồn truyền nhiễm, các yếu tố nguy cơ và chứng minh nguy cơ lây lan của vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng từ nhiều nguồn khác nhau như thức ăn, đất, nước thải... Ngoài ra cũng cần thiết có các nghiên cứu can thiệp nhằm đưa ra các giải pháp nhằm hạn chế sự lây nhiễm và lan truyền các vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* nói riêng và các vi khuẩn kháng kháng sinh nói chung trong cộng đồng.

Trong mục tiêu 2, chúng tôi có mong muốn có thể so sánh được đặc điểm sinh học phân tử của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu với một số chủng *E. coli* phân lập được tại một số vùng tại Việt Nam giai đoạn 2016 – 2018 để xem có sự thay đổi về mặt gen học hay không. Tuy nhiên chúng tôi không thực hiện được do chỉ có thể thu thập được dữ liệu của một số lượng nhỏ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên lâm sàng (n=7) để so sánh. Vì vậy cần có những nghiên cứu tương tự tiếp theo trên cộng đồng để có thể đánh giá được sự thay đổi theo thời gian của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* chúng tôi có kết luận sau đây:

1. Tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm tỉnh Hà Nam ở mức rất cao ở cả mẫu phân người, phân động vật, thức ăn và môi trường nước: tỷ lệ tương ứng là 36,6% và 34,4%, 3,8% và 8,4%.

2- Các chủng *E. coli* có gen *mcr-1* nằm trên cả NST và plasmid nhưng tỷ lệ nằm trên plasmid cao hơn: 71,3% nằm trên plasmid so với 26,4% nằm trên NST-  $p < 0.001$ .

- Phân tích mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật PFGE cho thấy có 18 nhóm kiểu gen giống nhau được phân lập từ các hộ khác nhau và/hoặc các loại mẫu khác nhau.

- Trong số 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được giải trình tự toàn bộ gen có 56 các ST khác nhau trong đó có các ST thường gặp chung cho cả 4 loại mẫu phân người, động vật, thức ăn và nước bao gồm ST10 (n=10, 11%), ST48 (n=9, 9%) và ST206 (n=8, 8%).

- Các plasmid có kích thước rất đa dạng, kích thước plasmid nhỏ nhất là <50 Kb, plasmid lớn nhất có kích thước >300 Kb. Có 7 loại replicon đơn mang gen *mcr-1* được phát hiện từ 29 chủng trong các mẫu nghiên cứu bao gồm là IncI2 (n=8, 12,1%), IncP (n=7, 10,6%), InX4 (n=5, 5, 7,6%), IncFIA (n=3, 4,5%), IncHI1B (n=3, 4,5%), IncN (n=1, 1,5%) and IncX1 (n=1, 1,5%) tìm thấy ở người, động vật và nước. Có 20 loại plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép khác nhau với sự kết hợp của các loại plasmid IncFIA, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncN, IncY, IncX1 và IncI2, được tìm thấy trong 31 chủng *E. coli* ở người, động vật và nước. Sự kết hợp hay gặp nhất là giữa IncHI2 với các replicon khác (n= 23, 4%) và IncH với IncF (n= 12, 33%).

- Kết quả cho thấy plasmid IncI2 mang gen *mcr-1* từ động vật cũng giống với plasmid IncI2 từ người trong cộng đồng (tỷ lệ bao phủ :90%) với khoảng đồng nhất từ 81%-100%.

- Trong số các chủng mang gen *mcr-1* trên NST (n=6) có 5 chủng có chứa đầy đủ cấu trúc của transposon Tn6330 là ISAp11-pap2-mcr-1-ISAp11. Một chủng còn lại có sự kết hợp giữa SAp11 và IS91 (ISAp11-mcr-1-IS91)