

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**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2022

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

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. TS. TRẦN HUY HOÀNG**
- 2. PGS.TS. VŨ THỊ TƯỜNG VÂN**

**HÀ NỘI - 2022**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Trần Huy Hoàng, Phó trưởng Khoa Vi khuẩn- Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, là thầy hướng dẫn khoa học, đã luôn giúp đỡ tôi, tận tình truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi có thể hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Vũ Thị Tường Vân, nguyên Trưởng khoa Vi sinh-Bệnh viện Bạch Mai, là giáo viên đồng hướng dẫn, đã luôn nhiệt tình giúp đỡ, không chỉ truyền đạt kiến thức, kinh nghiệm chuyên môn quý báu mà cả những bài học trong cuộc sống trong suốt quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến Ths. Vũ Thị Ngọc Bích-nghiên cứu sinh thuộc Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford Việt Nam (OUCRU), người bạn luôn đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài, luôn sẵn sàng hợp tác, hỗ trợ và chia sẻ những kinh nghiệm quý báu về giải trình tự gen trong suốt quá trình tôi thực hiện các nghiên cứu, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới TS. Trần Diệu Linh-Phòng Quản lý chất lượng -Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã chia sẻ những kiến thức và kinh nghiệm thực tế quý báu về nghiên cứu và giải trình tự gen.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ths Phạm Duy Thái- nhân viên phòng nghiên cứu Kháng Kháng sinh đã hỗ trợ tôi rất nhiều trong thực hiện các kỹ thuật khó trong nghiên cứu như kỹ thuật PFGE.

Tôi xin chân thành cảm ơn em Vũ Thị Thu Hiền, Hoàng Thị An Hà, Hoàng Thị Mai Hương -Các học viên cùng học tại Phòng nghiên cứu kháng kháng sinh đã hỗ trợ tôi, cùng nhau bàn bạc, chia sẻ kinh nghiệm trong suốt quá trình tôi làm nghiên cứu tại Phòng Kháng kháng sinh của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Tôi xin chân thành cảm ơn em Thương, em Diệp của Trung tâm nghiên cứu Oxford đã đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện các kỹ thuật giải trình tự gen.

Tôi xin bày lời cảm ơn chân thành tới TS Trương Thái Phương và lãnh đạo Khoa Vi sinh, các anh chị em phòng Virus miễn dịch và sinh học phân tử, phòng môi trường, phòng KSD cùng tập thể khoa Vi sinh đã hỗ trợ, tạo điều kiện cho tôi học tập và hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới các bạn học viên cùng học nghiên cứu sinh, các anh, chị và các bạn của Phòng thí nghiệm Kháng sinh Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và của OUCRU đã quan tâm, giúp đỡ, hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời trân trọng cảm ơn tới:

–Ban giám đốc, Khoa Vi sinh bệnh viện Bạch Mai

–Ban giám đốc cùng toàn thể cán bộ Khoa Vi khuẩn, viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Tôi xin trân trọng cảm ơn quỹ NAFOSTED đã hỗ trợ kinh phí từ đề tài Mã số: 108.02-2017.320 do tiến sỹ Trần Huy Hoàng làm chủ nhiệm để chúng tôi có thể hoàn thành nghiên cứu này.

Cuối cùng tôi xin ghi nhớ công ơn sinh thành, nuôi dưỡng, dạy dỗ của cha mẹ tôi, cha mẹ chồng và sự ủng hộ, động viên, thương yêu, chăm sóc, khích lệ của chồng, con và các anh, chị, em những người luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

*Hà Nội, ngày.....tháng.....năm 2022*

**Nguyễn Thị Tuyết Mai**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là **Nguyễn Thị Tuyết Mai**, nghiên cứu sinh khóa 36, Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương, chuyên ngành Vi sinh y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Trần Huy Hoàng và PGS.TS. Vũ Thị Tường Vân.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày.....tháng.....năm 2022*

**Người viết cam đoan**

**Nguyễn Thị Tuyết Mai**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

- ADN	Axit deoxyribonucleic
- AK	Amikacin
- <i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
- bp	cặp bazơ
- CAZ	Ceftazidime
- CIP	Ciprofloxacin
- CLSI	Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và Phòng xét nghiệm (Clinical and Laboratory Standards Institute)
- CS	Colistin
- CTX	Cefotaxime
- <i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
- ESBL	Enzym ly giải vòng $\beta$ -lactam phổ rộng (Extended-spectrum $\beta$ -lactamase)
- FEP	Cefepim
- GM	Gentamicin
- IMP	Imipenem
- IS	Trình tự chèn (Insert sequence)
- <i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
- KKS	Kháng kháng sinh
- KS	Kháng sinh
- LB	Luria-Bertani
- <i>mcr-1</i>	Mobilized colistin resistance 1 hoặc mediated colistin resistance 1
- MEM	Meropenem
- MIC	Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimal Inhibitory Concentration)
- MLST	Phân loại trình tự đa vị trí (Multi Locus Sequence Typing)
- NST	Nhiễm sắc thể
- N	Nước
- PCR	Phản ứng chuỗi (Polymerase Chain Reaction)
- PN	Phân người
- PĐVN	Phân động vật nuôi
- PFGE	Điện di xung trường (Pulsed-field Gel Electrophoresis)
- <i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- Replicon plasmid	Đơn vị sao chép plasmid
- TĂ	Thức ăn
- WGS	Giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn (Whole Genome Sequence)

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ</b> .....	1
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	4
1.1. Kháng sinh và sự đề kháng kháng sinh .....	4
1.1.1. Định nghĩa.....	4
1.1.2. Cơ chế tác dụng.....	4
1.1.3. Sự đề kháng kháng sinh.....	5
1.1.4. Các nguyên nhân gây gia tăng và lan truyền các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh .....	15
1.1.5. Colistin.....	19
1.2. Vi khuẩn gram âm đường ruột và thực trạng kháng kháng sinh của các vi khuẩn gram âm đường ruột.....	25
1.2.1. Vi khuẩn gram âm đường ruột.....	25
1.2.2. Thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn gram âm đường ruột hiện nay ...	26
1.3. Đặc điểm vi sinh vật học và tình hình kháng colistin của <i>E. coli</i> .....	27
1.3.1. Đặc điểm vi sinh vật học .....	27
1.3.2. Các nghiên cứu về gen <i>mcr-1</i> kháng colistin của <i>E. coli</i> và các vi khuẩn gram âm đường ruột trên thế giới và Việt Nam.....	28
1.3.3. Một số đặc điểm về gen <i>mcr-1</i> và plasmid của các chủng <i>E. coli</i> kháng colistin .....	32
1.4. Các kỹ thuật phát hiện kháng kháng sinh và các kỹ thuật sinh học phân tử sử dụng trong phát hiện các gen kháng kháng sinh.....	33
1.4.1. Kỹ thuật phát hiện kháng kháng sinh.....	33
1.4.2. Các kỹ thuật sinh học phân tử nghiên cứu vi khuẩn kháng kháng sinh....	34
1.4.3. Kỹ thuật PCR phát hiện gen kháng kháng sinh .....	36
1.4.4. Kỹ thuật RADP PCR.....	36
1.4.5. Kỹ thuật điện di xung trường.....	36
1.4.6. Kỹ thuật Southern blot phân tích hệ gen vi khuẩn.....	37
1.4.7. Kỹ thuật Multi Locus Sequence Typing.....	37
1.4.8. Kỹ thuật giải trình tự gen.....	38
1.5. Các vấn đề cần giải quyết trong nghiên cứu .....	38

<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	40
2.1. Địa điểm nghiên cứu.....	40
2.2. Thiết kế nghiên cứu .....	40
2.3. Thời gian nghiên cứu.....	40
2.4. Đối tượng nghiên cứu .....	40
2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu.....	41
2.6. Phương pháp lấy mẫu và kỹ thuật xét nghiệm.....	45
2.6.1. Kỹ thuật nuôi cấy và phân lập vi khuẩn.....	45
2.6.2. PCR phát hiện gen <i>mcr-1</i> .....	46
2.6.3. Kỹ thuật định danh vi khuẩn bằng máy MALDI TOF.....	48
2.6.4. Kỹ thuật đánh giá nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu.....	49
2.6.5. Phân tích mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật PFGE .....	54
2.6.6. Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen của vi khuẩn.....	55
2.6.7. Kỹ thuật tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen <i>mcr-1</i> qua plasmid .....	58
2.7. Biến số và chỉ số trong nghiên cứu .....	59
2.8. Phương pháp thu thập thông tin .....	60
2.9. Xử lý và phân tích số liệu .....	60
2.10. Khống chế sai số.....	60
2.11. Đạo đức trong nghiên cứu.....	60
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU</b> .....	62
3.1. Tỷ lệ vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> kháng colistin phân lập được từ người và động vật nuôi, thực phẩm và nước tại xã Thanh Hà, Thanh Liêm, Hà Nam, năm 2015.....	62
3.1.1. Đặc điểm chung về các loại mẫu được thu thập trong nghiên cứu.....	62
3.1.2. Tỷ lệ mẫu có chứa chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được từ người người, động vật nuôi, thực phẩm và nước .....	63
3.1.3. Tỷ lệ chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được từ người, động vật nuôi, thực phẩm và nước .....	64
3.1.4. Mức độ nhạy cảm colistin của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> .....	66
3.1.5. Tỷ lệ phân bố của gen <i>mcr-1</i> trên NST và plasmid của các chủng <i>E. coli</i> .....	67



3.1.6. Mức độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> trong phân người và động vật nuôi, thức ăn và nước .....	68
3.2. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được trong nghiên cứu.....	70
3.2.1. Các gen kháng kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> .....	70
3.2.2. Mối liên hệ về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn mang gen <i>mcr-1</i> .....	72
3.2.3. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen.....	78
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 <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> .....	80
3.3.1. Xác định đặc điểm của các plasmid mang gen <i>mcr-1</i> .....	80
3.3.2. Xác định khả năng lan truyền gen kháng qua trung gian plasmid giữa các chủng vi khuẩn .....	85
3.3.3. Xác định cấu trúc của các yếu tố di truyền di động mang gen <i>mcr-1</i> .....	86
<b>CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN</b> .....	<b>89</b>
4.1. Tỷ lệ vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> kháng colistin phân lập được từ người, vật nuôi, thực phẩm và nước tại xã Thanh Hà huyện Thanh Liêm, Hà Nam giai đoạn 2014-2015 .....	89
4.1.1. Một số đặc điểm về quần thể thu thập mẫu nghiên cứu.....	89
4.1.2. Tỷ lệ vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> 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 2014-2015 .....	90
4.1.3. Mức độ nhạy cảm colistin của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> kháng colistin .....	92
4.1.4. Sự phổ biến của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> trên NST và plasmid .....	95
4.1.5. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> tại cộng đồng trong nghiên cứu.....	96
4.2. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được trong nghiên cứu.....	98
4.2.1. Các gen kháng kháng sinh.....	98

4.2.2. Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> bằng kỹ thuật PFGE .....	100
4.2.3. Đặc điểm sinh học phân tử của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen.....	102
4.3. Hạn chế và hướng nghiên cứu tiếp theo .....	110
<b>KẾT LUẬN</b> .....	113
<b>ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN</b> .....	111
<b>KIẾN NGHỊ</b> .....	115
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Bảng tổng hợp gen KKS của các nhóm KS thường gặp .....	14
Bảng 1.2.	Ví dụ một số lasmid mang gen kháng kháng sinh .....	35
Bảng 2.1.	Số lượng mẫu và chủng phân lập được sử dụng trong nghiên cứu.....	42
Bảng 2.2.	Tóm tắt phương pháp lấy mẫu và kỹ thuật xét nghiệm.....	45
Bảng 2.3.	Diễn giải kết quả đọc MIC của các kháng sinh .....	53
Bảng 3.1.	Số lượng các loại mẫu thu thập theo các thôn và hộ gia đình tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam năm 2015.....	62
Bảng 3.2:	Tỷ lệ mẫu có chứa chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được từ phân người, phân động vật, thực phẩm và nước.....	63
Bảng 3.3.	Kết quả thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu colistin của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được.....	66
Bảng 3.4.	Sự phân bố của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> nằm trên NST và plasmid.....	67
Bảng 3.5.	Kết quả thử nghiệm nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu với các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> .....	68
Bảng 3.6.	Số lượng các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> đa kháng kháng sinh....	69
Bảng 3.7.	Phân bố các gen KKS theo loại mẫu và tỷ lệ kháng kháng sinh của các mẫu giải trình tự.....	71
Bảng 3.8.	Tỷ lệ phân bố các STs trong quần thể các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được.....	79
Bảng 3.9.	Các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> có cùng STs chung được phân lập từ các loại mẫu trong cùng hộ gia đình.....	79
Bảng 3.10.	Số lượng và loại plasmid mang các gen <i>mcr-1</i> .....	81
Bảng 3.11.	Các gen KKS cùng nằm trên plasmid mang gen <i>mcr-1</i> .....	82
Bảng 3.12.	Kết quả thử nghiệm tiếp hợp truyền plasmid giữa các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> và chủng vi khuẩn nhận <i>E. coli</i> J53.....	85

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1:	Tỷ lệ chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được từ người, động vật nuôi, thực phẩm và nước.....	64
Biểu đồ 3.2:	Heatmap sự phân bố của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> ở 69 hộ gia đình .....	65
Biểu đồ 3.3:	Heatmap sự có mặt các gen KKS của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> được xác định bằng giải trình tự toàn bộ bộ gen.....	70
Biểu đồ 3.4:	Biểu đồ Venn các loại replicon của plasmid mang gen <i>mcr-1</i> của các chủng <i>E. coli</i> .....	80

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1:	Cơ chế tác dụng của kháng sinh.....	4
Hình 1.2:	Cơ chế kháng kháng sinh của vi khuẩn.....	8
Hình 1.3:	Các cơ chế truyền gen ngang.....	9
Hình 1.4:	Lây truyền kháng kháng sinh qua chuỗi thức ăn.....	18
Hình 1.5:	Cơ chế tác dụng của colistin trên màng vi khuẩn Gram âm.....	21
Hình 1.6:	Biểu đồ phân bố các nước có vi khuẩn mang gen <i>mcr-1</i> kháng colistin.....	29
Hình 1.7:	Cấu trúc của 04 plasmid mang gen <i>mcr-1</i> bằng giải trình tự của các chủng <i>E. coli</i> phân lập được:.....	33
Hình 2.1.	Hình ảnh minh họa kết quả pcr phát hiện gen <i>mcr-1</i> .....	48
Hình 2.2.	Các bước phân tích dữ liệu WGS để xác định các đặc điểm phân tử của chủng mang gen <i>mcr-1</i> .....	57
Hình 3.1:	Hình ảnh đại diện kết quả điện di xung trường của đại diện một số chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập được.....	72
Hình 3.2:	Cây phả hệ thể hiện mối liên hệ kiểu gen của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập tại Hà Nam.....	73
Hình 3.3:	Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập tại Hà Nam (tiếp).....	74
Hình 3.4:	Cây phả hệ thể hiện mối liên hệ kiểu gen của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập tại Hà Nam (tiếp).....	75
Hình 3.5:	Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập tại Hà Nam (tiếp).....	76
Hình 3.6:	Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập tại Hà Nam (tiếp).....	77
Hình 3.7:	Cây phân loại core genome và sequence type của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập tại Hà Nam.....	78
Hình 3.8:	Cấu trúc plasmid IncI2 mang gen <i>mcr-1</i> .....	86
Hình 3.9:	Cấu trúc plasmid IncHI2/IncHI2A/IncN mang gen <i>mcr-1</i> .....	87
Hình 3.10.	Cấu trúc di truyền động transposon của 6 mẫu đại diện của gen <i>mcr-1</i> trên NST của các chủng <i>E. coli</i> phân lập từ phân người, động vật, thức ăn trong nghiên cứu.....	88

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng kháng sinh không hợp lý trong bệnh viện cùng với việc sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản để điều trị, phòng bệnh và kích thích tăng trưởng... dẫn tới tình trạng kháng kháng sinh (KKS) của vi khuẩn gia tăng không ngừng và ngày càng trầm trọng. Đặc biệt, sự xuất hiện gần đây của các chủng vi khuẩn gram âm mang gen New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) kháng carbapenem (carbapenem là kháng sinh thuộc “nhóm lựa chọn cuối cùng” trong điều trị các trường hợp bị nhiễm trùng do vi khuẩn gram âm sinh enzym ESBLs) [125] làm cho việc điều trị các bệnh nhiễm trùng nặng do các chủng vi khuẩn gram âm kháng carbapenem ngày càng khó khăn. Trước thực trạng đó, colistin (kháng sinh nhóm polypeptide) đã được sử dụng trở lại như là kháng sinh lựa chọn cuối cùng để điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn gram âm đa kháng và kháng carbapenem.

Mặc dù colistin bị ngừng sử dụng trên người từ những năm 1970 do có độc tính trên thận, nhưng kháng sinh này vẫn được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi. Năm 2015, Liu và cộng sự lần đầu tiên phân lập được vi khuẩn *E. coli* mang gen Mediated colistin resistance (*mcr-1*) kháng colistin từ thịt lợn và phân người tại Trung Quốc. Cùng với phát hiện này tác giả cũng đưa ra giả thuyết về nguồn gốc phát sinh, lan truyền và phổ biến của *mcr-1* ở động vật và người. Theo đó, *mcr-1* có thể phát sinh từ việc thường xuyên sử dụng colistin trong chăn nuôi, tại đường ruột các vi khuẩn đường ruột phơi nhiễm với colistin, hệ gen của chúng tiến hóa và thu nhận *mcr-1* có khả năng đề kháng colistin. Vì vậy, việc sử dụng colistin trong chăn nuôi được cho là đã tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn mang *mcr-1* có cơ hội phát triển trong hệ tiêu hóa của động vật và lây lan sang người thông qua plasmid chứa *mcr-1* [57]. Hiện nay, *mcr-1* đã được ghi nhận ở hầu khắp các nước trên thế giới. Nguyên nhân chính của sự lây lan nhanh chóng này là do gen *mcr-1* đã được xác định nằm trên các yếu tố di truyền động như transposon (ISAp11-PAP2-*mcr-1*-ISAp11:Tn6330) và nhiều loại plasmid [88]. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây đã ghi nhận các chủng *E. coli* mang đồng thời nhiều gen kháng (*mcr-1*, *bla*<sub>NDM-9</sub>, *fosA3*, *rmtB*, *bla*<sub>CTX-M-65</sub> và *floR*) mã hóa cho tính kháng nhiều nhóm kháng sinh

quan trọng như colistin, carbapenem, cephalosporin, fluoroquinolon. Các chủng *E. coli* mang nhiều gen kháng này được phân lập ở thực phẩm sống (thịt gà, thịt lợn), phân người, phân động vật, gia súc và cả ở các bệnh nhân bị nhiễm trùng. Chính vì vậy, 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 trở thành một thách thức vô cùng lớn.

Tại Việt Nam, nghiên cứu sơ bộ của chúng tôi và một số các nghiên cứu khác đã phát hiện được các trường hợp dương tính với vi khuẩn mang gen *mcr-1* kháng colistin ở trong bệnh viện, môi trường, thực phẩm và động vật nuôi [9, 60, 92, 124]. Một số nghiên cứu khác cho thấy colistin là kháng sinh thường được sử dụng trong chăn nuôi gia súc, gia cầm, thủy sản [10, 2]. 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*



## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Kháng sinh và sự đề kháng kháng sinh

##### 1.1.1. Định nghĩa:

Kháng sinh là những chất do vi sinh vật tiết ra hoặc những chất hóa học bán tổng hợp, tổng hợp, với nồng độ rất thấp, có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt tác nhân gây bệnh một cách đặc hiệu [6]

##### 1.1.2. Cơ chế tác dụng

Sau khi vào tế bào, kháng sinh được đưa tới đích tác động sẽ phát huy tác dụng bằng cách:

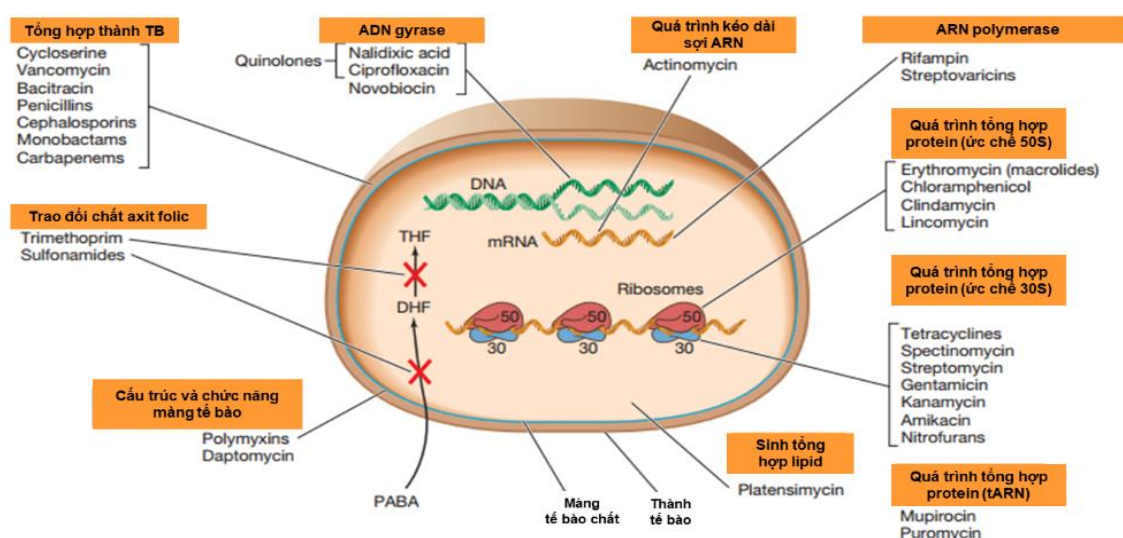
- Ức chế sinh tổng hợp vách tế bào vi khuẩn, ví dụ nhóm penicillin, nhóm cephalosporin, vancomycin

- Gây rối loạn chức năng màng nguyên tương, đặc biệt là chức năng thẩm thấu chọn lọc, làm cho các thành phần (ion) bên trong tế bào bị thoát ra ngoài, ví dụ nhóm polymyxin, Daptomycin

- Ức chế sinh tổng hợp protein, ví dụ nhóm aminoglycoside, nhóm macrolid

- Ức chế sinh tổng hợp acid nucleic, ví dụ nhóm quinolon

- Ức chế sinh tổng hợp các chất chuyển hoá cần thiết cho tế bào như kháng sinh nhóm sulfamid [6]



Hình 1.1: Cơ chế tác dụng của kháng sinh

### 1.1.3. 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. Vi sinh vật đa kháng kháng sinh (MDRO) là các vi sinh vật chủ yếu là vi khuẩn có khả năng kháng một hoặc hơn một loại kháng sinh. Một số vi khuẩn chỉ kháng một loại kháng sinh vẫn được coi là đa kháng kháng sinh như tụ cầu vàng kháng methicillin (MRSA) hay vi khuẩn đường ruột kháng carbapenem (CRE)[31]

#### 1.1.3.1. Phân loại đề kháng kháng sinh

Có 2 loại đề kháng: là đề kháng giả và đề kháng thật

- Đề kháng giả: Đề kháng giả là có biểu hiện là đề kháng nhưng không phải là bản chất, tức là không do nguồn gốc di truyền. Khi vào trong cơ thể, tác dụng của kháng sinh phụ thuộc vào ba yếu tố là kháng sinh - người bệnh - vi khuẩn. Đề kháng giả có thể do một trong ba yếu tố hoặc có thể kết hợp hai hay thậm chí cả ba yếu tố[6].

- Đề kháng thật: có 2 loại là đề kháng tự nhiên và đề kháng thu được.

+ Đề kháng tự nhiên do một số loài vi khuẩn không chịu tác dụng của một số kháng sinh nhất định. Ví dụ *P. aeruginosa* không chịu tác dụng của penicilin G, *S. aureus* không chịu tác dụng của colistin. Hoặc vi khuẩn không có vách như *Mycoplasma* không chịu tác dụng của các kháng sinh beta-lactam ức chế sinh tổng hợp vách. Đề kháng tự nhiên thường mang tính chất đặc trưng theo từng loại vi khuẩn.

- Đề kháng thu được do một biến cố di truyền là đột biến hoặc nhận được gen đề kháng để một vi khuẩn đang từ không có gen đề kháng trở thành có gen đề kháng, nghĩa là đang nhạy cảm trở thành có khả năng đề kháng kháng sinh. Các gen đề kháng có thể nằm trên một, một số hoặc tất cả các thành phần di truyền của vi khuẩn gồm nhiễm sắc thể, plasmid và transposon. Đề kháng thu được thường mang tính chất của từng cá thể trong loài[6].

Đề kháng thu được là yếu tố đóng vai trò chính trong việc gia tăng tình hình kháng kháng sinh hiện nay. Các nghiên cứu về kháng kháng sinh của vi khuẩn luôn tập trung phân tích những biến đổi về mặt di truyền của vi khuẩn do đề kháng thu được làm thay đổi tính đề kháng của vi khuẩn như thế nào

#### 1.1.3.2. Cơ chế kháng kháng sinh của vi khuẩn

Sự chọn lọc tự nhiên tạo ra những đáp ứng đặc hiệu dẫn đến các đột biến gen để thích nghi. Gần như toàn bộ các kháng sinh sẵn có hiện nay trong thực hành lâm sàng thu nhận được các đột biến gen từ các chất liệu di truyền hoặc những biến đổi của các gen biểu hiện, tạo ra sự kháng thuốc. Việc hiểu rõ nền tảng cơ bản về sinh học và gen học của sự kháng kháng sinh là vấn đề rất quan trọng để làm giảm sự lan rộng của kháng kháng sinh cũng như cải thiện việc điều trị trên lâm sàng.

Vi khuẩn thường sử dụng 2 cơ chế chính về mặt gen học để thích ứng và tạo ra sự kháng kháng kháng sinh là: - Đột biến gen thường liên quan tới sự hoạt động của các thuốc kháng sinh; - Tiếp nhận các DNA mã hóa các gen kháng từ bên ngoài thông qua lây truyền ngang từ các gen chuyển (Horizontal Gene Transfer-HGL).

Từ các gen kháng kháng sinh này sẽ tổng hợp ra các protein chức năng, tạo ra các cơ chế kháng khác nhau [69].

#### 1.1.3.3. Đột biến kháng thuốc

Đột biến kháng thuốc xảy ra khi có một tập hợp nhỏ trong quần thể vi khuẩn nhạy cảm với thuốc kháng sinh phát triển các đột biến gen ảnh hưởng tới hoạt động của thuốc kháng sinh. Nhóm vi khuẩn này vẫn tồn tại khi có mặt của thuốc kháng sinh. 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**

Vi khuẩn thay đổi đích tác động của kháng sinh do đó kháng sinh không còn vị trí để tác động, ví dụ: *A. baumannii* kháng lại imipenem và *P. aeruginosa* kháng ticarcillin và imipenem do chúng thay đổi vị trí gắn vào protein của các kháng sinh. Cơ chế tác động của các kháng sinh nhóm quinolon là ức chế hoạt động của đoạn

gen mã hóa quá trình tổng hợp enzym ADN gyrase và topoisomerase IV của tế bào vi khuẩn. Ví dụ tính kháng quinolon của *S. typhi* xảy ra do đột biến điểm của các đoạn gen mã hóa quá trình tổng hợp enzym ADN gyrase và topoisomerase IV trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn [103, 124].

**- Thay đổi các con đường chuyển hóa thông qua sự thay đổi mạng lưới điều hòa**

Enzym được tạo ra làm biến đổi hoặc phá hủy cấu trúc phân tử của kháng sinh. Ví dụ với các enzym beta-lactamase có khả năng phá hủy penicillin được báo cáo trước khi được đưa vào sử dụng vào đầu những năm 1940. Sau đó hàng loạt các enzym beta-lactamase có khả năng ức chế hoặc phân hủy các kháng sinh mạnh như cephalosporin và carbapenem được phát hiện. Hiện nay đã xác định được hơn 890 loại enzym kháng kháng sinh của vi khuẩn, nhiều hơn số lượng các loại kháng sinh đã được sản xuất và phần lớn các gen mã hóa các enzym này nằm trên các plasmid có thể truyền dễ dàng trong quần thể vi khuẩn cùng và khác loài [82].

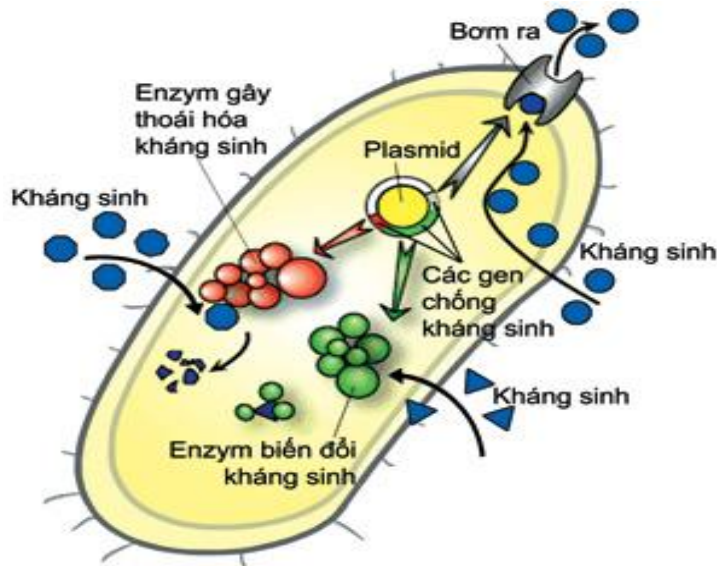
**- Làm giảm tính thấm của màng nguyên sinh chất, giảm sự hấp thu thuốc**

Làm giảm mức độ thấm của kháng sinh qua thành tế bào vi khuẩn trong trường hợp kháng tetracyclin hoặc làm mất hệ thống vận chuyển qua màng trong trường hợp kháng kháng sinh nhóm aminoglycosid. Việc thâm nhập của các kháng sinh nhóm beta-lactam vào vi khuẩn được thực hiện qua các kênh vận chuyển (porin), vi khuẩn biến đổi làm mất các kênh vận chuyển và làm hạn chế sự tác động của nhóm kháng sinh này [82].

- Cơ chế bơm đẩy (efflux pump) của các kháng sinh nhóm quinolon của vi khuẩn *E. coli* và *P. aeruginosa*, thường liên quan đến hệ thống vận chuyển ion qua màng tế bào [69].

Như vậy, từ khi tiếp xúc với kháng sinh, vi khuẩn đã phát triển các cơ chế kháng thuốc phức tạp để chống lại sự tác động của kháng sinh và tồn tại, quá trình này diễn ra theo sự tiến hóa tự nhiên, trải qua hàng trăm năm. Sự đề kháng với một loại kháng sinh thường xảy ra qua nhiều nhiều con đường khác nhau. Tuy nhiên, mỗi loài vi khuẩn có một cơ chế kháng ưu tiên khác với các loài khác đối với cùng loại kháng sinh như các vi khuẩn gram âm kháng kháng sinh nhóm beta-lactam

thông qua việc sinh enzyme beta-lactamase trong khi vi khuẩn gram dương lại kháng qua việc làm biến đổi vùng gắn kháng sinh trên vách, penicillin-binding proteins (PBPs) [69].



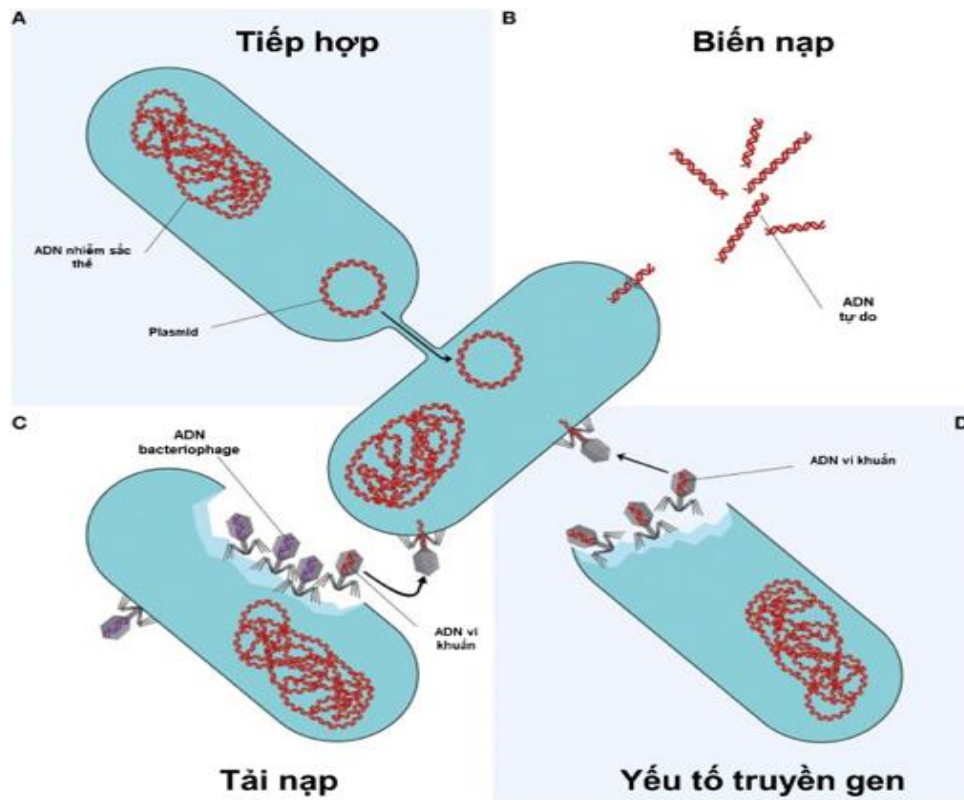
**Hình 1.2: Cơ chế kháng kháng sinh của vi khuẩn**

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

Tiếp nhận các DNA mã hóa các gen kháng kháng sinh từ bên ngoài vào thông qua con đường lây truyền ngang từ gen chuyển là con đường rất thường gặp trong kháng kháng sinh. Vi khuẩn thường thu nhận các gen kháng kháng sinh từ bên ngoài vào thông qua 03 cơ chế chính là: biến nạp, tải nạp và tiếp hợp.

Biến nạp là hình thức đơn giản nhất nhưng chỉ có một số ít các vi khuẩn tự nhiên có thể tiếp nhận các DNA ngoại lai và phát triển tính kháng. Các vụ dịch lây lan các vi khuẩn kháng thuốc trong bệnh viện thường liên quan đến cơ chế tiếp hợp- một phương pháp chuyển gen hiệu quả thông qua việc tiếp xúc giữa tế bào cho và tế bào nhận thông qua pili giới tính (như *E. coli*), thường xảy ra với tỷ lệ cao ở đường tiêu hóa dưới ở người khi được điều trị bằng kháng sinh. Tiếp hợp, theo nguyên tắc chung, 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. Một trong những cơ chế hiệu quả nhất để tích lũy các gen đề kháng kháng sinh thông qua các integron, integron cũng chứa trình tự ADN đặc biệt cho phép integrase chèn các nhóm gen gọi là cassette vào nhiễm sắc thể, mà trên đó có promoter cho phép các gen cassette mới được biểu hiện [97].



**Hình 1.3: Các cơ chế truyền gen ngang: tiếp hợp (A), biến nạp (B), tải nạp (C) và thông qua các yếu tố truyền gen (D)**

(nguồn: Christian von Wintersdorff (2016), *Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer*) [102].

*Plasmid:* Plasmid là các phân tử ADN vòng nằm ngoài nhiễm sắc thể và có khả năng tự nhân lên. Plasmid chứa các gen mã hóa nhiều đặc tính khác nhau giúp tế bào chủ tồn tại được dưới áp lực của chọn lọc. 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 plasmid lớn mang bộ gen *tra* (transfer) hoặc RTF (Resistance Transfer Factor) có khả năng tiếp hợp với vi khuẩn khác và truyền

chất liệu di truyền cho vi khuẩn nhận. Plasmid nhỏ có gen mob (mobilization) sẽ được gắn vào một plasmid có *tra*<sup>+</sup> nào đó và cùng được dẫn truyền sang vi khuẩn nhận. 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 [1]. 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 [90]

*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 plasmis này sang plasmid khác [1].

Tải nạp là quá trình vận chuyển chất liệu di truyền từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận thông qua phage bao gồm tải nạp hạn chế, đặc hiệu và tải nạp chung [1].

Có nhiều cơ chế kháng kháng sinh khác nhau nhưng về mặt di truyền học, các kháng kháng sinh mắc phải đa số đều do các đột biến gen tạo nên các gen mã hóa dẫn đến các khả năng kháng kháng sinh khác nhau. Các chủng vi khuẩn mang các gen kháng kháng sinh này có thể lây truyền cho các vi khuẩn cùng loài (lây truyền dọc) nếu các gen kháng kháng sinh nằm trên nhiễm sắc thể hoặc các loài khác nhau (lây truyền ngang) nếu gen kháng kháng sinh nằm trên các yếu tố di truyền động (plasmid, transposon, integron). Lan truyền gen kháng từ loài vi khuẩn này sang loài vi khuẩn khác thông qua các yếu tố di truyền động là một cách thức lây truyền kháng kháng sinh một cách nhanh chóng và rộng rãi làm cho tình trạng kháng kháng sinh gia tăng nhanh.

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

Gen kháng kháng sinh đã tồn tại từ rất lâu, các gen này rất phong phú và đa dạng trong các sinh vật sống cổ đại, được phát hiện trong ADN được phục hồi từ Pleistocene tiền sử (30.000 năm trước) [45]. Cho đến nay hàng chục nghìn gen kháng kháng sinh đã được phát hiện làm tăng sự hiểu biết về các cơ chế đề kháng của vi khuẩn.

Sau đây là một số các gen kháng kháng sinh của các nhóm kháng sinh khác nhau:

- *Nhóm  $\beta$ -lactam*

Họ kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam bao gồm penicillin và các dẫn xuất, các cephalosporin, các carbapenem, monobactam, và các chất ức chế  $\beta$ -lactam. Enzym kháng kháng sinh đầu tiên được báo cáo có thể phân hủy penicillin là một AmpC  $\beta$ -lactamase của *E. coli*. Ngày nay kháng kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam đã trở nên phổ biến. Cơ chế kháng phổ biến và quan trọng kháng nhóm  $\beta$ -lactam là thông qua biểu hiện enzym  $\beta$ -lactamase như: ESBL(Extended-spectrum beta-lactamase), enzym plasmid-mediated AmpC và carbapenemase. Dựa trên giải trình tự và tính chất sinh vật hóa học, họ  $\beta$ -lactamase được chia thành 4 các nhóm nhỏ: nhóm 1,2,4 là các serine- $\beta$ -lactamase trong khi các thành viên của nhóm 3 là metallo- $\beta$ -lactamase. Dựa theo đặc tính sinh học phân tử và sự đồng nhất của các axit amin, Ambler chia họ này thành 4 nhóm: A,C,D là các  $\beta$ -lactamase với nhóm serine ở vùng hoạt động trong khi nhóm B bao gồm tất cả các metallo- $\beta$ -lactamase cần có kẽm đồng xúc tác hoạt hoá enzym [100]

TEM-1 là  $\beta$ -lactamase đầu tiên được xác định là gen lan truyền qua trung gian plasmid của vi khuẩn gram âm, được phát hiện từ năm 1960. Cho đến nay trên 1150 các gen  $\beta$ -lactamase nằm trên NST, plasmid và transposon đã được xác định [25]. Các vi khuẩn kháng kháng sinh do mang các gen sinh ESBL hiện nay đã trở nên phổ biến. Vi khuẩn sinh ESBL có khả năng đề kháng kháng sinh penicillin, cephalosporin thế hệ 1, 2, 3 nhưng không kháng carbapenem. Các enzyme ESBL bị ức chế bởi các chất ức chế  $\beta$ -lactamase. Đột biến điểm do thay thế acid amin của *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-2</sub> và *bla*<sub>SHV-1</sub> tạo ra *bla*<sub>TEM-3</sub> và *bla*<sub>SHV-3</sub>. Sự thay thế các axit amin quan trọng đã tạo ra hơn 140 biến thể SHV và TERM ESBL. Các  $\beta$ -lactamase lớp C hoặc AmpC như *bla*<sub>CMY</sub> nằm trên plasmid đã được nhận biết. Trong những thập kỷ gần đây *bla*<sub>CTX-M</sub> là các ESBL phổ biến cả trong bệnh viện và cộng đồng với hơn 40 biến thể đã được tìm thấy [26].



### - Aminoglycosid

Kháng sinh aminoglycosid được đưa vào sử dụng từ những năm 60 là loại kháng sinh phổ rộng có thể hiệp đồng tác dụng với nhiều nhóm kháng sinh khác. Kháng sinh aminoglycosid có nhiều cơ chế như: 1-hoạt hóa hệ thống bơm đẩy; 2-giảm tính thấm; 3-biến đổi ribosom; 4-bất hoạt thuốc thông qua việc biến đổi enzym aminoglycosid. Gen kháng 16S rRNA methylase là gen kháng mắ phải quan trọng của aminoglycosid trong thời gian gần đây. Gen KKS nằm trên plasmid đầu tiên kháng aminoglycosid là *armA*. Năm gen methylase tiếp theo được báo cáo là *npmA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, and *rmtD*. Cơ chế kháng aminoglycosid thường gặp là sự biến đổi của enzym. Những gen mã hóa các enzyme này được phân thành ba lớp chính tùy theo enzym biến đổi: AAC (acetyltransferase), ANT (nucleotidyltransferase hoặc adenytransferase), APH (phosphotransferase).

Có bốn loại acetyltransferase: AAC (1), AAC (2), AAC (3) và AAC (6); năm nucleotidyltransferase: ANT (2), ANT (3), ANT (4), ANT (6), và ANT (9) và bảy phosphotransferase: APH (2), APH (3), APH (3), APH (4), APH (6), APH (7) và APH (9) [100].

### - Chloramphenicol

Chloramphenicol là kháng sinh phổ rộng tác dụng trên cả gram âm, gram dương và vi khuẩn kỵ khí. Các chất tương tự chloramphenicol bao gồm các florfenicol dẫn xuất flo có phổ tương tự.

Cơ chế đầu tiên và vẫn thường gặp nhất của vi khuẩn kháng chloramphenicol là bất hoạt enzym bằng cách acetyl hóa thuốc thông qua các loại chloramphenicol acetyltransferase khác nhau (CAT). CAT có thể làm bất hoạt chloramphenicol cũng như thiamphenicol và azidamfenicol. Có 2 loại CAT được xác định là *catA* và *catB* [85].

Bên cạnh vi khuẩn kháng chloramphenicol còn do bất hoạt bởi phosphotransferase, đột biến của vị trí đích, hàng rào thấm và hệ thống bơm đẩy. Các gen *cmlA* và *floR* là phổ biến nhất được biết đến. Sự hiện diện của gen *cmlA* sẽ dẫn đến kháng với chloramphenicol, nhưng nhạy cảm với florfenicol. Ngược lại, *floR* sẽ tạo ra một chủng kháng với florfenicol [85].

- *Glycopeptid*

Vancomycin và teicoplanin là hai thuốc thuộc nhóm glycopeptid đang được sử dụng trong lâm sàng hiện nay để điều trị các nhiễm trùng do vi khuẩn gram dương. Vancomycin là một trong số ít kháng sinh có tỷ lệ kháng kháng sinh trên lâm sàng còn thấp. Những năm 80 mới ghi nhận trường hợp đầu tiên kháng glycopeptid. Có 6 nhóm gen kháng Vancomycin được ghi nhận là: *vanA* và *vanB* nằm trên plasmid và hoặc NST, *vanC1*, *vanC2/3*, *vanD*, *vanE*, và *vanG* chỉ nằm trên nhiễm sắc thể. Các gen này kháng vancomycin do sản xuất các peptidoglycan bị biến đổi làm ức chế tạo vách của vi khuẩn [100].

- *Quinolone*

Các kháng sinh nhóm quinolone có phổ kháng khuẩn rộng trên cả vi khuẩn gram âm và một số vi khuẩn gram dương. Quinolone ức chế hoạt động của enzym ADN gyrase (gồm 2 tiểu đơn vị do 2 gen *gyrA* và *gyrB* mã hóa) và topoisomerase IV (gồm 2 tiểu đơn vị 2A và 2B do 2 gen *parC* và *parE* mã hóa), bốn gen mã hóa này chính là đích của các đột biến kháng quinolon của vi khuẩn.

Các gen kháng quinolon thường nằm trên nhiễm sắc thể, là kết quả của giảm tính thấm màng ngoài có liên quan tới mất kênh porin, tăng hoạt động của bơm đẩy hoặc đột biến enzym đích ADN gyrase và topoisomerase IV[52]. Thời gian gần đây có một số gen kháng quinolone nằm trên plasmid đã được ghi nhận như: *qnr* (*qnr A,B,C,D,S*), *aac(6)-Ib*, *qepA* [100].

- *Sulfonamid và trimethoprim*

Kháng sinh điển hình trong nhóm sulfonamid là sulfamethoxazole được kết hợp với trimethoprim (thường gọi co-trimoxazole) có tác dụng hiệp đồng với kháng sinh khác để làm giảm kháng thuốc.

Kháng sinh sulfonamid xuất hiện từ rất sớm với gen kháng đột biến nằm trên nhiễm sắc thể là *folP*. Vào những năm 80, các gen kháng nằm trên plasmid đã được tìm thấy bao gồm: *sul1*, *sul2* và *sul3* [100].

Gen đột biến kháng trimethoprim nằm trên nhiễm sắc thể là *folA* thường là ở mức thấp. Đột biến mức cao của các gen trên nằm trên plasmid DHFRs bao gồm các họ gen khác nhau như: *dfrA* (bao gồm >30 gen), *dfrB* (bao gồm 8 gen), *dfrK* [100].

- *Nhóm polypeptid*: Kháng sinh thường dùng trên lâm sàng là polymyxin B và colistin (Polymycin E). Các gen kháng kháng sinh kháng polymyxin đã được tìm thấy ở các loại vi khuẩn khác nhau như *lpxA*, *lpxC* or *lpxD* là các gen được tìm thấy ở *A. baumannii*. Gần đây nhất là các gen họ *mcr*- (từ *mcr-1* đến *mcr-10*) nằm trên plasmid kháng colistin [65]

**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-lactam</i></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><i>Aminoglycosid</i></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 enzym biến đổi: AAC (acetyltransferase), ANT (nucleotidyltransferase hoặc adenytransferase), APH (phosphotransferase)
<b><i>Chloramphenicol</i></b>	CAT: <i>catA</i> và <i>catB</i> . <i>cmlA</i> và <i>floR</i>
<b><i>Glycopeptid</i></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><i>Quinolon</i></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><i>Sulfonamid và trimethoprim</i></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><i>Polymycin</i></b>	<i>lpxA</i> , <i>lpxC</i> or <i>lpxD</i> <i>mcr-1</i> đến <i>mcr-10</i>

Như vậy các gen kháng kháng sinh của các nhóm kháng sinh hiện nay rất đa dạng bao gồm cả các gen nằm trên nhiễm sắc thể và trên plasmid. Đặc biệt các gen nằm trên plasmid đóng vai trò lớn trong việc gia tăng nhanh chóng tốc độ lan truyền các gen kháng kháng sinh trong quần thể vi khuẩn do tính chất có thể lây truyền qua các hai con đường là lan truyền dọc giữa các vi khuẩn cùng loài và lan truyền ngang từ loài vi khuẩn này sang vi khuẩn khác. Chính vì vậy việc xác định các gen kháng kháng sinh và cách thức lan truyền của các gen này đóng vai trò rất quan trọng trong việc kiểm soát sự lan truyền kháng kháng sinh hiện nay.

#### ***1.1.4. Các nguyên nhân gây gia tăng và lan truyền các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh***

Tốc độ gia tăng vi khuẩn kháng kháng sinh một cách nhanh chóng trên thế giới cũng như tại Việt Nam đã đe dọa hiệu quả điều trị của kháng sinh và sẽ làm gia tăng gánh nặng của các bệnh truyền nhiễm. Có nhiều nguyên nhân dẫn tới sự gia tăng và lan truyền các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh. Chúng ta có thể khái quát các yếu tố nguy cơ liên quan đến tình trạng kháng thuốc như sau.

##### ***1.1.4.1. Lạm dụng sử dụng kháng sinh***

###### ***\* Lạm dụng sử dụng kháng sinh trong cộng đồng***

Ở hầu hết các quốc gia đang phát triển kháng sinh có thể mua mà không cần đơn thuốc, các loại kháng sinh sẵn có ở khắp nơi từ các bệnh viện, hiệu thuốc, cửa hiệu, thậm chí người bán hàng rong. Nghiên cứu sử dụng kháng sinh không đúng tại cộng đồng cho thấy việc sử dụng kháng sinh để tự điều trị có tỉ lệ rất cao ở các nước đang phát triển như tại Việt Nam (55,2% kháng sinh sử dụng không kê đơn), tại Bangladesh (45,7%) %, tại Grana (36,1%) [125]

Thiếu kiến thức về sử dụng kháng sinh như quên không uống thuốc, dùng kháng sinh khi thể trạng cảm thấy tốt hơn, dùng kháng sinh khi không bị nhiễm khuẩn hoặc khi không có khả năng chi trả cho một đợt điều trị đầy đủ trước khi vi khuẩn bị tiêu diệt hoàn toàn [52].

###### ***\* Sử dụng kháng sinh trong bệnh viện***

Nhiễm khuẩn bệnh viện là yếu tố quan trọng liên quan đến tính kháng kháng sinh của vi khuẩn trên thế giới tạo điều kiện thuận lợi cho sự lây lan của các chủng

vi khuẩn kháng kháng sinh không chỉ trong bệnh viện mà còn có nguy cơ lây lan ra ngoài cộng đồng [41]. Việc quản lý chất thải bệnh viện cũng là vấn đề đáng lưu ý, một số nghiên cứu được tiến hành ở các bệnh viện tại Việt nam cho thấy: nước thải của bệnh viện không qua xử lý được thải trực tiếp ra công sinh hoạt, đồng ruộng và sông ngòi. Thiếu nước cho công tác vệ sinh và rác thải sinh hoạt được thải ra ở gần nguồn nước, điều này sẽ làm tăng nguy cơ lây lan các tác nhân gây bệnh trong đó có các vi khuẩn kháng kháng sinh ra ngoài cộng đồng [7].

*\* Do sử dụng kháng sinh không hợp lý*

Khi sử dụng kháng sinh sẽ tạo ra áp lực chọn lọc cho vi khuẩn kháng thuốc. Sử dụng kháng sinh không hợp lý và thường xuyên sẽ làm tăng nguy cơ kháng kháng sinh của vi khuẩn. Đối với thầy thuốc việc sử dụng kháng sinh theo kinh nghiệm, liều cao, kéo dài và phần lớn không dựa vào các kết quả xét nghiệm xảy ra phổ biến ở các quốc gia đang phát triển. Thầy thuốc phải chịu áp lực khi kê đơn thuốc theo yêu cầu của bệnh nhân ngay cả khi không có chỉ định điều trị bằng kháng sinh. Ở một số quốc gia, nhiều người tin rằng sử dụng kháng sinh theo đường tiêm có tác dụng tốt hơn so với đường uống, điều này đã dẫn đến tình trạng gia tăng việc sử dụng các loại kháng sinh phổ rộng bằng đường tiêm trong khi chỉ cần điều trị bằng đường uống với các kháng sinh thông thường [23, 44, 74, 77].

*1.1.4.2. Sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi*

Việc sử dụng kháng sinh không đúng ở người làm tăng khả năng kháng kháng sinh đã rất rõ ràng. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh ở động vật và ảnh hưởng của nó làm tăng tỷ lệ kháng kháng sinh cũng đã được xem xét một cách tỉ mỉ. Có rất nhiều câu hỏi khó được đưa ra cần giải quyết xung quanh việc đánh giá mối liên quan về sự lây truyền các vi khuẩn kháng kháng sinh thông qua chuỗi thức ăn như: làm thế nào để đánh giá được tỷ lệ kháng kháng sinh từ người bắt nguồn từ động vật? Kháng kháng sinh được lây truyền giữa người và động vật thế nào?

Việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi tác động vào tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn. Tại Bắc Mỹ và Châu Âu, khoảng 50% lượng kháng sinh sản xuất

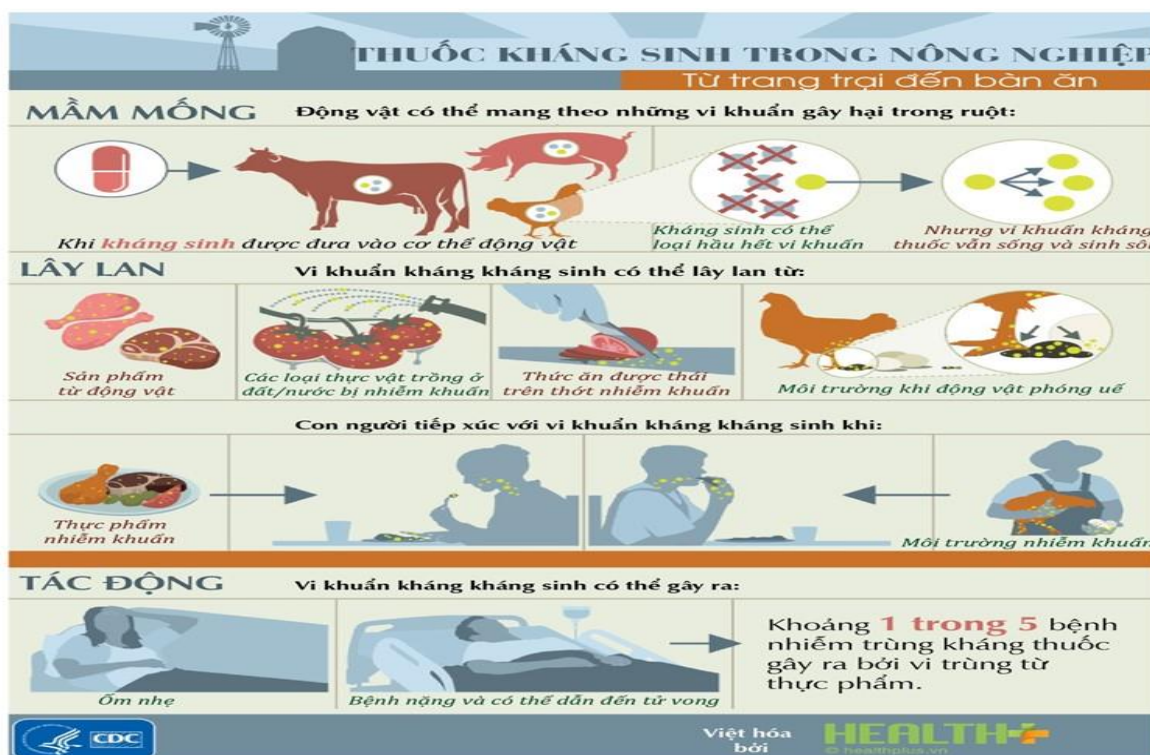
ra được sử dụng trong thức ăn cho gia súc và gia cầm. Phần lớn lượng kháng sinh này được sử dụng như là hoạt chất phụ trợ trong thức ăn để phòng bệnh và tăng trọng bất chấp tình trạng sức khỏe của gia súc và gia cầm sẽ làm tăng tình trạng kháng kháng sinh của các vi khuẩn như *Salmonella*, *E. coli*... và thông qua thực phẩm sẽ gây bệnh trên người. Tại Đan Mạch, năm 1994 trong khi chỉ có 24kg vancomycin được sử dụng trên người thì có tới 24.000 kg apoparcin (biệt dược của vancomycin) được sử dụng cho chăn nuôi. Vancomycin được cho là nguyên nhân tạo ra các chủng *Enterococcus faecium* kháng vancomycin và các chủng vi khuẩn này được phát hiện trên người do ăn phải các sản phẩm thịt bị ô nhiễm. Khi apoparcin bị cấm sử dụng tại Đan Mạch năm 1995, Đức năm 1996 và toàn liên minh châu Âu năm 1997 thì tỷ lệ *Enterococcus faecium* kháng vancomycin phân lập trên người giảm rõ rệt, điều này cho thấy có thể không chế được sự gia tăng của vi khuẩn kháng thuốc thông qua việc sử dụng kháng sinh [109, 110]. Như vậy, vấn đề kháng kháng sinh không chỉ lây truyền từ người sang người, từ động vật sang động vật mà kháng kháng sinh liên quan đến “hệ sinh thái” bao gồm động vật-thức ăn-môi trường-con người. Các gen đề kháng kháng sinh của vi khuẩn tồn tại trong nhiều môi trường khác nhau. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng kháng kháng sinh từ động vật có khả năng có nguồn gốc từ người và ngược lại, có những dữ liệu về khả năng kháng kháng sinh từ động vật sang người. Việc lây lan này thông qua “chuỗi thức ăn” (hình 1.4), tuy nhiên, rất khó đánh giá được mức độ lây lan của nó [40, 87, 106]

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. Kháng sinh dùng cho động vật không đúng cách sẽ thúc đẩy sự phát triển của các vi khuẩn kháng thuốc. Ngoài ra, nếu thịt động vật đến tay người tiêu dùng khi chưa đủ thời gian tiêu tan lượng kháng sinh tồn dư, chính cơ thể người ăn sẽ hấp thụ lượng kháng sinh này.

Theo Dương Thị Toan và cộng sự, cho thấy trong 20 trang trại chăn nuôi được điều tra tại tỉnh Bắc Giang, 100% trang trại sử dụng kháng sinh để phòng, điều trị bệnh, 17 loại kháng sinh được sử dụng trong đó có 6 loại sử dụng nhiều nhất trong chăn nuôi

thịt lợn là Norfloxacin (60,0%), Tylosin (60,0%), Gentamycin (55,0%), Colistin (45,0%), Enrofloxacin (40,0%), Streptomycin (35,0%). Việc sử dụng kháng sinh cho vật nuôi ở các trang trại chăn nuôi chưa được quản lý chặt và không hợp lý. Có 50% mẫu thức ăn chăn nuôi lợn thịt, gà thịt phát hiện thấy ít nhất một trong số các loại kháng sinh Tylosin (20 -30%), Sulfadiazine (30 - 40%), Chlortetracycline (20-30%), Doxycycline (0 - 30%) và Sulfamethazine (10 - 20%) [2].

Nghiên cứu của Phạm Kim Đăng và cộng sự tại Hải Phòng cho thấy kháng sinh được sử dụng phổ biến trong chăn nuôi gà trên địa bàn Hải Phòng ở tất cả các loại gà và hình thức nuôi, không chỉ để phòng trị bệnh mà còn dùng ở liều thấp để kích thích sinh trưởng. Nhận thức của người chăn nuôi còn thấp cùng với việc quản lý hành chính về sản xuất kinh doanh và sử dụng còn hạn chế nên tỷ lệ hộ có nhận thức đúng và sử dụng an toàn còn rất thấp [10].



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

(nguồn: <http://healthplus.vn>)

#### 1.1.4.3. Một số các nguyên nhân khác

- *Chất lượng kháng sinh kém*

Khi bảo quản nhiệt độ  $>25^{\circ}\text{C}$  sẽ giảm hoạt tính kháng sinh, kháng sinh quá hạn sử dụng, hàm lượng thấp không những không thể tiêu diệt được hoàn toàn vi khuẩn gây bệnh mà còn tạo điều kiện cho vi khuẩn kháng lại kháng sinh [94]. Ngoài ra một số kháng sinh được bán tại các nước đang phát triển không chứa đủ hàm lượng như đã ghi trên nhãn thuốc, thành phần chủ yếu trong các loại thuốc giả này thường là bột mỳ. Nhiều nghiên cứu cho thấy có khoảng 65% trong tổng số 751 hoạt chất đã được làm giả tại hơn 28 quốc gia trên thế giới được ghi nhận [63].

- *Gia tăng sự đi lại quốc tế*

Sự phát triển kinh tế, xã hội và phát triển du lịch sẽ dẫn tới gia tăng đi lại giữa các quốc gia. Chính vì vậy làm lây lan các chủng vi khuẩn kháng thuốc từ 1 quốc gia sang các quốc gia khác trên thế giới qua đường hàng không. Ví dụ: vi khuẩn kháng carbapenem mang gen NDM-1 tại Anh có nguồn gốc từ Ấn Độ [55].

- *Hệ thống giám sát kháng sinh*

Tại các quốc gia phát triển đã xây dựng được hệ thống giám sát kháng sinh như Mỹ và liên minh châu Âu chuẩn thức, qua hệ thống này các thông tin về mức độ, xu hướng và phát hiện được các trường hợp kháng thuốc mới của vi khuẩn sẽ được sử dụng để phân tích và đánh giá qua đó sẽ giúp cho các thầy thuốc và các nhà quản lý đưa ra các chính sách phù hợp để ngăn chặn sự gia tăng của vi khuẩn kháng kháng sinh. Tuy nhiên, hiện nay hầu hết tại các quốc gia đang phát triển, các số liệu về tình hình kháng kháng sinh của vi khuẩn chủ yếu dựa vào các báo cáo từ các bệnh viện, và các kết quả từ các hoạt động nghiên cứu. Các số liệu này không thể phản ánh được đầy đủ thực trạng kháng kháng sinh của một quốc gia và không thể sử dụng để so sánh với nhau do chưa có sự thống nhất từ việc lựa chọn cỡ mẫu, phương pháp xét nghiệm phát hiện vi khuẩn kháng kháng sinh.

#### 1.1.5. Colistin

Colistin (polymyxin E) là một hỗn hợp các chuỗi polypeptide colistin A và B, được phân lập lần đầu tiên tại Nhật Bản vào năm 1949 từ sự lên men của *Bacillus*



*polymyxa var. colistinus* – các chủng vi khuẩn tìm thấy trong mẫu đất của tỉnh Fukushima [22]

Kể từ khi bắt đầu được đưa vào sử dụng trên lâm sàng năm 1959, colistin được dùng để điều trị các nhiễm khuẩn do vi khuẩn gram âm gây ra nhưng do những tác dụng không mong muốn của nó bao gồm cả độc tính trên thận và thần kinh, dần dần thuốc đã bị thay thế bởi kháng sinh aminoglycosid. Kết quả là việc sử dụng colistin trên lâm sàng đã giảm từ đầu những năm 1970 đến đầu những năm 2000 [57].

Tuy nhiên do sự gia tăng của các vi khuẩn gram âm đa kháng thuốc như *P. aeruginosa*, *A. baumannii* và *K. pneumonia*, đặc biệt là sự xuất hiện của các chủng vi khuẩn siêu kháng thuốc mang gen NDM-1, colistin đã được sử dụng trở lại như một **“lựa chọn tối ưu”** cho các trường hợp vi khuẩn kháng carbapenem mang gen NDM-1 kháng lại toàn bộ các kháng sinh khác.

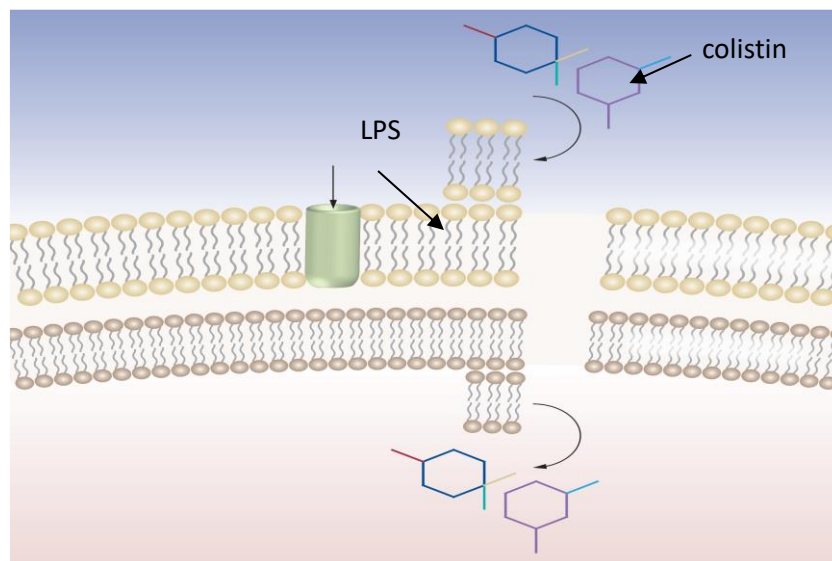
Tại sao colistin sử dụng trở lại như một **“lựa chọn tối ưu”** cho mọi trường hợp nhiễm khuẩn gram âm kháng toàn bộ các kháng sinh khác? Có thể là do colistin dùng sử dụng một thời gian dài trên người, không được kê đơn hàng loạt như những loại kháng sinh thông thường khác nên nó vẫn bảo toàn được hiệu quả trong trường hợp nhiễm khuẩn gram âm nặng. Do đó colistin vẫn luôn là bức tường thành vững chắc chống lại vi khuẩn và giữ được mức hiệu quả điều trị trên người. Trong vài năm trở lại đây, những gen đề kháng liên tục xuất hiện thách thức những nhà khoa học. Trong đó nổi trội nhất phải kể đến NDM-1, OXA và KPC. Những gen đề kháng này khiến vi khuẩn trở nên bất trị đối với carbapenems – dòng kháng sinh được coi là **“lựa chọn ưu tiên”** trong điều trị những ca nhiễm khuẩn do các vi khuẩn gram âm như *E. coli*, *Klebsilla. spp*, *Acinetobacter. spp*. Và để đối phó với những dòng vi khuẩn kháng carbapenem, colistin trở thành thuốc kháng sinh duy nhất còn lại để đối phó với tình trạng kháng thuốc nghiêm trọng này.

#### 1.1.5.1. Cơ chế tác dụng

Các polymyxin có tác dụng diệt khuẩn ngay cả với tế bào ở trạng thái nghỉ, thuốc làm thay đổi tính thấm thấu chọn lọc của màng tế bào.

Màng tế bào vi khuẩn là vị trí tác dụng ban đầu của colistin. Bằng cách liên kết với lipopolysaccharid (LPS) và phospholipid ở màng ngoài tế bào vi khuẩn gram âm, colistin có thể diệt khuẩn với nhiều cơ chế hoạt động khác nhau.  $\text{Ca}^{2+}$  và  $\text{Mg}^{2+}$  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 [12].

Một số báo cáo lại chỉ ra rằng polymyxin tác dụng thông qua một cơ chế khác hơn là việc tác động lên màng tế bào vi khuẩn. Do vậy, cơ chế chính xác colistin diệt vi khuẩn như thế nào vẫn chưa được sáng tỏ [22].



**Hình 1.5: Cơ chế tác dụng của colistin trên màng vi khuẩn gram âm**

#### 1.1.5.2. Phổ tác dụng của colistin

Thuốc kháng lại hầu hết các trực khuẩn hiếu khí Gram (-), bao gồm *Acinobacter* (MIC = 0,25 – 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), *P. aeruginosa*, *Klebsiella. spp*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Morganella morganii* và *Haemophilus influenzae*. Phần lớn các loại vi khuẩn nhạy cảm có MIC từ 0,01 đến 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Đối với các chủng *P. aeruginosa* nhạy cảm với thuốc, nồng độ có tác dụng thường thấp hơn 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$  [13].

Vi khuẩn kháng tự nhiên với colistin: Vi khuẩn Gram dương, cầu khuẩn Gram âm, *Proteus*, *Providencia*, *Mycobacteria* và vi khuẩn kỵ khí. Colistin có tác dụng tại phổi chỉ giới hạn ở các vi khuẩn Gram âm: *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella*[12], *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Haemophilus*, *Bordetella pertussis*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*.

#### 1.1.5.3. Sự đề kháng với colistin

Vi khuẩn gram âm có thể hình thành sự đề kháng với colistin thông qua cơ chế đột biến hoặc thích nghi. Sự đột biến là di truyền, ở mức độ thấp và không phụ thuộc vào sự có mặt liên tục của kháng sinh trong khi đó sự thích nghi thì ngược lại. Hầu hết có sự đề kháng chéo hoàn toàn giữa colistin và polymycin B [42, 67, 68].

Những nghiên cứu về sự đề kháng với polymycin của chủng *P. aeruginosa* đã đặt ra giả thuyết rằng sự thay đổi của màng ngoài tế bào vi khuẩn (sự thay đổi trong LPS, thay đổi nồng độ protein đặc hiệu màng ngoài, sự thay đổi thành phần  $Mg^{2+}$  và  $Ca^{2+}$  vỏ tế bào và sự thay đổi lipid) có liên quan đến sự hình thành đề kháng ở vi khuẩn [68, 42, 55]. Ngoài ra, một nghiên cứu gần đây trên loài *Yersinia* đã chỉ ra rằng một hệ thống bơm Kali ra ngoài bào có thể có liên quan đến sự đề kháng đối với polymycin B [20]. Mặc dù sự đề kháng qua cơ chế enzym của vi khuẩn đối với colistin chưa được báo cáo, nhưng cần chú ý rằng *B. polymyxa* phân loài *Colistinus* tạo ra colistinase gây bất hoạt colistin [51]

#### 1.1.5.4. Tình hình sử dụng colistin

Colistin từ những năm 1970 đã bị cấm sử dụng trên người do có độc tính cao trên thận, nhưng do tác dụng tốt trên các chủng vi khuẩn gram âm nên colistin được sử dụng nhiều trong chăn nuôi để phòng bệnh, điều trị ngoài ra còn được sử dụng với mục đích tăng trưởng. Từ năm 2000, do có tác dụng tốt trên các vi khuẩn gram âm nên nó được sử dụng trở lại trên lâm sàng cho những trường hợp nhiễm trùng do vi khuẩn gram âm đa kháng.

##### - Sử dụng colistin trong chăn nuôi

Ở Mỹ, colistin ở dạng tiêm natri colistimethat đã được phê duyệt để sử dụng ở gà năm 1998. Tại Canada, colistin không được phê chuẩn cho thuốc thú y. Tuy

nhiên, một lỗ hổng trong quy định để tạo cơ hội cho "tự nhập khẩu để sử dụng", nghĩa là nông dân có thể nhập khẩu và sử dụng - không cần giấy phép, không cần kê đơn thuốc kháng sinh sử dụng cho động vật của họ. Vì vậy, việc sử dụng trong sản xuất thịt lợn đã được khảo sát và phát hiện bởi các bác sỹ thú y (liều, thời gian thu hồi). Trong khối cộng đồng chung Châu Âu (EU), các sản phẩm chứa colistin được phép sử dụng trong động vật, thực phẩm ở EU kể từ những năm 1950. Colistin được sử dụng chủ yếu bằng đường uống trong sản xuất thực phẩm để giảm bớt và ngăn ngừa vi khuẩn gram âm gây nhiễm khuẩn đường tiêu hóa. Việc sử dụng như vậy phần lớn được báo cáo từ lợn, gia cầm, gia súc, cừu, dê và thỏ. Tuy nhiên, colistin cũng được sử dụng trong chăn nuôi gà mái và sản xuất sữa gia súc, cừu và dê. Colistin cũng được báo cáo là được sử dụng trong sản xuất động thực vật ở Châu Á. Tại Trung Quốc, xấp xỉ 90% trong số 17,5 triệu tấn colistin sản xuất vào năm 2014 được báo cáo là tiêu thụ bởi các ngành nông nghiệp. Như vậy, Trung Quốc có thể là đại diện lớn nhất sản xuất và người tiêu dùng colistin trên thế giới. Để so sánh, một tổng cộng 545,2 tấn nguyên liệu polymyxin đang hoạt động - bao gồm colistin và polymyxin B - được tiêu thụ trong thực phẩm dành cho động vật, chủ yếu ở gia cầm và heo, ở 22 nước châu Âu trong năm 2012. Năm 2013, các polymyxins được ước tính là nhóm kháng sinh phổ biến nhất thứ năm (7%) dùng làm thực phẩm động vật trên khắp EU. Tiêu thụ colistin ở động vật rất đa dạng, dao động từ < 0,2 tấn Slovenia, Thụy Điển, Ailen, và Luxembourg tới > 100 tấn Đức, Ý và Tây Ban Nha. Trong một báo cáo khác, việc sử dụng colistin hàng năm ở động vật ở châu Âu dao động từ 0 mg (Phần Lan, Iceland, và Na Uy) đến hơn 20 mg (Ý và Tây Ban Nha) trên một kg động vật sinh khối [108]. Colistin đã bị lạm dụng quá nhiều trong chăn nuôi. Điều này khiến cho việc lan truyền gen đề kháng từ động vật sang người bị mất kiểm soát và không được chú ý. Sự phát triển của siêu vi khuẩn có khả năng đề kháng tất cả các loại kháng sinh là hậu quả tất yếu xảy ra.

Tại Việt Nam, việc kiểm soát lượng thuốc kháng sinh sử dụng trong chăn nuôi cũng chưa chặt chẽ. Nghiên cứu của Nguyễn T Nhung và cộng sự khi điều tra ở 12 trang trại chăn nuôi lợn và gà tại các giai đoạn chính của sản xuất tại Tiền Giang, Việt Nam cho thấy các chất kháng sinh được sử dụng để sản xuất 1 kg thịt gà và lợn

tương ứng với trung bình 94,7 mg và 563,6 mg kháng sinh được sử dụng để sản xuất 1 kg thịt gà và thịt lợn. Trung bình của 3 (trong số 8) kháng sinh quan trọng đã được sử dụng trên trang trại lợn. Phân lập *E. coli* có tỷ lệ kháng ampicillin cao (97,8% và 94,4% đối với gà và lợn), ciprofloxacin (73,3% và 21,1%), gentamicin (42,2% và 35,6%), colistin (22,2% và 24,4%). Sự phổ biến của một gen kháng colistin đã phát hiện gần đây, *mcr-1*, là 19 đến 22% [8]. Theo nghiên cứu của Dương Thị Toan và cộng sự (2014) tại 20 trang trại chăn nuôi lợn thịt và 20 trại chăn nuôi gà thịt tập trung trên địa bàn tỉnh Bắc Giang cho thấy: việc sử dụng kháng sinh cho vật nuôi ở các trang trại chăn nuôi chưa được quản lý chặt và không hợp lý; việc lựa chọn loại kháng sinh, quyết định liều lượng kháng sinh trong phòng và trị bệnh, thời gian ngừng thuốc trước khi xuất chuồng và phối hợp kháng sinh chủ yếu dựa vào khuyến cáo của các công ty sản xuất thuốc và kinh nghiệm của người chăn nuôi. Có trên 17 loại kháng sinh được sử dụng trong các trang trại chăn nuôi, các loại kháng sinh được sử dụng phổ biến là Norfloxacin (60,0%), Tylosin (60,0%), Gentamicin (55,0%), Doxycycline (55,0%), Tiamulin (50,0%), Colistin (45,0%) và Enrofloxacin (40,0%) [2]. Kết quả nghiên cứu của Phạm Kim Đăng và cộng sự trên địa bàn Hải Phòng cho thấy: người chăn nuôi ở Hải Phòng sử dụng ít nhất 38 loại kháng sinh thuộc hơn 10 nhóm khác nhau, không chỉ để phòng trị bệnh mà còn dùng ở liều thấp để kích thích sinh trưởng. Ít nhất 8 loại kháng sinh (chlortetracycline, oxytetracycline, maduramycin, monensin, salinomycin, bambamycin, bacitracin methylene-disalicylate (BMD) và colistin) được sử dụng ở liều thấp để kích thích sinh trưởng bằng cách trộn trong thức ăn công nghiệp hoặc người chăn nuôi tự trộn. Trong số đó, hai kháng sinh salinomycin (31 hộ sử dụng) và chlortetracycline (29 hộ sử dụng) được sử dụng nhiều nhất. Đối chiếu qui chuẩn quốc gia số QCVN01-10:2009 (Bộ NN&PTNT, 2009) qui định về hàm lượng kháng sinh, hóa dược tối đa cho phép trong thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh cho gà, trên địa bàn Hải Phòng các hộ chăn nuôi đã sử dụng bất hợp pháp ba kháng sinh maduramycin, bambamycin và colistin. Các kháng sinh được sử dụng phòng bệnh với tần suất sử dụng cao hơn so với số kháng sinh dùng trong điều trị. Kháng sinh các nhóm: sulfonamid,  $\beta$ -lactams, tetracyclin, aminoglycosid và colistin là các thuốc chủ yếu được sử dụng phòng bệnh cho gà [10].

- *Sử dụng colistin trong lâm sàng*

Từ những năm 70, colistin đã bị cấm sử dụng trên người do có nhiều độc tính trên thận và thần kinh. Tuy nhiên do sự xuất hiện ngày càng nhiều của các chủng vi khuẩn gram âm đa kháng, colistin đã tái xuất hiện từ năm 2010 như là một lựa chọn điều trị cuối cùng điều trị để điều trị nhiễm trùng nặng như viêm phổi thở máy do các vi khuẩn đa kháng thuốc như *P. aeruginosa* và *A. baumannii* kháng carbapenem (mang gen NDM-1) đặc biệt là những bệnh nhân nằm tại các trung tâm chăm sóc đặc biệt [29]

Trong thời gian gần đây, lượng tiêu thụ colistin và các chế phẩm thuộc nhóm polymyxin ở người rất lớn. Ước tính khoảng 0,8 tấn chứa thành phẩm của polymyxin - bao gồm colistin và polymyxin B- đã được tiêu thụ bởi con người ở 22 nước châu Âu trong năm 2012 [17]. Năm 2015, lượng tiêu thụ polymyxin ở người ở châu Âu là 0,015 liều lượng định kỳ hàng ngày (DDD) trên 1000 dân, năm 2014 là 0,012 (DDD) trên 1.000 dân cư tăng 50%, từ 0,008 DDD mỗi 1.000 cư dân được báo cáo vào năm 2010. Các quốc gia báo cáo cao nhất việc sử dụng polymyxin ở người bao gồm Hy Lạp, Ý và Slovakia (0,095, 0,025 và 0,025 liều định kỳ hàng ngày trên 1.000 người) [14, 15]

Tại Việt Nam, cũng trong tình trạng chung của thế giới, colistin đã được đưa vào sử dụng tại bệnh viện Bạch Mai và bệnh viện Nhiệt đới Trung ương từ tháng 8 năm 2011, tuy nhiên chưa có số liệu công bố cụ thể về lượng tiêu thụ colistin trên người trong các bệnh viện cũng như trong cộng đồng tại Việt Nam [3]

## **1.2. Vi khuẩn gram âm đường ruột và thực trạng kháng kháng sinh của các vi khuẩn gram âm đường ruột**

### **1.2.1. Vi khuẩn gram âm đường ruột**

Vi khuẩn gram âm đường ruột là các loài thuộc họ *Enterobacteriaceae* đều có hình que, chiều dài điển hình từ 1 µm đến 5 µm. Chúng là những trực khuẩn gram âm hiếu kỵ khí tùy tiện, không lên men oxidase, lên men đường glucose, có thể di động hoặc không di động. Các loài gây bệnh thường gặp ở người gồm: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella* và *Shigella*. Trong số các

loài vi khuẩn gây bệnh trên thì *E. coli* là loại trực khuẩn đường ruột đặc biệt vì *E. coli* là loại vi khuẩn lý sinh trên đường tiêu hóa của người và động vật, là loài phổ biến nhất trong nhóm vi khuẩn ái khí của đường tiêu hóa, mang nhiều lợi ích nhưng cũng có nhiều tác hại đối với con người.

### **1.2.2. Thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn gram âm đường ruột hiện nay**

Thực trạng kháng kháng sinh của các vi khuẩn gram âm đường ruột nhất là đối với họ kháng sinh  $\beta$ - lactam đang tăng lên rất rõ rệt do sự có các nhóm gen di động mã hóa các enzym làm biến đổi hiệu quả của thuốc. Dưới áp lực chọn lọc, đặc tính kháng kháng sinh các vi khuẩn này đã có sự thay đổi từ đề kháng tự nhiên như bơm đẩy, giảm tính thấm màng sang cơ chế đề kháng thông qua các gen di động, lây truyền ngang, ngày càng lan rộng về mặt dịch tễ đối với các vi khuẩn *E. coli* và *K. pneumoniae* – nguyên nhân chính gây nhiễm trùng huyết hiện nay. Những ổ vi khuẩn chứa gen chuyển kháng kháng sinh thường khó quan sát sự thay đổi về kiểu hình nên việc theo dõi và kiểm soát sự đề kháng carbapenem lại đặc biệt trở nên khó khăn đối với họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* [48].

Vi khuẩn gram âm đường ruột có thể gây ra các nhiễm trùng nặng (nhiễm khuẩn huyết) và một số vi khuẩn quan trọng nhất trong họ này đang ngày càng trở nên đề kháng với các kháng sinh có sẵn hiện nay như xuất hiện các chủng vi khuẩn sinh ESBL [81], sau đó hàng loạt các gen kháng kháng sinh mã hóa các enzym kháng carbapenem (CRE)- kháng sinh được coi là “*nhóm lựa chọn ưu tiên*” điều trị các nhiễm khuẩn gram âm đường ruột, được phát hiện như KPC, OXA-48, NDM-1...

Gần đây nhất là sự xuất hiện các chủng vi khuẩn mang gen *mcr-1* kháng colistin- kháng sinh thuộc “**nhóm lựa chọn cuối cùng**” cho các nhiễm khuẩn gram âm kháng hầu hết các kháng sinh khác [57]

Các chủng vi khuẩn gram âm đường ruột kháng kháng sinh không chỉ xuất hiện nhiều trong môi trường bệnh viện mà còn cả trong môi trường sống và thức ăn hàng ngày [18].

### 1.3. Đặc điểm vi sinh vật học và tình hình kháng colistin của *E. coli*

#### 1.3.1. Đặc điểm vi sinh vật học [1]

Họ *Escherichia* do Escherich phát hiện lần đầu tiên năm 1885. Họ *Escherichia* được chọn là đại biểu điển hình của họ vi khuẩn đường ruột bao gồm nhiều loài như *E. coli*, *E. adecarboxylase*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* và *E. vulneris*. Trong số đó, *E. coli* có vai trò quan trọng nhất và được chọn là loài điển hình của họ *Escherichia*.

- *Hình thái*

*E. coli* là trực khuẩn Gram (-). Kích thước trung bình 2 đến 3  $\mu\text{m}$  X 0,5  $\mu\text{m}$ ; trong những điều kiện không thích hợp (ví dụ trong môi trường có kháng sinh) vi khuẩn có thể rất dài như sợi chỉ. Rất ít chủng *E. coli* có vỏ, nhưng hầu hết có lông và có khả năng di động.

- *Tính chất nuôi cấy*

*E. coli* phát triển dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy thông thường. Một số có thể phát triển trên môi trường tổng hợp rất nghèo chất dinh dưỡng. Hiếu kỵ, khí tùy tiện. Có thể phát triển ở nhiệt độ từ 5 – 40°C. Cấy vào môi trường lỏng (như canh thang) sau 3 – 4 giờ đã làm đục nhẹ môi trường, sau 24 giờ làm đục đều; sau hai ngày trên mặt môi trường có váng mỏng, những ngày sau dưới đáy ống có thể thấy cặn.

Trên môi trường thạch thường, sau khoảng 8 – 10 giờ, dùng kính lúp đã có thể quan sát được khuẩn lạc. Sau 24 giờ khuẩn lạc khoảng 1,5 mm. Hình thái khuẩn lạc điển hình dạng II nhưng cũng có thể gặp dạng R, hoặc M.

- *Tính chất hoá sinh*

*E. coli* có khả năng lên men nhiều loại đường và có sinh hơi. Tất cả *E. coli* đều lên men lactose và sinh hơi trừ ngoại lệ *E. coli* loại EIEC.

*E. coli* có khả năng sinh indol, không sinh H<sub>2</sub>S. Không sử dụng được nguồn carbon của citrat trong môi trường Simmons. Có decarboxylase vì vậy có khả năng khử carboxyl của lysin, ornitin, arginin và acid glutamic. Betagalactosidase dương tính. Thử nghiệm VP (Voges Proskauer) âm tính.



- *Kháng nguyên*: Cấu trúc kháng nguyên của *E. coli* rất phức tạp

Kháng nguyên O: kháng nguyên than của vi khuẩn, đây là kháng nguyên quan trọng nhất, bản chất là lipopolysaccharide. Kháng nguyên O có khả năng chịu nhiệt và là nội độc tố của vi khuẩn. Kháng nguyên O có 170 yếu tố khác nhau.

Kháng nguyên K: Khoảng 100 yếu tố kháng nguyên K đã được xác định và được chia thành 3 loại: A, B và L trong đó kháng nguyên A, L chịu nhiệt, B không chịu nhiệt.

Kháng nguyên H: là kháng nguyên long của vi khuẩn, có khoảng 40 type, không chịu nhiệt.

- *Phân loại*

Dựa vào cấu trúc kháng nguyên, *E. coli* được chia thành các type huyết thanh. Dựa vào tính chất gây bệnh, *E. coli* được chia thành 07 loại sau đây

EPEC (Enteropathogenic *E. coli*): *E. coli* gây bệnh đường ruột.

ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*): *E. coli* sinh độc tố ruột.

EIEC (Enteroinvasive *E. coli*): *E. coli* xâm nhập đường ruột.

EAEC (Enteroadherent *E. coli*): *E. coli* bám dính đường ruột.

EHEC (Enterohaemorrhagic *E. coli*): *E. coli* gây chảy máu đường ruột.

UPEC (Uropathogenic *E. coli*): *E. coli* gây nhiễm khuẩn tiết niệu

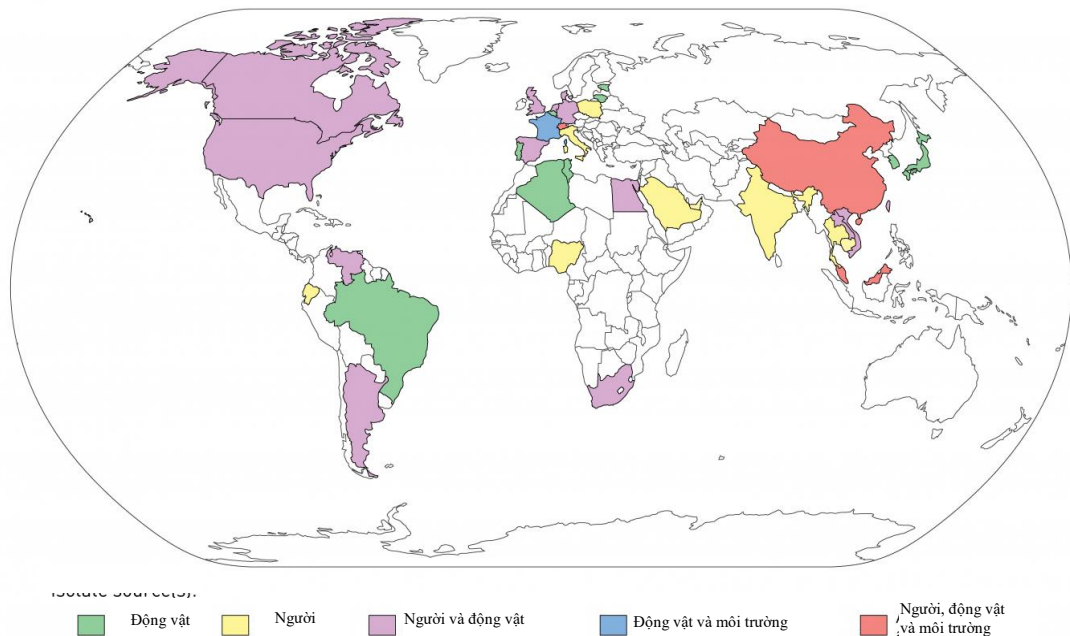
NMEC (New born meningitis *E. coli*): *E. coli* gây viêm màng não trẻ sơ sinh.

### **1.3.2. Các nghiên cứu về gen *mcr-1* kháng colistin của *E. coli* và các vi khuẩn gram âm đường ruột trên thế giới và Việt Nam**

- 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 phát hiện gây chấn động giới khoa học y học và thú y đó là tìm thấy gen *mcr-1* kháng colistin ở vi khuẩn *E. coli* lây truyền qua plasmid. Những phát hiện trước đó chỉ thấy kháng colistin chỉ lan truyền theo con đường dọc do đột biến nhiễm sắc thể. Liu và cộng sự bằng phương pháp giải trình tự gen, so sánh mẫu đồng nhất và điện di đã chứng minh cơ chế lây truyền ngang qua plasmid của *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng

colistin. *mcr-1* được tìm thấy ở các chủng *E. coli* và *K. pneumoniae* được thu thập từ 5 thành phố từ tháng 4/2011 đến 12/2014. Kết quả cho thấy 78/523 (15%) mẫu thịt sống, 166/824 (21%) mẫu từ động vật và 16/1322 (1%) mẫu từ bệnh nhân nội trú bị nhiễm khuẩn có chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* [57].

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* (hình 5). Dưới đây là một vài các nghiên cứu được tác giả ghi nhận.



**Hình 1.6: Biểu đồ phân bố các nước có vi khuẩn mang gen *mcr-1* kháng colistin (nguồn:**

Nghiên cứu của Ajum MF và cộng sự đã tìm thấy các chủng *E. coli* và *Salmonella* mang gen *mcr-1* ở một trang trại lợn ở Anh, chủng *E. coli* này còn mang enzym sinh ESBLs và có chứa plasmid mang gen *mcr-1* là ISApII [16]

Fernandes MR và cộng sự đã phân lập được một chủng *E. coli* từ bệnh nhân bị tiểu đường nhiễm trùng bàn chân mang gen *mcr-1* ở Brazil. Phân tích toàn bộ bộ

gen cho thấy chủng *E. coli* có sequence type (ST) là 101 và có chứa plasmid IncX4 -đã được xác định gần đây trong *Enterobacteriaceae* từ thực phẩm, động vật và các mẫu người thu được trên các lục địa khác nhau [39]

Wong, Sally CY và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu giám sát các chủng vi khuẩn *Enterobacteriaceae* và *A. baumannii* mang gen *mcr-1* từ 8/12/2015 đến 8/1 năm 2016 tại một bệnh viện của trường đại học tại Hồng Kông. Phân lập được 05 chủng *Enterobacteriaceae* mang gen *mcr-1* kháng colistin từ bệnh nhân có tiền sử điều trị bằng colistin, trong đó có 04 chủng là *E. coli*, chiếm tỷ lệ 0,4% các chủng *Enterobacteriaceae* phân lập trên lâm sàng [112].

Rất nhiều nghiên cứu đã phát hiện ra các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập được từ nước thải tưới cây, chất thải từ trang trại nuôi lợn, từ thịt gà...ở Tây Ban Nha, Đức, Nam Mỹ, từ người và thịt gà tại Thụy Sĩ [76, 43, 66, 36]

Tại Đan Mạch, trong chương trình giám sát kháng sinh, bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ gen (WGS), các nhà nghiên cứu đã phân lập được 1 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* từ 1 bệnh nhân nhiễm trùng máu, chủng này đồng thời mang 2 gen kháng thuốc ESBL (CTX-M-55) và AmpC (CMY-2) cephalosporinase, 5 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được phân lập từ 5 mẫu thịt gà cũng đồng thời có chứa 1 trong 2 hoặc cả 2 gen ESBL (SHV-12) và AmpC (CMY-2) cephalosporinase. Các chủng từ người và động vật mang gen CTX-M-55 cũng giống với các chủng được phân lập từ Châu Á [19]

Tại Trung Quốc, ngay sau phát hiện chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* của Liu và cộng sự, Dan-xia Gua và cộng sự cũng phát hiện chủng *K. pneumoniae* và *E. coli* mang gen MCR-1 phân lập từ bệnh phẩm phân của một trẻ em bị tiêu chảy [17].

Nghiên cứu của Patrick McGann và cộng sự đã phát hiện chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen *mcr-1* được phân lập từ 1 bệnh nhân nhiễm trùng đường niệu tại Mỹ [25]

Một nghiên cứu khác tại Banlades đã phân lập được chủng *E. coli* đầu tiên mang gen *mcr-1* kháng colistin từ bùn thải đô thị và chủng vi khuẩn này còn là một chủng đa kháng thuốc, kháng với 11 loại kháng sinh khác nhau được thử nghiệm [50]

Mới gần đây, nghiên cứu của Yao, Xu và cộng sự đã tìm thấy chủng vi khuẩn *E. coli* THSJ02 mang gen *mcr-1* phân lập được từ mẫu cánh gà của một siêu thị tại Quảng Châu, Trung Quốc đề kháng với tất cả các loại kháng sinh trừ doxycycline và tigecycline. Giải trình tự bằng phương pháp Sanger cho thấy chủng này có ST là 167, ngoài mang gen *mcr-1* kháng colistin còn mang rất nhiều gen kháng kháng sinh như *bla<sub>NDM-9</sub>*, *fosA3*, *rmtB*, *bla<sub>CTX-M-65</sub>* và *floR*. Điều đáng chú ý là carbabennem. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, việc tồn tại đồng thời cả 02 gen kháng nguy hiểm *mcr-1* và NDM-9 trên chủng *E. coli* trong thịt bán lẻ sẽ có nguy cơ lây truyền những gen kháng này vào cộng đồng qua đường tiêu hóa của người. Điều này rất nguy hiểm bởi con người sẽ phải đối mặt với nguy cơ không còn thuốc kháng sinh để điều trị nhiễm trùng do các vi khuẩn gram âm này gây ra. Vì vậy vấn đề cần thiết và cấp bách hiện nay là giám sát chặt chẽ việc sử dụng colistin ở cả người và động vật [118]

Tại Việt Nam, kết quả nghiên cứu ban đầu của nhóm nghiên cứu của chúng tôi và một số nhóm nghiên cứu khác cũng đã tìm thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin ở trong môi trường, thực phẩm, nước và ở người [9, 60].

Trước đó, nghiên cứu của 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. Kết quả nghiên cứu cho thấy: có 9/24 chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập từ gà và lợn mang gen *mcr-1* (37,5%), 9 chủng này đều kháng colistin với MIC là 4 mg/L hoặc 8 mg/L. Giải trình tự gen *mcr-1* thấy 100% giống gen *mcr-1* phát hiện ở Trung Quốc [60]. Nghiên cứu này chỉ xác định được một số ít các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong vật nuôi ở trang trại mà không đánh giá được các chủng này có lây lan vào nguồn nước, thức ăn và người nông dân làm việc trong trang trại. Vì vậy nghiên cứu cũng chưa đánh giá được đồng bộ thực trạng tỉ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* ở các nguồn trong cộng đồng (ở người, động vật nuôi, thức ăn, nước) và cũng chưa đánh giá được cơ chế lan truyền của các chủng này.

Ở Việt Nam, tại thời điểm triển khai nghiên cứu cũng 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 các vùng nông thôn Bắc Bộ.

### **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***

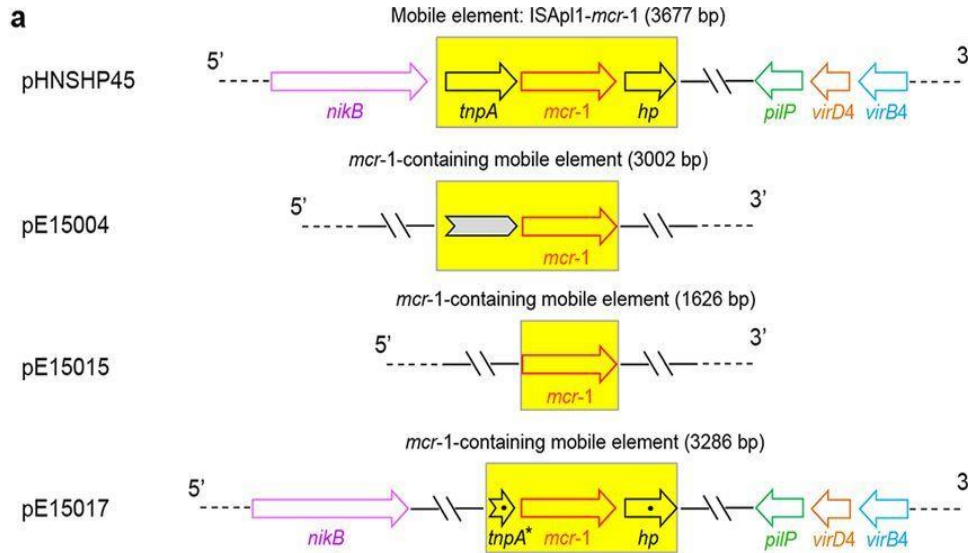
Trước đây, cơ chế kháng colistin do đột biến di truyền xảy ra do mã hoá nhiễm sắc thể với mức độ thấp ở một số chủng thuộc họ *Enterobacteriaceae* có liên quan đến các hai thành phần như *pmrAB* và *phoPQ* và với gen điều hòa *mgrB*, trong đó sự thay đổi lipid A làm giảm ái lực của vi khuẩn với polymyxin [46]

Gần đây, Liu và các cộng sự [57] đã báo cáo, lần đầu tiên, phát hiện ra gen *mcr-1* kháng colistin lan truyền qua plasmid của các chủng *E. coli* và *K. pneumoniae* phân lập từ phân động vật, thịt và từ bệnh phẩm của bệnh nhân ở Trung Quốc. Liu và cộng sự đã xác định được gen *mcr-1* mã hóa một phosphoethanolamine transferase và sự biểu hiện của nó dẫn đến việc bổ sung phosphoethanolamine vào lipid A. Kể từ báo cáo đầu tiên, hơn 150 bài báo và báo cáo đã được xuất bản nói về *mcr-1*. Rõ ràng là nó đã tồn tại không bị phát hiện trong nhiều thập kỷ, có phân bố trên toàn thế giới, được tìm thấy phổ biến hơn ở động vật thực vật so với ở người (đặc biệt là ở *E. coli*) và tỷ lệ hiện nhiễm đang gia tăng ở những nơi có dữ liệu [56]. Hơn nữa, một gen kháng lại colistin qua plasmid thứ hai, có chung nhận dạng nucleic acid 76,7% với *mcr-1*, được báo cáo gần đây từ Bỉ [113]. Phần lớn các chủng mang *mcr-1* vẫn nhạy cảm với các kháng sinh phổ biến khác và tần suất do sự thất bại của điều trị colistin đối với các bệnh nhiễm trùng do các chủng biểu hiện *mcr-1* vẫn chưa được báo cáo. Trong nghiên cứu của Liu và cộng sự [56] đã chứng minh rằng *mcr-1* có khả năng tạo ra các mức độ kháng colistin khác nhau trong các mầm bệnh gram âm của ESKAPE và dẫn đến biến đổi phosphoethanolamine lipid A trong các chủng vi khuẩn thường gây nhiễm trùng trong y học.

Cho đến nay, các nghiên cứu đã tìm ra các biến thể của gen *mcr-1*, kí hiệu từ *mcr-1.1-mcr-1.10* [58, 65]

### 1.3.3.2. 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) [57].

Nghiên cứu về plasmid typing mang *mcr-1* cho thấy các tít plasmid phổ biến hiện nay là: IncHI2, IncI2 và IncP [46]

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

### 1.4.1. Kỹ thuật phát hiện kháng kháng sinh

#### 1.4.1.1. Kỹ thuật khoan giấy khuếch tán

Phương pháp này nhằm đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh

Nguyên lý: Kháng sinh ở trong khoan giấy sẽ khuếch tán vào thạch. Phương pháp này nhằm đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh

Kháng sinh ở trong khoanh giấy sẽ khuếch tán vào thạch Meuler-hinton có chứa các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Mức độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh được biểu hiện bằng đường kính các vòng vô khuẩn xung quanh khoanh giấy kháng sinh [24, 30, 130]. Kỹ thuật này đơn giản, dễ thực hiện, rẻ tiền nhưng độ chính xác không cao.

#### *1.4.1.2. Kỹ thuật xác định nồng độ tối thiểu của kháng sinh (MIC)*

Phương pháp này nhằm mục đích xác định được nồng độ kháng sinh nhỏ nhất ức chế sự phát triển của vi khuẩn giúp cho việc lựa chọn và tính toán liều kháng sinh hiệu quả

Nguyên lý: Các chủng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên các đĩa thạch Meuler-hinton có nồng độ kháng sinh khác nhau. Nồng độ kháng sinh tối thiểu có tác dụng ức chế vi khuẩn được xác định khi mật độ khuẩn lạc  $\leq 3$  [24,128]

Đây là phương pháp rất chính xác để xác định tính nhạy cảm của kháng sinh của vi khuẩn tuy nhiên phương pháp này có kỹ thuật phức tạp, mất thời gian nên khó áp dụng trên lâm sàng.

#### *1.4.1.3. Kỹ thuật E-test*

Kỹ thuật này giúp xác định nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh. Thanh giấy E-test chứa các phổ kháng sinh có các nồng độ kháng sinh khác nhau được đặt lên đĩa thạch đã được trải huyền dịch vi khuẩn, khả năng ức chế vi khuẩn ở nồng độ thấp nhất sẽ được phát hiện ở phổ kháng sinh (điểm gãy) dựa vào đó các bác sỹ có thể tính toán liều điều trị hiệu quả cho bệnh nhân[24, 30, 128]

Kỹ thuật E-test dễ thực hiện, cho kết quả nhanh, chính xác nhưng khá đắt tiền.

### ***1.4.2. Các kỹ thuật sinh học phân tử nghiên cứu vi khuẩn kháng kháng sinh***

#### *1.4.2.1. Phân tích các plasmid*

Plasmid là yếu tố ADN nằm ngoài nhiễm sắc thể của hầu hết các chủng vi khuẩn và có thể xác định qua qui trình ly giải tế bào và điện di trên thạch. 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.

**Bảng 1.2. Ví dụ một số lasmid mang gen kháng kháng sinh [27, 28, 80, 55]**

Vi khuẩn	Loại plasmid	Gen kháng kháng sinh trên plasmid	Khả năng truyền plasmid kháng kháng sinh*
<i>E. coli</i>	FII; A/C; B/O	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> và NDM-1	Có
<i>K. pneumoniae</i>	A/C; FI/FII và InCL/M	NDM-1, Oxa-48	Có
<i>S. typhimurium</i>	A/C2	CMY-2-type A	Có
<i>Citrobacter</i>	A/C, L/M	ArmA, DHA, SHV	Có
<i>Enterocloaceae</i>	A/C2	VIM-4, CMY-4	Có

\* Khả năng truyền plasmid kháng kháng sinh được các tác giả thử nghiệm thành công trong phòng thí nghiệm. Các chủng “cho” là các chủng vi khuẩn mang plasmid kháng kháng sinh, và các chủng “nhận” là các chủng *E. coli* J53, DH5- $\alpha$

Việc phát hiện và phân loại plasmid cần phải dựa vào các đặc tính về kiểu gen và dựa trên các gen có tính ổn định, đặc biệt là các gen qui định sự nhân lên của các plasmid [35]. Năm 1971 Hedges và cộng sự lần đầu tiên đưa khái niệm phân loại plasmid dựa trên tính ổn định của plasmid trong khi tiếp hợp [34]. Năm 1988, Couturier và cộng sự đã sử dụng kỹ thuật Southern-blotting để phân loại plasmid, tuy nhiên phương pháp này có độ đặc hiệu không cao, tương đối phức tạp và không thể áp dụng để phân tích với số lượng mẫu lớn [32]. Năm 2005, Carattoli và cộng sự phát triển kỹ thuật PCR-based replicon typing, kỹ thuật này sẽ khuếch đại các đoạn gen đặc hiệu qui định sự nhân lên của các plasmid quan trọng của các vi khuẩn đường ruột [28]. Kỹ thuật này đang được nhiều tác giả sử dụng để phân loại các plasmid mang gen kháng kháng sinh, tuy nhiên kỹ thuật này vẫn còn hạn chế do chỉ phân loại được các plasmid thuộc nhóm Inc cổ điển [28, 61].



#### *1.4.2.2. Kỹ thuật Southern blotting phát hiện plasmid mang gen kháng kháng sinh*

Đây là kỹ thuật được áp dụng rộng rãi để phát hiện các plasmid mang gen kháng kháng sinh

Nguyên lý: Dùng enzym S1 cắt các ADN mạch đơn của vi khuẩn và giữ lại plasmid sau đó được điện di trên thạch. Các plasmid sau khi điện di sẽ được chuyển sang màng tìm sẽ được phát hiện trên phim

#### *1.4.2.3. 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. Hiện nay kỹ thuật này được áp dụng rộng rãi nhằm tìm hiểu khả năng truyền plasmid mang gen kháng kháng sinh trong quần thể vi [28, 73]. Ở Việt Nam kỹ thuật này cũng được sử dụng để phân tích đặc tính của các vi khuẩn mang plasmid kháng kháng sinh [73].

#### *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. Đây là kỹ thuật được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như Y học, sinh học và nông nghiệp với nhiều mục đích khác nhau như phát hiện các căn nguyên gây bệnh do vi khuẩn hay phát hiện các gen kháng kháng sinh

#### *1.4.4. Kỹ thuật RADP PCR (Random amplified polymorphic ADN fingerprinting)*

Nguyên lý: sử dụng các đoạn mồi ngẫu nhiên đơn có kích thước ngắn khoảng 10 nucleotid, qua chu trình nhiệt của phản ứng PCR các đoạn mồi này có thể gắn vào nhiều vị trí khác nhau của ADN để khuếch đại ngẫu nhiên các đoạn gen của vi khuẩn có kích thước 100-1000 bp. Dựa vào sự khác nhau của các đoạn ADN của các chủng có thể so sánh mối liên quan của các chủng vi khuẩn trong các nghiên cứu dịch tễ học [89]

#### *1.4.5. 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[95]. Hiện nay PFGE được coi là một trong các tiêu chuẩn vàng trong phân loại cũng như xác định nguồn gốc vi khuẩn. Ở Việt Nam, kỹ thuật PFGE được sử dụng để phân tích mối liên hệ về kiểu gen của các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh.

#### ***1.4.6. Kỹ thuật Southern blot phân tích hệ gen vi khuẩn***

##### *1.4.6.1. Kỹ thuật Ribotyping*

Tất cả các chủng vi khuẩn đều có một hay nhiều ARNm phân bố quanh nhiễm sắc thể, trình tự các operon này có tính bảo tồn cao. Do vậy vi khuẩn sẽ được định loại bằng việc sử dụng các đoạn dò hướng trực tiếp tới trình tự ADN mã hóa các ARN thông tin này [89]

##### *1.4.6.2. Kỹ thuật phân tích đa hình chiều dài giới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP)*

Nguyên lý: ADN nhiễm sắc thể hay các plasmid của vi khuẩn sẽ được cắt bằng các enzym giới hạn thành những đoạn ADN. Các đoạn ADN sẽ được phân tách bằng điện di trên thạch, chuyển lên màng nitrocellulose, sau đó các đoạn cắt này sẽ được lai ghép với một đoạn ADN dò đặc hiệu đã được đánh dấu phóng xạ. Những đoạn ADN có trình tự axit nucleic bổ xung phù hợp sẽ gắn với đoạn dò và được phân biệt dựa vào sự khác nhau về số lượng và kích thước của các phân đoạn ADN [35, 89]. Hiện nay kỹ thuật này được sử dụng để phân tích các đặc tính sinh học phân tử của các vi khuẩn kháng đa kháng sinh.

#### ***1.4.7. Kỹ thuật Multi Locus Sequence Typing (MLST)***

Đây là kỹ thuật tốt nhất để phân loại kiểu gen của nhiều loại vi khuẩn. Kỹ thuật MLST được đánh giá để phân loại kiểu gen tốt hơn kỹ thuật PFGE và RFLP và là một trong rất ít các kỹ thuật được gọi là “thư viện” để sắp xếp, phân loại và được sử dụng trong các nghiên cứu dịch tễ học của các chủng *A. baumannii*, qua đó có thể xác định các chủng gây dịch, kháng kháng sinh, hay sinh độc tố nhằm giám sát sự lây truyền của chúng trong phạm vi quốc gia và trên thế giới [95].

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

Trong nghiên cứu vi khuẩn kháng kháng sinh, kỹ thuật giải trình tự gen được sử dụng rộng rãi để giải trình tự các gen kháng kháng sinh cũng như phân tích các plasmid mang gen kháng kháng sinh. Đây là một phương pháp chính xác nhất để xác định các đặc tính kháng kháng sinh của vi khuẩn.

Phương pháp giải trình tự gen của Sanger bằng điện di mao quản vẫn luôn được coi là chuẩn vàng trong các phương pháp giải trình tự gen hiện nay. Trong lĩnh vực nghiên cứu về kháng kháng sinh, phương pháp này chủ yếu được sử dụng để giải trình tự các gen kháng vì các gen này thường có kích thước < 2 kb. Tuy nhiên với nhu cầu tìm hiểu cấu trúc của các yếu tố di truyền di động (4 ~ 10 kb) hay các plasmid mang gen kháng có kích thước từ vài chục đến hàng trăm kb thì phương pháp này lại không đáp ứng được.

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. Không chỉ có tốc độ lớn mà kỹ thuật mới này còn cho phép thực hiện song song một số lượng lớn trình tự trong vòng vài tuần mà nếu dùng phương pháp Sanger sẽ phải mất đến hàng năm mới có thể hoàn thành. 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 [127].

### **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 ra sao? 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

##### • Mục tiêu 1:

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 bao gồm:

- Mẫu phân người của 80 hộ gia đình sống tại xã Thanh Hà, Huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam
- Mẫu phân động vật nuôi tại 80 hộ gia đình sống tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, Tỉnh Hà Nam

- Mẫu thực phẩm thu thập tại 80 hộ gia đình sống tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, Tỉnh Hà Nam

- Mẫu môi trường (mẫu nước mưa, nước giếng, nước tưới) thu thập tại 80 hộ gia đình sống tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, Tỉnh Hà Nam

✓ Tiêu chuẩn lựa chọn: các mẫu được lưu trong tủ âm sâu  $-70^{\circ}\text{C}$ , có ghi mã và hồ sơ chủng đầy đủ

✓ Tiêu chuẩn loại trừ: các mẫu không có mã, không rõ hồ sơ chủng

• **Mục tiêu 2:** 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 bao gồm:

- Các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập từ phân người.

- Các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập từ phân động vật nuôi trong hộ gia đình.

- Các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập từ thức ăn của các hộ gia đình.

- Các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập từ môi trường (nước mưa, nước giếng, nước tưới) của các hộ gia đình.

## 2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu

### Cỡ mẫu cho mục tiêu 1

Vì nghiên cứu là nghiên cứu mô tả cắt ngang nhằm xác định tỷ lệ lưu hành gen *mcr-1* trong phân người, phân động vật, nước và thực phẩm nên chúng tôi 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 %[98], 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 % [53], 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 đó đã báo cáo là 15 % [57], 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% [49], 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. Các mẫu nghiên cứu được cấy trên môi trường chọn lọc MAC bổ sung colistin 0.5 µg/ml nhằm mục đích thu thập các chủng vi khuẩn gram âm có mang gen *mcr-1* bao gồm các chủng có biểu hiện kiểu hình kháng colistin và các chủng có mang gen kháng nhưng vẫn nhạy với colistin. Những mẫu có vi khuẩn mọc, chọn từ 3-5 khuẩn lạc riêng rẽ màu hồng nhạt để cấy chuyên tiếp trên thạch thường ủ 37°C/24h, trong trường hợp trên đĩa chỉ mọc 1 hoặc 2 khuẩn lạc thì sẽ lấy 1 hoặc 2 khuẩn lạc đó. Việc lựa chọn nhiều hơn một chủng trên một mẫu cấy với mục đích làm tăng khả năng phát hiện các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* của các mẫu nghiên cứu. Các chủng này được lưu giữ trong môi trường LB có glycerol 20% trong tủ -70°C để làm các thử nghiệm trong nghiên cứu.

Nghiên cứu đã thu thập được số lượng mẫu và số lượng chủng như sau (Bảng 2.1)

**Bảng 2.1. Số lượng mẫu và chủng phân lập được sử dụng trong nghiên cứu**

Loại mẫu	Số lượng mẫu	Số lượng chủng
Phân người	265	649
Phân động vật	122	271
Nước	179	103
Thức ăn	159	201
Tổng số	725	1224

Số lượng cụ thể các chủng vi khuẩn được nghiên cứu trong từng kỹ thuật xét nghiệm như sau:

PCR phát hiện gen *mcr-1* trực tiếp từ mẫu: toàn bộ 1224 chủng thu thập được từ Bảng 2.1

Nuôi cấy và định danh vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu dương tính với *mcr-1*: Toàn bộ các chủng dương tính với *mcr-1*.

Xác định tính nhạy cảm của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* với colistin bằng kỹ thuật kháng sinh đồ vi pha loãng: Toàn bộ các chủng *E. coli* dương tính với *mcr-1*.

Xác định tính nhạy cảm kháng sinh bằng kỹ thuật định lượng nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu (MIC): Lựa chọn đại diện các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin đã được nuôi cấy và định danh dựa trên tiêu chí sau:

- ✓ Lấy toàn bộ các chủng có MIC colistin từ 8->16
- ✓ Các chủng có kháng colistin có cùng một giá trị =4 trong cùng 1 mẫu: chọn đại diện ngẫu nhiên 1-2 chủng.
- ✓ Các chủng có giá trị kháng colistin ở ngưỡng trung gian =2: lựa chọn đại diện theo hình thức lấy ngẫu nhiên.
- ✓ Các chủng có giá trị kháng colistin ở ngưỡng nhạy cảm <2: lựa chọn đại diện theo hình thức lấy ngẫu nhiên.

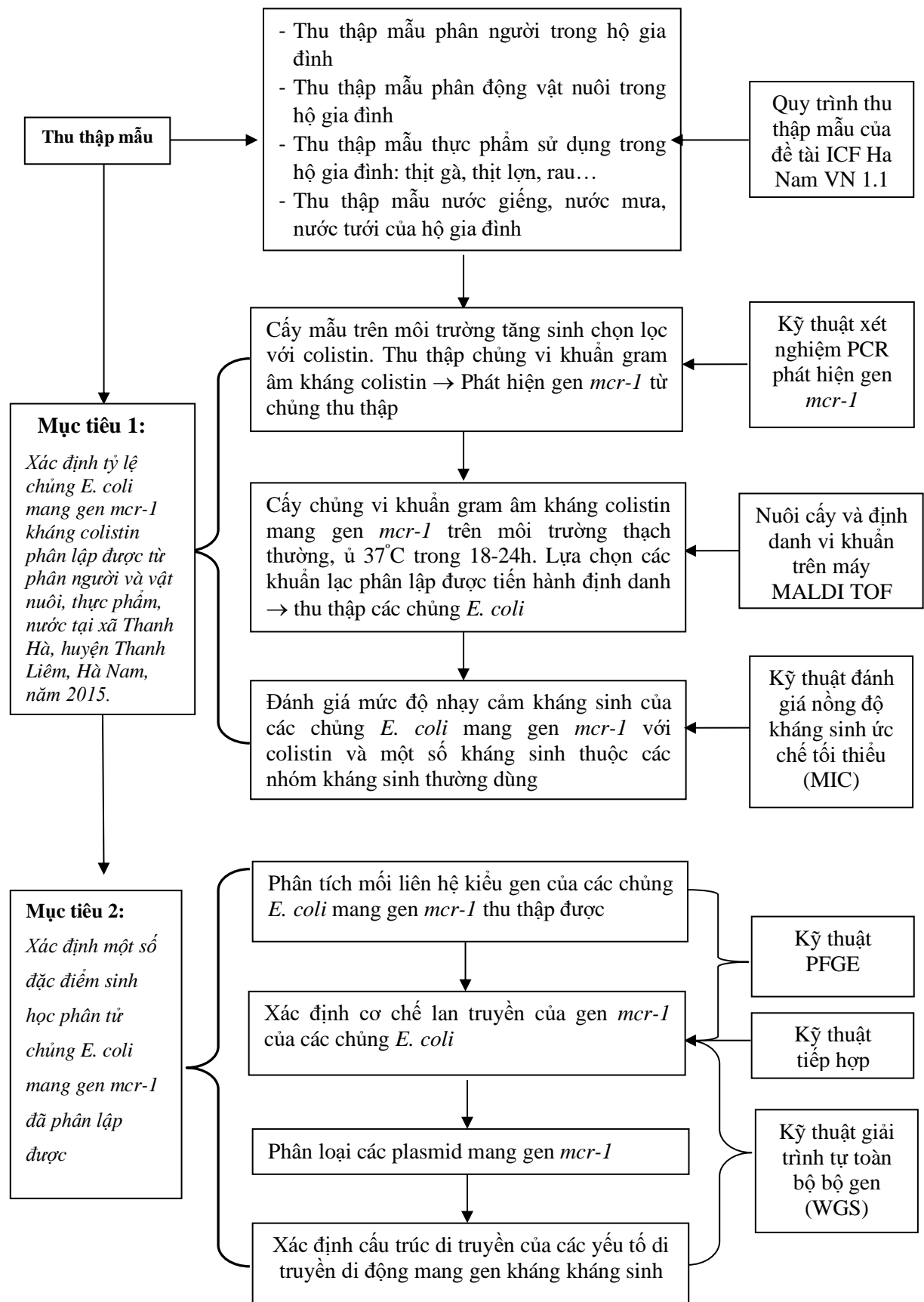
### **Cỡ mẫu cho mục tiêu 2:**

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 nồng 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.



### Sơ đồ tóm tắt các bước nghiên cứu



## 2.6. Phương pháp lấy mẫu và kỹ thuật xét nghiệm

**Bảng 2.2 Tóm tắt phương pháp lấy mẫu và kỹ thuật xét nghiệm**

Mục tiêu	Phương pháp lấy mẫu	Kỹ thuật xét nghiệm
Mục tiêu 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mẫu phân người: 5g /mẫu</li> <li>- Mẫu phân động vật: 5g/ mẫu</li> <li>- Mẫu thực phẩm: 100g/mẫu</li> <li>- Mẫu môi trường ngoại cảnh: 100ml nước sinh hoạt gia đình /mẫu</li> </ul> Thu thập theo thường qui của đề tài ICF Hà Nam VN V1.1 (phụ lục 1-5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nuôi cấy phân lập và định danh vi khuẩn</li> <li>- Kỹ thuật PCR xác định gen <i>mcr-1</i></li> <li>- Xác định tính nhạy cảm kháng sinh: MIC</li> </ul>
Mục tiêu 2	Chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> kháng colistin phân lập từ mục tiêu 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kỹ thuật PFGE</li> <li>- Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen (Whole Genome Sequencing-WGS)</li> <li>- Kỹ thuật tiếp hợp</li> </ul>

### 2.6.1. Kỹ thuật nuôi cấy và phân lập vi khuẩn

Các mẫu nghiên cứu được nuôi cấy và phân lập theo quy trình sau:

Bước 1: Chuẩn bị môi trường thạch MacConkey có bổ sung colistin 0,5µg/ml (Thạch MacConkey hãng Oxoid, UK. Colistin bột Sigma, USA). Cân thạch tương ứng với số mẫu cần cấy, hòa trong nước cất với tỉ lệ theo yêu cầu của nhà sản xuất, tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Để thạch về nhiệt độ 40°C, bổ sung colistin nồng độ 0,5µg/ml nhẹ nhàng lắc đều.

Bước 2: sử dụng ống 1 µl lấy mẫu phân người và động vật cấy trên thạch MacConkey có bổ sung colistin 0.5µg/ml và ủ 37°C trong 18-24h. Đối với mẫu nước và thực phẩm, lấy 1 µl dung dịch canh thang LB + glycerol 20% lưu chủng cấy trên thạch MacConkey có bổ sung colistin 0.5µg/ml và ủ 37°C trong 18-24h.

Bước 3: Chuẩn bị thạch thường (Nutrien Agar-hãng Oxoid, UK)

Bước 4: Trên mỗi đĩa cấy, chọn 3-5 khuẩn lạc riêng rẽ màu hồng nhạt cấy chuyển từng khuẩn lạc sang thạch thường ủ 37°C trong 18-24h. Những đĩa mọc 1 đến 2 khuẩn lạc thì lấy 1-2 khuẩn lạc đó. Ghi số lượng chủng tương ứng mỗi mẫu nghiên cứu. Các đĩa không có vi khuẩn mọc được ghi nhận là các mẫu không có chủng vi khuẩn gram âm kháng colistin.

Chuẩn bị ống eppendorf lưu chủng: 1,5ml LB broth + glycerol 20% (LB broth hang Oxoid, UK)

Bước 5: Kiểm tra lại các chủng được cấy trên thạch thường có thuần hay không bằng mắt thường. Các chủng có nhiễm 2 loại khuẩn lạc sẽ được cấy lại từ đầu

Các đĩa chủng thuần sẽ được đánh mã số và lưu chủng trong ống Eppendorf có 1,5ml LB broth + glycerol 20% và bảo quản ở -70°C để làm các thử nghiệm trong nghiên cứu.

## 2.6.2. PCR phát hiện gen *mcr-1*

### 2.6.2.1. Tách chiết ADN:

Các chủng vi khuẩn gram âm kháng colistin đã phân lập được trên thạch thường để qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Lấy 4-5 khuẩn lạc hòa tan trong 200 µl dung dịch đệm PBS đun cách thủy 95°C/5 phút, li tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút. Thu nước nổi làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR.

### 2.6.2.2. Quy trình xét nghiệm PCR phát hiện *mcr-1*:

- Nguyên lý: Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại đoạn gen *mcr-1* kháng colistin của vi khuẩn bằng phản ứng PCR. Quá trình này được lặp lại nhiều lần để tổng hợp hàng triệu bản sao của đoạn gen từ một vài phân tử ADN ban đầu qua đó có thể phát hiện được các đoạn gen bằng cách nhuộm, điện di sản phẩm và chụp dưới đèn UV.

▪ Môi cho phản ứng PCR: chúng tôi sử dụng trình tự mồi được thiết kế bởi Liu và cộng sự (2016)[57].

Trình tự của mồi như sau:

+ *mcr-1* F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3')

+ *mcr-1* R (5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3') [57]

Kích thước gen *mcr-1*: 309 bp

- Thiết lập và tối ưu phản ứng PCR để phát hiện gen *mcr-1*

Thành phần phản ứng PCR phát hiện gen *mcr-1*:

Thành phần phản ứng		1 mẫu (μl)
2X Master-Mix (GoTaq® ADN Polymerase: 400μM dATP, 400μM dGTP, 400μM dCTP, 400μM dTTP và 3mM MgCl <sub>2</sub> )		10
Mồi	<i>mcr-1-F</i>	0,5
	<i>mcr-1-R</i>	0,5
Nước		8
ADN		2
Tổng số:		20μl

- Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR

Các bước	Nhiệt độ	Thời gian
Biến tính	94°C	4 phút
Biến tính	94°C	36 giây
Gắn mồi	55°C	36 giây
Tổng hợp	72°C	50 giây
Kết thúc	72°C	5 phút
Giữ ở nhiệt độ 4°C		

- Các bước thực hiện:

Bước 1: Chuẩn bị mẫu ADN đã được tách chiết cần làm PCR. Ghi sơ đồ xét nghiệm

Bước 2: Pha dung dịch Master-Mix + mồi + nước cất tương ứng với số mẫu cần làm, trộn đều và chia đều mỗi tube PCR 18 μl.

Bước 3: Nhỏ vào mỗi tube 2 μl AND mẫu

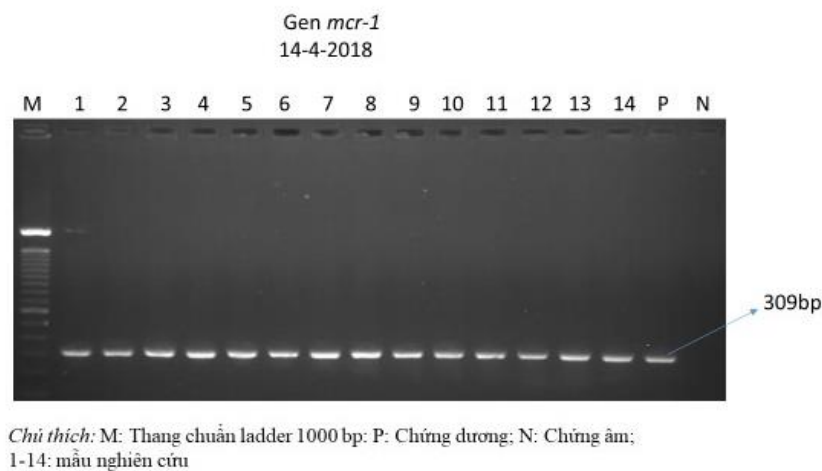
Bước 4: Thực hiện quá trình khuếch đại trên máy PCR

Bước 5: Điện di sản phẩm PCR: dựa trên nguyên lý của kỹ thuật điện di là sự chuyển động của các phân tử tích điện trong dung dịch dưới tác động của dòng điện, các sản phẩm PCR sẽ được điện di trên thạch điện di agarose nồng độ 1,5% + 3 μg/100 ml

thạch Redsafe- chất nhuộm DNA trong đệm TAE 1X trong 30 phút. Sau khi điện di xong gel được chụp lại bằng máy chụp ảnh gel để phát hiện gen *mcr-1*.

Bước 6: Phân tích kết quả.

Đánh giá chất lượng của phản ứng PCR: sử dụng mẫu chứng dương và chứng âm và thang chuẩn ladder 1000 kb. Phản ứng PCR có giá trị khi chứng dương *mcr-1* có lên band của gen *mcr-1* và không xuất hiện band ở mẫu chứng âm. Nhận định kết quả mẫu: Các mẫu có xuất hiện băng có cùng kích thước với chứng dương được xác định là các mẫu có chủng vi khuẩn gram âm mang gen *mcr-1*.



**Hình 2.1. Hình ảnh minh họa kết quả pcr phát hiện gen *mcr-1***

### 2.6.3. Kỹ thuật định danh vi khuẩn bằng máy MALDI TOF

*Nguyên lý:* Hệ thống định danh MALDI TOF được sử dụng để định danh vi khuẩn/vi nấm bằng cách sử dụng kỹ thuật khối phổ để xác định dấu ấn protein đặc trưng của một vi sinh vật. Phổ đại diện cho dấu ấn protein được dung để định danh chính xác mỗi vi khuẩn cụ thể bằng cách so sánh với thư viện khối của các dòng vi khuẩn/vi nấm.

*Các bước thực hiện*

- Chuẩn bị chủng thuần: cấy chủng cần định danh trên thạch thường trong 24 giờ
- Phết mỗi mẫu khuẩn lạc thuần lên một vị trí (spot) của đĩa MALDI target.
- Để mẫu khô ở nhiệt độ phòng.

- Cho 1  $\mu$ l dung dịch HCCA Matrix lên mỗi vị trí mẫu và để khô ở nhiệt độ phòng
- Cho đĩa MALDI target vào máy để thực hiện định danh.

#### Nhận định kết quả

- Kết quả có Score  $\geq 2$ : Độ tin cậy cao, có thể chính xác đến cấp độ loài.
- Kết quả có Score  $< 2$ : loại bỏ mẫu do không phải là chủng *E. coli*

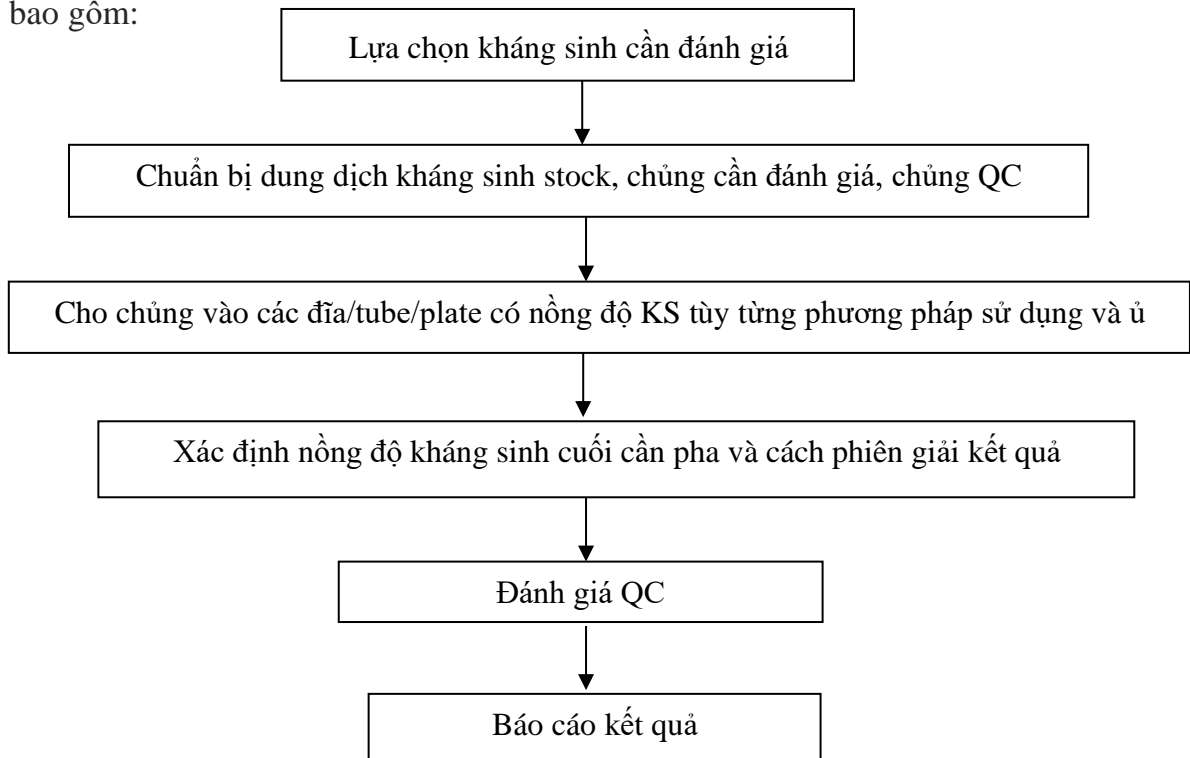
Kiểm tra chất lượng bằng hóa chất nội kiểm IVD Bacterial Test Standard (IVD BTS)

Các chủng sau khi định danh bằng máy MALDI TOF sẽ được thực hiện thêm test indole. Chủng được xác định là *E. coli* khi có kết quả định danh trên máy MALDI TOF được xác định là *E. coli* và test indole (+)

#### 2.6.4. Kỹ thuật đánh giá nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu (MIC)

Đánh giá nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu (MIC) được thực hiện bằng 2 kỹ thuật: Kỹ thuật vi pha loãng trong canh thang (Broth microdilution MIC test) được sử dụng để đánh giá MIC của colistin và kỹ thuật pha loãng trong thạch (agar dilution MIC test): được sử dụng để đánh giá các kháng sinh còn lại.

Các bước thực hiện của kỹ thuật đánh giá nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu bao gồm:





Cho thêm 50 µl MHB không có colistin sang một plate khác để đánh giá sự phát triển của các chủng trong môi trường MHB của mỗi mẻ chạy.

Bước 6: Chuẩn bị canh khuẩn  $10^6$  Mcfarland để cho vào plate kháng sinh đã pha: pha loãng 100 lần bằng cách pha canh khuẩn  $10^8$  Mcfarland trong nước muối 0.9% và hút 900 µl MHB + 100 µl canh khuẩn  $10^8$  Mcfarland trộn đều. Hút chuyển 100 µl canh khuẩn đã pha + 900 µl MHB trộn đều. Dung dịch cuối cùng là canh khuẩn  $10^6$  Mcfarland.

Bước 7: Hút 50 µl canh khuẩn  $10^6$  Mcfarland vào plate có các nồng độ colistin đã pha ở trên bao gồm cả chủng ATCC *E. coli* ATCC 25922 và *E. coli* ATCC 13846. Giếng chứng âm (Negative control -NC) không có chứa canh khuẩn. Cho canh khuẩn vào plate có môi trường MHB không có kháng sinh để kiểm tra môi trường MHB.

Bước 8: Trộn đều và ủ các plate ở nhiệt độ  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 16-20 giờ.

Diễn giải kết quả:

- Điều kiện để kết quả đạt:

+ Giếng chứng âm: không có vi khuẩn mọc ở tất cả các nồng độ

+ Giếng kiểm tra môi trường MHB: Vi khuẩn mọc tốt

+ Giếng *E. coli* ATCC 25922: MIC colistin trong khoảng: 0.25 µg/ml - 2 µg/ml

+ *E. coli* ATCC 13846: MIC colistin: 2-4 µg/ml

- Đọc kết quả: MIC của chủng vi khuẩn được xác định là nồng độ colistin nhỏ nhất mà có thể ức chế hoàn toàn vi khuẩn mọc ở đáy giếng, được nhận biết bằng mắt thường. Phiên giải kết quả MIC colistin nhạy và kháng theo tiêu chuẩn của CLSI 2018[107]

+ Chủng có MIC colistin  $\leq 2$  µg/ml: Nhạy với colistin

+ Chủng có MIC colistin  $>2$  µg/ml: Kháng với colistin

2.6.4.2. Kỹ thuật pha loãng trong thạch (*agar dilution MIC test*): được sử dụng để đánh giá các kháng sinh còn lại

**Mục đích:** Phương pháp pha loãng trong thạch để xác định nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh với các chủng vi khuẩn đường ruột theo khuyến cáo của CLSI.

**Nguyên lý:** của các kỹ thuật này là nồng độ kháng sinh tăng dần trong môi trường nuôi cấy, khi đạt đến một nồng độ nhất định nó sẽ ức chế được sự phát triển của vi khuẩn.



**Các bước tiến hành:**

Bước 1: Cấy riêng rẽ chủng chuẩn *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 và các chủng nghiên cứu ra đĩa thạch Mueller Hinton (Becton Dickinson, Mỹ), ủ ở 35-37°C trong 18 – 24 giờ.

Bước 2: Pha loãng bậc 2 các loại kháng sinh (Sigma, Mỹ) trong đệm PBS vô trùng:

- + Nhóm  $\beta$ -lactam: Ampicillin
- + Nhóm Carbapenem: Imipenem (IPM), Meropenem (MEM);
- + Nhóm Cephalosporins: Ceftazidime (CAZ), Cefotaxime (CTX); Cefepim (FEP)
- + Nhóm Aminoglycosid (gentamicin (GM), amikacin (AK))
- + Nhóm Sulfamid: Sulfamethoxazon và trimethoprim (SXT)
- + Nhóm Fluoroquinolones: Ciprofloxacin (CIP);

Bước 3: Chuẩn bị các đĩa thạch Mueller-Hinton có chứa kháng sinh theo các nồng độ đã pha loãng.

Bước 4: Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn

- Dùng que cấy vô trùng lấy 1 khuẩn lạc của các chủng đã nuôi cấy hòa tan vào 2 ml nước muối sinh lý vô trùng và trộn đều bằng máy lắc vortex.

- Độ đục của huyền dịch vi khuẩn sẽ được so sánh với độ đục chuẩn 0,5 của thang McFarland.

- Pha loãng 100 lần huyền dịch vi khuẩn bằng cách lấy 20  $\mu$ l huyền dịch này cho vào 2 ml nước muối sinh lý vô trùng để được huyền dịch nồng độ  $10^6$  vi khuẩn/ml.

- Hút 0,5 ml huyền dịch vi khuẩn nồng độ  $10^6$  vi khuẩn/ml cho vào mỗi giếng của phiến inox 32 giếng theo sơ đồ số của các chủng theo sơ đồ dưới đây:

	1	2	3	4	
5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28
	29	30	Chủng chuẩn #1	Chủng chuẩn #2	

Bước 5: Cây các chủng đã chuẩn bị trên các đĩa thạch có sẵn kháng sinh

Dùng bộ định cây inox 32 đầu chắm vào các giếng trên phiến, sau đó đặt nhẹ nhàng (không để chân định ấn sâu vào thạch), chính xác (chỉ đặt 1 lần, không di chuyển) lên đĩa thạch không có kháng sinh.

- Tiếp tục chắm và đặt lên các đĩa thạch đã có sẵn kháng sinh từ nồng độ thấp đến nồng độ cao.

- Cuối cùng trước khi kết thúc, chắm vào đĩa thạch MH không có kháng sinh một lần nữa để làm chứng.

- Để các đĩa thạch ở nhiệt độ phòng trong 30 phút cho khô.

Bước 6: Ủ ở 37°C trong vòng 18-24 giờ, đọc kết quả.

Diễn giải kết quả: - Đảm bảo chất lượng xét nghiệm: tất cả các chủng mọc tốt ở 2 đĩa đầu và cuối (không chứa kháng sinh); nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế sự phát triển của 2 chủng chuẩn nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn CLSI (2018) với 10 loại kháng sinh kể trên. Kết quả nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu của các chủng được xác định là nhạy (S), trung gian (I) hay kháng (R) khi so sánh kết quả với bảng dưới đây (Bảng 2.4) [78, 96].

**Bảng 2.3. Diễn giải kết quả đọc MIC của các kháng sinh**

Tên kháng sinh	Nhạy (S) (µg/ml)	Trung gian(I) (µg/ml)	Kháng (R) (µg/ml)
Ampicillin	8	16	32
Ceftazidim	4	8	16
Cefotaxim	1	2	4
Cefepim	4	8	16
Gentamicin	4	8	16
Ciprofloxacin	1	NA	4
Sulfamethoxazon/Trimethoprim	2	NA	4
Amikacin	16	32	64
Imipenem	1	2	4
Meropenem	1	2	4

+ Đọc kết quả, lần lượt đọc từ đĩa thạch có nồng độ kháng sinh thấp nhất. Nồng độ MIC được xác định ở đĩa môi trường mà ở đó các vi khuẩn bị ức chế phát triển, nên mật độ vi khuẩn giảm hẳn chỉ còn 1-3 khuẩn lạc mọc.

+ Ở nồng độ thấp nhất, không có vi khuẩn mọc thì kết quả được ghi nhận là: nhỏ hơn hoặc bằng nồng độ đó ( $\leq$ ). Trong trường hợp đến nồng độ cao nhất mà vẫn thấy vi khuẩn mọc thì kết quả được ghi nhận là lớn hơn nồng độ đó ( $>$ ).

+ Kết quả MIC của các chủng sẽ được so sánh với nồng độ ranh giới kháng (bảng 2.4) để phân biệt thành 3 mức độ nhạy cảm, kháng hay ở mức độ trung gian: nhạy cảm, trung gian hoặc kháng.

#### **2.6.5. Phân tích mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật PFGE**

**Mục đích:** Kỹ thuật PFGE được sử dụng để phân tích mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh. 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 AND của các chủng vi khuẩn

**Nguyên lý:** Kỹ thuật PFGE sử dụng những enzym phù hợp để cắt AND thành các phân đoạn khác nhau, các phân đoạn này được điện di để phân tách các đoạn từ 1-1000 kb. Các đoạn AND của các chủng vi khuẩn sẽ được so sánh để phân biệt sự giống và khác nhau của các chủng vi khuẩn.

#### **Các bước thực hiện:**

- Tách chiết ADN của vi khuẩn trong đệm thạch
- Lấy một khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn mang gen *mcr-1* và chủng chuẩn *Salmonella Braenderup* H9812 trên đĩa thạch LB được nuôi cấy qua đêm ở 37°C cấy vào 10ml môi trường LB lỏng, lắc 120 vòng/phút ở 37°C trong 6-8 giờ. Ly tâm 4000 vòng x 20 phút loại dịch nổi thu cặn tế bào vi khuẩn.
- Trộn cặn tế bào với 200  $\mu$ l dung dịch TE. Nhỏ 200 $\mu$ l dung dịch thạch Seakem gold 1%, (chuẩn bị trong đệm TBE, 0,5X), trộn đều và nhỏ hỗn dịch vào khuôn tạo gel để tạo plug, đợi cho đến khi thạch đông.
- Chuyển các plug sang các tube 2ml có chứa 2ml dung dịch ly giải tế bào (1mg/ml protein K, 1% N-lauroylsarcosin trong 0.5M EDTA pH 8.0).

- Ủ các tube ở 55°C qua đêm trong bể ủ nhiệt, lắc nhẹ nhàng. Cắt ADN vi khuẩn bằng enzym giới hạn XbaI.

- Cắt chromosomal ADN của vi khuẩn đã tách chiết trong thạch bằng Enzym giới hạn XbaI (cho *E. coli*, *Enterobacter spp.* và *K. pneumoniae*) và ApaI (cho *Acinetobacter*) nồng độ 40UI/ miếng thạch ở 37°C trong vòng 14-16 giờ.

- Sản phẩm cắt ADN sẽ được điện di bằng bộ điện di CHEF-DR III (Bio-Rad laboratories, Richmond, Calif) trên thạch Seakem gold 1%, ở hiệu điện thế 6V/cm trong 19 giờ ở nhiệt độ 140C, thời gian một xung từ 25 đến 60s và góc điện trường là 120 độ.

- Sau khi điện di gel sẽ được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide và chụp ảnh, các đoạn cắt ADN của các chủng vi khuẩn sẽ được so sánh với nhau và với chủng chuẩn *S. braenderup* H9812 được chạy song song để làm thang chuẩn.

- Phân tích mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn *E. coli* kháng colistin mang gen *mcr-1* bằng phần mềm Bionumeric- 6.5 để tạo cây phả hệ.

#### **2.6.6. Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen của vi khuẩn (Whole Genome Sequence - WGS)**

**Mục đích:** Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen nhằm xác định trình tự nucleotide của toàn bộ bộ gen của vi khuẩn từ đó có thể đánh giá được mối liên hệ kiểu gen, các gen kháng kháng sinh, các yếu tố di truyền động mang gen kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh.

Quy trình giải trình tự gen các chủng *E. coli* được mô tả chi tiết ở phần Phụ lục 7. Vật liệu nghiên cứu: Mô tả chi tiết ở Phụ lục 6

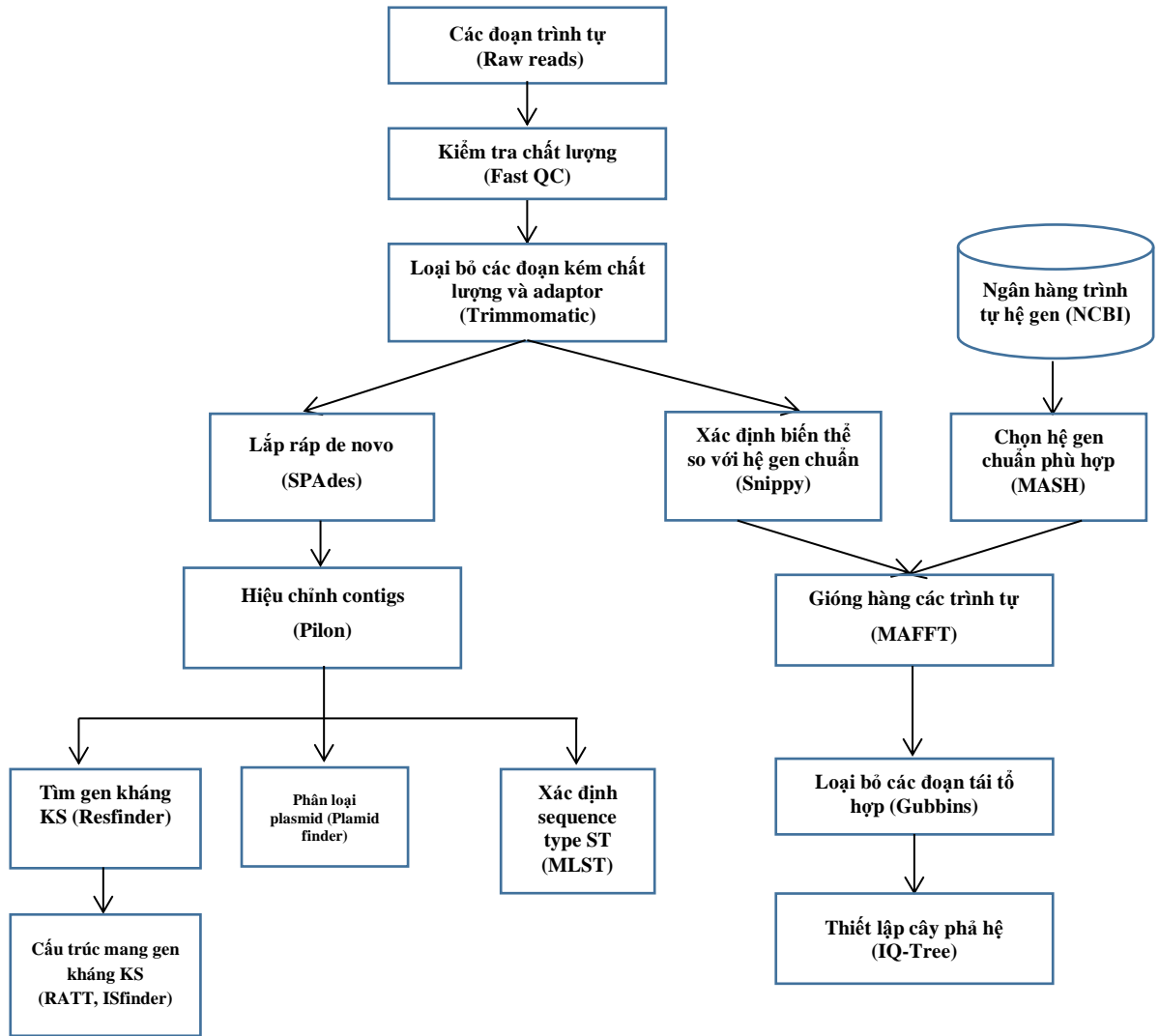
#### **Tóm tắt các bước thực hiện:**

- Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C từ 18- 24 giờ.

- Tách ADN tổng số bằng hệ thống tách chiết tự động QIAcube (Qiagen).

- Định lượng ADN bằng kit và máy đo nồng độ Qubit (ThermoFisher Scientific).

- Thiết lập thư viện ADN sử dụng kit NexteraXT (Illumina) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Giải trình tự gen bằng máy MiSeq (Illumina), sử dụng bộ kit MiSeq Reagent V3; 2x 300 chu kỳ).
- Thực hiện lắp ráp *de novo* assembly để xây dựng bộ gen của vi khuẩn của mỗi chủng từ dữ liệu các đoạn ADN ngắn trên phần mềm SPASdes v3.14.1[19]
- Sử dụng các phần mềm Resfinder, Plasmidfinder database để tìm gen kháng kháng sinh và phân loại plasmid. MLST được sử dụng để xác định kiểu trình tự của mỗi chủng vi khuẩn[93]
- IQ-TREE v1.6.11 được sử dụng để thiết lập cây phả hệ[72]
- Các bước xử lý và phân tích trình tự tiếp theo (Hình 2.2) được thực hiện tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (phối hợp với Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Trường Đại học Oxford - OUCRU).
- Phân tích *in silico* giúp xác định gen *mcr-1* nằm trên nhiễm sắc thể hay plasmid. Phối hợp kết quả phân tích dữ liệu của trình tự đọc ngắn (short-read) và trình tự đọc dài (long-read) của kỹ thuật Oxford Nanopore để xây dựng cấu trúc gen của plasmid mang gen *mcr-1*[126].



**Hình 2.2.** Các bước phân tích dữ liệu WGS để xác định các đặc điểm phân tử của chủng mang gen *mcr-1*

### 2.6.7. Kỹ thuật tiếp hợp đánh giá sự lan truyền gen *mcr -1* qua plasmid

Bước 1: Chuẩn bị chủng nhận:

+ Cấy chủng “nhận” *E. coli* J53 vào 5ml môi trường LB + 100 µg/ml Sodium azide (Sigma, Mỹ), ủ 37°C qua đêm.

+ Hút 50 µl hỗn dịch nuôi cấy chứa vi khuẩn *E. coli* J53 sang đĩa thạch MacConkey (Oxoid, Anh) + 100 µg/ml Sodium azide, ủ 37°C qua đêm.

+ Cấy chuyển 1 khuẩn lạc *E. coli* J53 sang bình tam giác chứa môi trường LB, ủ 37°C qua đêm, lắc nhẹ.

Bước 2: Chuẩn bị chủng cho:

+ Cấy chủng vi khuẩn “cho” (chủng có plasmid mang gen kháng kháng sinh *mcr-1* đã kiểm tra bằng PCR) lên đĩa thạch MacConkey có chứa 2 µg/ml meropenem, ủ 37°C qua đêm.

+ Chọn một khuẩn lạc chủng “cho” cấy sang 3ml canh thang LB có chứa 2µg/ml meropenem, ủ 37°C trong 5-6 giờ (OD 600=0,5).

Bước 3: Thực hiện tiếp hợp

- Ly tâm hỗn dịch nuôi cấy chứa chủng cho và chủng nhận: 6.000 vòng/phút x 5 phút. Loại bỏ nước nổi.

- Cho 600 µl nước muối sinh lý vào rửa cặn chủng.

- Ly tâm 6.000 vòng/phút x 5 phút. Loại bỏ nước nổi để lại 100 µl, bổ sung thêm 100 µl LB rồi nhẹ nhàng hòa tan cặn.

- Hoàn nguyên tube chứa *E. coli* J53 với 1 ml LB. Trộn nhẹ.

- Cho 100 µl cặn *E. coli* J53 vào mỗi tube có 100 µl cặn chủng nghiên cứu. Trộn nhẹ.

- Hút 25 µl hỗn hợp chủng cho và chủng nhận + 75 µl nước muối sinh lý cấy lên đĩa thạch MacConkey chứa 2 µg/ml MEM + 100 µg/ml Sodium azide, ủ 37°C qua đêm.

- Chỗ hỗn hợp còn lại ủ tiếp 2 tiếng rồi hút 25 µl hỗn hợp chủng cho và chủng nhận + 75 µl nước muối sinh lý cấy lên đĩa thạch MacConkey có 2 µg/ml MEM + 100 µg/ml Sodium azide, ủ 37°C qua đêm.

Bước 4: Xác định kết quả tiếp hợp

- Chọn khuẩn lạc *E. coli* J53 màu đỏ tươi mọc trên môi trường chọn lọc (chứa sodium azide và meropenem) cấy sang đĩa thạch MHA.

- Kiểm tra các gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* J53 bằng kỹ thuật PCR (như mục 2.6.2). Các chủng *E. coli* J53 có mang gen *mcr-1* là bằng chứng chứng minh thực nghiệm tiếp hợp đã thành công trong việc truyền gen qua plasmid từ các “chủng cho” là các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid.

## 2.7. Biến số và chỉ số trong nghiên cứu

- Thông tin chung về các loại mẫu thu thập được: loại mẫu, số lượng mẫu, địa điểm, thời gian thu thập mẫu

- Số lượng chủng *E. coli* thu thập được từ các loại mẫu: mẫu phân người, mẫu phân động vật (chó, gà, vịt, lợn), mẫu thịt (lợn, gà), mẫu môi trường (nước mưa, nước giếng, nước tưới).

- Tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin được phân lập từ phân người.

- Tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin được phân lập từ các mẫu phân động vật nuôi

- Tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin được phân lập từ thực phẩm (thịt, rau)

- Tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin được phân lập từ nước (nước mưa, nước giếng, nước tưới).

- Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin.

- Mối liên hệ kiểu gen các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin bằng kỹ thuật PFGE.



- Môi liên hệ về kiểu gen và sequence type của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu.

- Cơ chế lan truyền qua trung gian plasmid của các chủng vi khuẩn mang gen *mcr-1*

- Cấu trúc của các yếu tố di truyền di động mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được trong nghiên cứu. So sánh với cấu trúc của các yếu tố di truyền di động mang gen *mcr-1* của một số chủng *E. coli* phân lập trên lâm sàng.

## 2.8. Phương pháp thu thập thông tin

Các thông tin được thu thập theo phiếu điều tra in sẵn và được tiến hành bởi các nghiên cứu viên đã được tập huấn (Phụ lục 1)

## 2.9. 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

## 2.10. Khống chế sai số

- Các qui trình lấy mẫu được thực hiện theo quy trình chuẩn của dự án ICF Ha Nam VN V1.1(Phụ lục 1).

- Chủng chuẩn quốc tế *E. coli* ATCC 25922 được thử nghiệm song song với các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* về tính nhạy cảm kháng sinh theo tiêu chuẩn CLSI mới cập nhật

- Sử dụng các đoạn môi đặc hiệu để phát hiện gen *mcr-1* bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen

- Giải trình tự toàn bộ bộ gen được thực hiện tại viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Bộ dữ liệu thu được đảm bảo chất lượng với Q score >30

## 2.11. Đạo đức trong nghiên cứu

Đảm bảo các nguyên tắc đạo đức trong nghiên cứu y sinh học

- Đối tượng được cung cấp thông tin và đồng ý tham gia nghiên cứu

- Thông tin được bảo mật
- Nguy cơ thấp đối với đối tượng tham gia nghiên cứu
- Bệnh nhân được thông báo kết quả xét nghiệm và được tư vấn
- Nghiên cứu đã được chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học trước khi triển khai. Giấy chấp thuận của hội đồng đạo đức trong nghiên cứu sinh số IRB-VN1057-38/2016.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

**3.1.1. Đặc điểm chung về các loại mẫu được thu thập trong nghiên cứu**

**Bảng 3.1. Số lượng các loại mẫu thu thập theo các thôn và hộ gia đình tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam năm 2015**

Địa điểm thu thập(thôn)	Số hộ được thu thập	Số mẫu phân người thu thập	Số mẫu phân động vật được thu thập	Số mẫu thực phẩm được thu thập	Số mẫu môi trường được thu thập
An Hòa	6	19	9	12	19
Quang Trung	10	37	19	19	23
Dương Xá	16	49	23	36	32
Ứng Liêm	11	41	20	22	26
Hòa Ngãi	17	56	15	29	36
Mẫu Chủ	13	45	20	27	25
Thạch Tổ	7	18	16	14	18
<b>Tổng số</b>	<b>80</b>	<b>265</b>	<b>122</b>	<b>159</b>	<b>179</b>

Nghiên cứu sử dụng các mẫu phân người (n=265), phân động vật nuôi trong nhà (n=122), mẫu thức ăn của các hộ gia đình(n=159) và mẫu nước của các hộ gia đình bao gồm nước mưa, nước giếng và nước tưới (n=179) được thu thập vào tháng thứ 2 của nghiên cứu thuần tập tiến cứu kéo dài trong 6 tháng ở 80 hộ gia đình thuộc 7 thôn của xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam trong năm 2015. Các mẫu được lựa chọn ngẫu nhiên.

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

Các mẫu được lựa chọn đã được cấy trên môi trường thạch MacConkey có chứa 0,5 µg/ml. Trên mỗi mẫu cấy, lựa chọn từ 1-5 khuẩn lạc màu hồng (khuẩn lạc *Enterobacteriaceae*). Các chủng *Enterobacteriaceae* được tiếp tục làm PCR để phát hiện gen *mcr-1* và được định danh để xác định các chủng *E. coli* gen *mcr-1*. Kết quả thu được như sau:

**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**

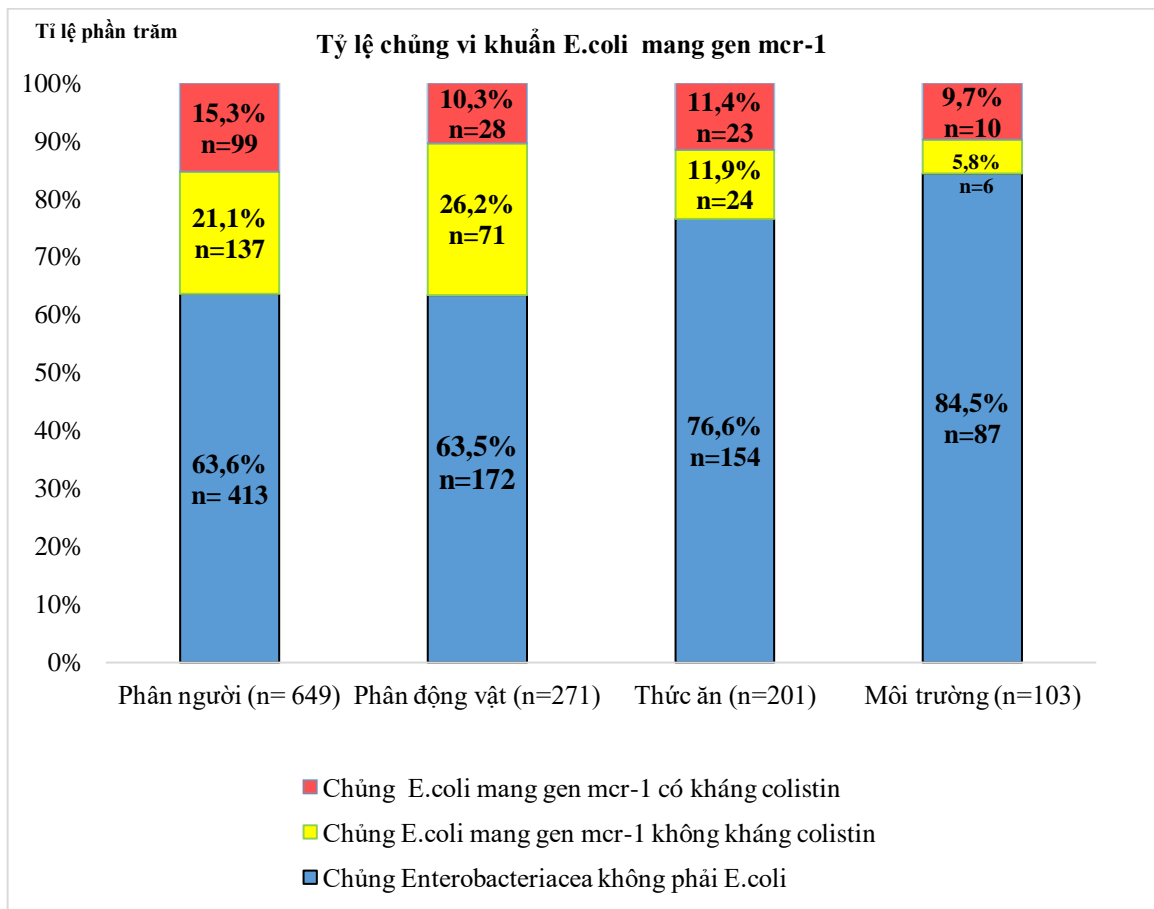
Loại mẫu	Tổng số mẫu	Số mẫu có chủng <i>Enterobacteriaceae</i> mọc trên môi trường MAC + 0.5 µg/ml colistin	Tỷ lệ mẫu có <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i>	
			Số lượng	Tỷ lệ (%)
Phân người (PN)	265	221(83,3%)	97	36,6
Phân động vật nuôi (PĐVN)	122	97 (79,5%)	42	34,4
Thức ăn (TĂ)	159	72 (72,5%)	6	3,8
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 µg/ml colistin có 546 mẫu có *Enterobacteriaceae* (khuẩn lạc màu hồng) chiếm 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%.

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

Tổng số chủng *Enterobacteriaceae* thu thập được từ tất cả các loại mẫu là 1224 chủng. Sau khi làm PCR và định danh để xác định *E. coli* mang gen *mcr-1*, các chủng *E. coli* này được tiếp tục xác định MIC đối với colistin bằng kỹ thuật kháng sinh vi pha loãng trong thạch. Kết quả thu được như sau:

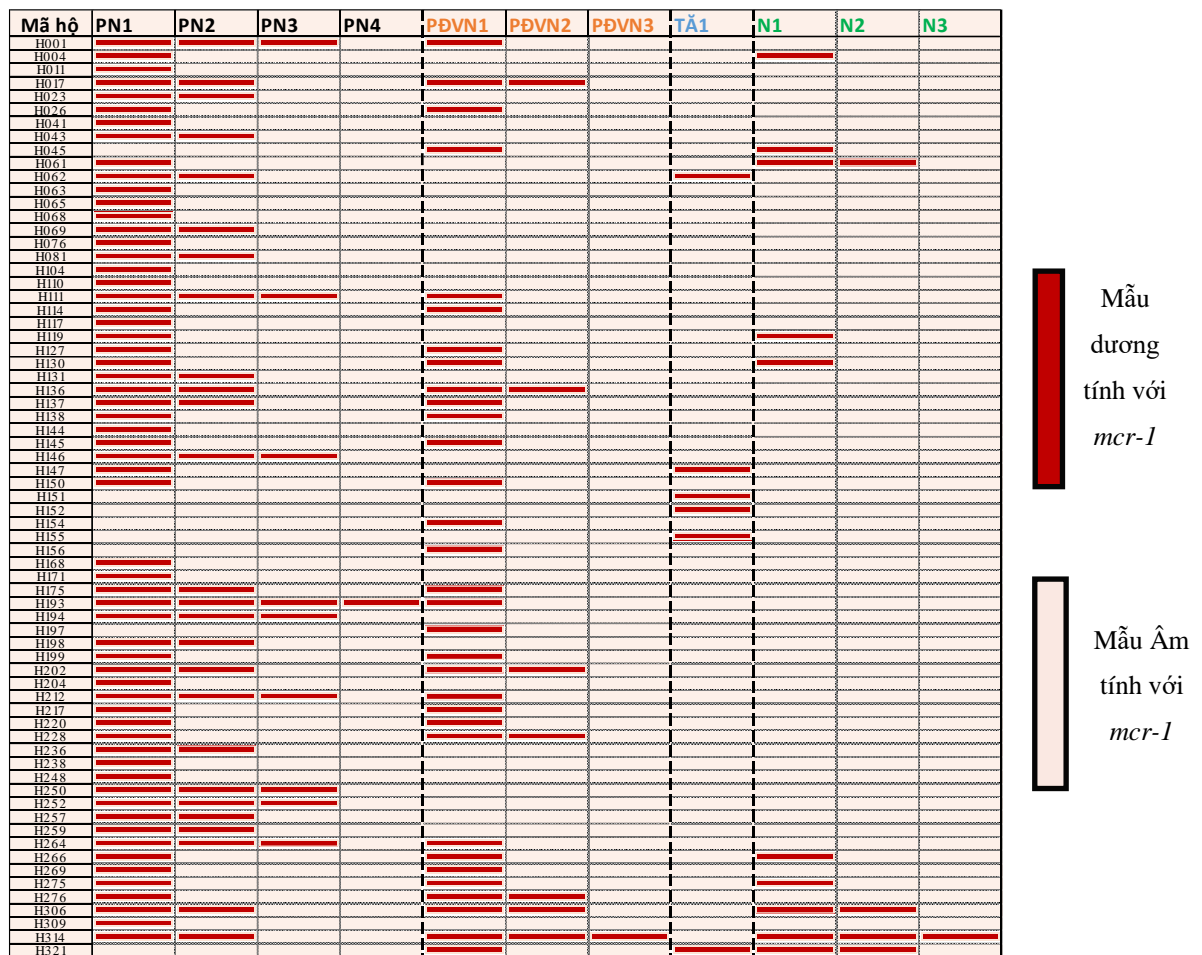


**Biểu đồ 3.1: Tỷ lệ chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được từ người, động vật nuôi, thực phẩm và nước**

Trong số 1224 chủng *Enterobacteriaceae* phân lập được có 649 phân lập được từ phân người, 271 chủng phân lập được từ phân động vật nuôi, 201 chủng phân lập được từ thức ăn và 103 chủng phân lập được từ nước. Trong đó có 398 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* (Biểu đồ 3.1). Trong số 398 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có: 236 chủng phân lập từ phân người chiếm 36,4% trong đó 15,3% có biểu hiện kiểu hình kháng colistin và 21,1% chỉ có biểu hiện kiểu gen; 99 chủng phân lập từ phân

động vật chiếm 36,6% trong đó 10,3% có biểu hiện kiểu hình và 26,2% có biểu hiện kiểu gen; 47 chủng phân lập từ thức ăn chiếm 23,3% trong đó 11,4% có biểu hiện kiểu hình và 11,9% có biểu hiện kiểu gen; 16 chủng phân lập từ nước chiếm 15,5% trong đó 9,7% có biểu hiện kiểu hình và 5,8% có biểu hiện kiểu gen (Biểu đồ 3.1).

Sự phổ biến của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong các loại mẫu (phân người, phân động vật nuôi, thức ăn, nước) trong hộ gia đình được thể hiện ở biểu đồ heatmap với mỗi dòng ngang là số mẫu phân người, động vật nuôi, thức ăn và nước của một hộ gia đình. Màu đỏ là các mẫu được xác định có *E. coli* mang gen *mcr-1*, màu hồng là mẫu không có *E. coli* mang gen *mcr-1*:



Ghi chú: PN1, PN2, PN3, PN4: các mẫu phân người trong cùng hộ gia đình; PĐVN1, PĐVN2, PĐVN3: các mẫu phân động vật trong cùng hộ gia đình; TĂ: Mẫu thức ăn trong hộ gia đình; N1, N2, N3: Các mẫu nước trong cùng hộ gia đình

**Biểu đồ 3.2: Heatmap sự phân bố của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở 69 hộ gia đình**

Khi xác định sự phổ biến của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong các loại mẫu (phân người, phân động vật nuôi, thức ăn, nước) trong hộ gia đình, kết quả nghiên cứu cho thấy: Chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được tìm thấy ở 69/80 hộ gia đình lấy mẫu nghiên cứu. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được tìm thấy cả ở mẫu phân của các cá thể sống trong cùng hộ gia đình và/hoặc phân động vật và/hoặc thức ăn và/hoặc nước uống trong cùng một hộ gia đình. Tỷ lệ tìm thấy > 2 loại mẫu trong cùng hộ gia đình có chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* là 47,8% (33/69 hộ). Tỷ lệ hộ gia đình có > 2 người cùng sống trong một hộ gia đình đều có chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* là 37,7% (26/69 hộ) (Biểu đồ 3.2)

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

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

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 µg/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*



**3.1.6. Mức độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong phân người và động vật nuôi, thức ăn và nước**

**Bảng 3.5: Kết quả thử nghiệm nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu với các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1***

Mức độ kháng	Loại mẫu	AM	CAZ	CTX	FEP	GM	AK	CIP	IMP	MEM	SXT
<b>Kháng</b>	PN	<b>97,6</b> (160/164)	9,8 (16/164)	7,9 (13/164)	4,3 (7/164)	<b>49,4</b> (81/164)	1,2 (2/164)	<b>39,6</b> (65/164)	0	0	<b>93,9</b> (154/164)
	PĐVN	<b>98,5</b> (64/65)	0	4,6 (3/65)	0	<b>29,2</b> (19/65)	0	<b>47,7</b> (31/65)	0	0	<b>89,2</b> (58/65)
	TĂ	<b>100</b> (16/16)	0	0	0	<b>43,75</b> (7/16)	6,25 (1/16)	<b>81,3</b> (13/16)	0	0	<b>81,3</b> (13/16)
	N	<b>100</b> (32/32)	0	0	0	<b>31,3</b> (10/32)	0	<b>31,3</b> (10/32)	0	0	<b>96,9</b> (31/32)
<b>Trung gian</b>	PN	0	0	0	0,6 (1/164)	0,6 (1/164)	0,6 (1/164)	0	0	<b>1,2</b> (2/164)	0
	PĐVN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TĂ	0	0	0	0	0	0	0	12,5 (2/16)	0	0
	N	0	0	0	0	0	0	0	9,48 (3/32)	0	0
<b>Nhạy</b>	PN	2,4 (4/164)	90,2 (148/164)	92,1 (151/164)	95,1 (156/164)	50,0 (82/164)	98,2 (161/164)	60,4 (99/164)	100 (164/164)	98,8 (162/164)	6,1 (10/164)
	PĐVN	1,5 (1/65)	100 (65/65)	95,4 (62/65)	100 (65/65)	70,8 (46/65)	100 (65/65)	52,3 (34/65)	100 (65/65)	100 (65/65)	10,8 (7/65)
	TĂ	0	100 (16/16)	100 (16/16)	100 (16/16)	56,3 (9/16)	93,8 (15/16)	18,8 (3/16)	87,5 (14/16)	100 (16/16)	18,8 (3/16)
	N	0	100 (32/32)	100 (32/32)	100 (32/32)	68,7 (22/32)	100 (32/32)	68,7 (22/32)	90,6 (29/32)	100 (32/32)	3,1 (1/32)

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

Kết quả thử nghiệm nồng độ kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong phân người, phân động vật nuôi, thức ăn và nước cho thấy: các chủng có mức độ đề kháng cao với các nhóm kháng sinh thông thường, nhiều chủng kháng có MIC ở ngưỡng cao. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.5: Các chủng *E. coli* đề kháng kháng sinh ampicillin (thấp nhất 97,6%- cao nhất 100%) phần lớn các chủng kháng có MIC với ampicillin > 128µg/ml. Các chủng *E. coli* đề kháng gentamicin có tỉ lệ thấp nhất 29,2% và cao nhất 49,4%), đa số các chủng kháng

gentamycin có MIC  $\geq$  64  $\mu\text{g/ml}$  (70/109 chủng). Các chủng *E. coli* đề kháng ciprofloxacin (thấp nhất 39,6% - cao nhất 81,3%), trong đó trên 50% số chủng kháng có MIC  $\geq$  16  $\mu\text{g/ml}$  (60/114 chủng). SXT có tỷ lệ đề kháng rất cao, tỉ lệ thấp nhất 71,7% và cao nhất 93,9% với MIC  $>$ 16  $\mu\text{g/ml}$  chiếm 238/240 chủng.

**Bảng 3.6. Số lượng các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* đa kháng kháng sinh**

Loại mẫu	Tổng số chủng (n)	Số chủng kháng $\geq$ 3 KS	Số chủng kháng toàn bộ kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam
PN	164	87 (53,1%)	6 (3,7%)
PĐVN	65	32(49,2%)	1 (1,5%)
TĂ	16	13 (81,3%)	0 (0%)
N	32	11 (34,4%)	0 (0%)
Tổng số	277	143 (51,6%)	7 (2,5%)

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

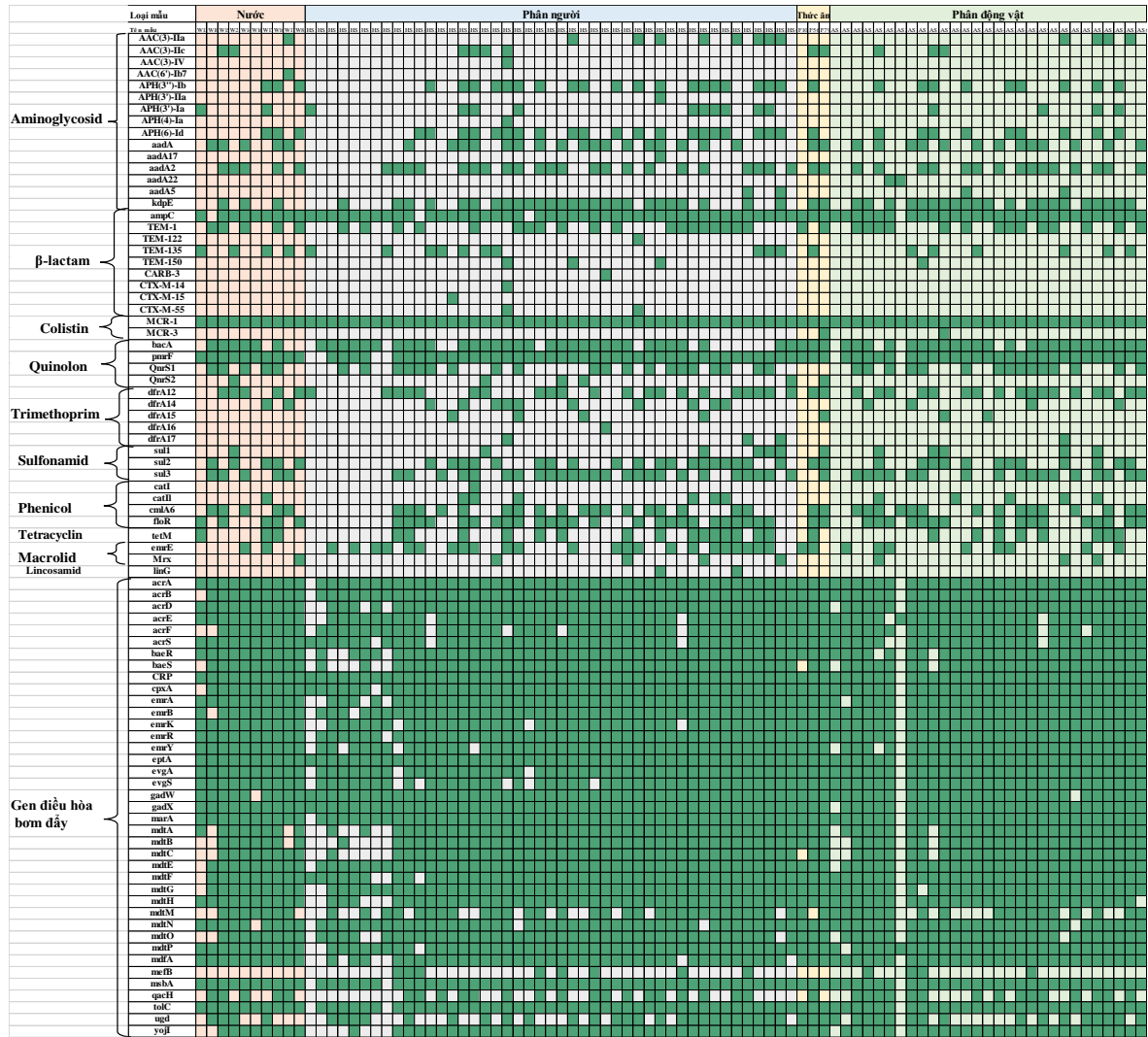
Bảng 3.6 cho thấy tỷ lệ các chủng mang gen đa kháng kháng sinh chiếm tỷ lệ rất cao. Tỷ lệ chủng *E. coli* kháng từ 3 nhóm kháng sinh trở lên là  $>$ 50%. Đặc biệt có 7 chủng kháng toàn bộ kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam bao gồm 6 chủng phân lập từ phân người và 1 chủng phân lập từ phân động vật

Nghiên cứu đã thực hiện thử uônghiệm phát hiện khả năng sinh ESBL của 277 chủng này. Kết quả cho thấy trong số các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu, có 7 chủng sinh ESBL bao gồm: 4 chủng phân lập từ phân người và 3 chủng phân lập từ phân động vật. Có 2 chủng phù hợp giữa kiểu hình và kiểu gen: có sinh ESBL và biểu hiện kiểu hình là kháng toàn bộ nhóm  $\beta$ -lactam.

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. Các gen kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*

Giải trình tự toàn bộ bộ gen 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*, kết quả phân tích các gen kháng kháng sinh như sau:



**Chú giải**

Biểu đồ 3.3: Heatmap sự có mặt các gen KKS của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được xác định bằng giải trình tự toàn bộ bộ gen (n=87)

Giải trình tự toàn bộ bộ gen của 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*, nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện được 46 loại gen KKS của 9 nhóm kháng sinh. Số lượng gen KKS nhiều nhất là: gen KKS nhóm  $\beta$ -lactam (*ampC* -95,4%; *blaTEM-1*-54,0%; *blaTEM-135*-24,1%); gen KKS nhóm aminoglycoside (*kdpE*-58,6; *aadA2*-49,5%; *aadA*-42,5%; và *APH6-Id*-39,8%; *AAC(3)-IIa*-14,9%; *AAC(3)-IIb*-11,5%); gen KKS nhóm quinolone (*qnrS1*-43,7% và *qnrS2*-5,8%); gen KKS trimethoprim (*dfrA12*-49,4%; *dfrA14*-19,5%) và sulfonamid (*sul1*-12,6%; *sul2*-44,8%; *sul3*-56,3%); gen KKS nhóm phenicol (*catII*-13,8%; *cmlA6*-44,8%; *floR*-52,8%); gen KKS nhóm tetracyclin (*tetM*-32,2%) (Biểu đồ 3.3)

**Bảng 3.7. Phân bố các gen KKS theo loại mẫu và tỷ lệ kháng kháng sinh của các mẫu giải trình tự**

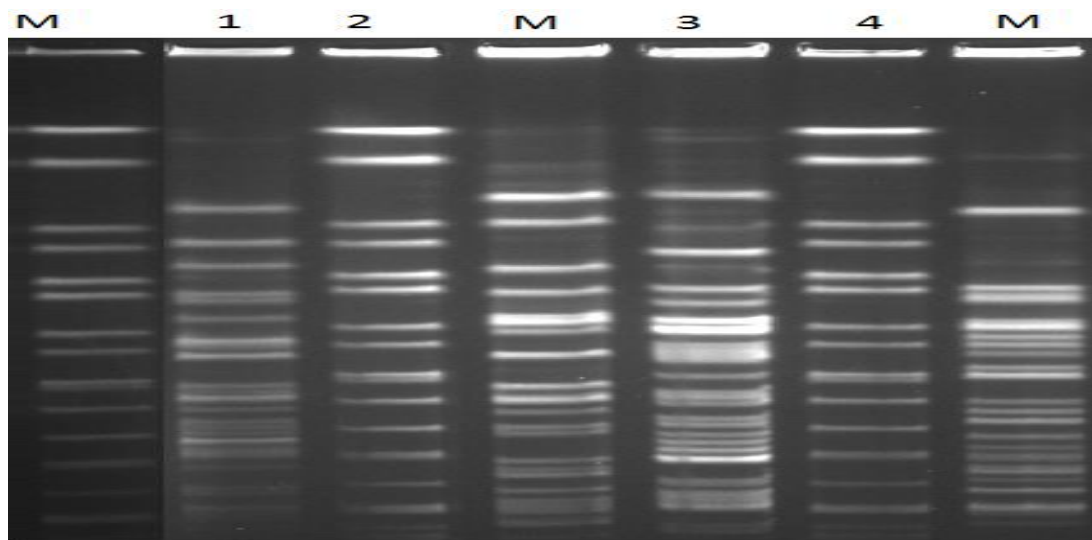
KS	PN		PĐVN		TẢ		N	
	Tỷ lệ KKS (%) n=52	Tỷ lệ mang gen (%) n=52	Tỷ lệ KKS (%) n=32	Tỷ lệ mang gen (%) n=32	Số chủng KKS n=3	Số chủng mang gen n=3	Số chủng KKS n=10	Số chủng mang gen n=10
AM	94,2	100	96,9	100	3	3	10	10
CAZ	9,6	34,6	0	21,9	0	3	0	4
CTX	9,6		3,1		0		0	
FEP	5,8		1		0		0	
GEN	42,3	73,1	37,5	81,3	n= 2	2	3	9
AK	0		0		n= 1		0	
CIP	44,2	51,9	50	50	n=3	1	4	6
IMP	0	0	0	0	0	0	0	0
MEM	0		0		0			
SXT	90,4	76,9	84,4	81,3	3	2	10	8

Nhận xét: Bảng 3.7 cho thấy các chủng *E. coli* phân lập từ mẫu phân người và phân động vật đều có biểu hiện kiểu gen và kiểu hình KKS ampicillin rất cao (100% và 94,2%). Các KS nhóm cephalosporin bao gồm Ceftazidim (CAZ), Cefotaxim (CTX) và Cefepim (FEP) tuy có biểu hiện ở kiểu hình KKS còn thấp (9,6%, 9,6%, 5,8% ở người và 0%, 3,1%, 1,0% ở động vật) nhưng tỷ lệ các chủng mang gen KKS ở nhóm này khá cao. Tỷ lệ mang gen KKS nhóm này ở các mẫu phân người là 34,6% và ở phân động vật là 21,9%. Chưa phát hiện được chủng và gen KKS nhóm carbapenem. Nhóm KS quinolon (CIP) có tỷ lệ kháng cao và tỷ lệ KKS của kiểu hình và kiểu gen tương đương nhau trong khi đó nhóm SXT lại có tỷ lệ KKS ở kiểu hình cao hơn kiểu gen ở cả mẫu phân người và phân động vật.

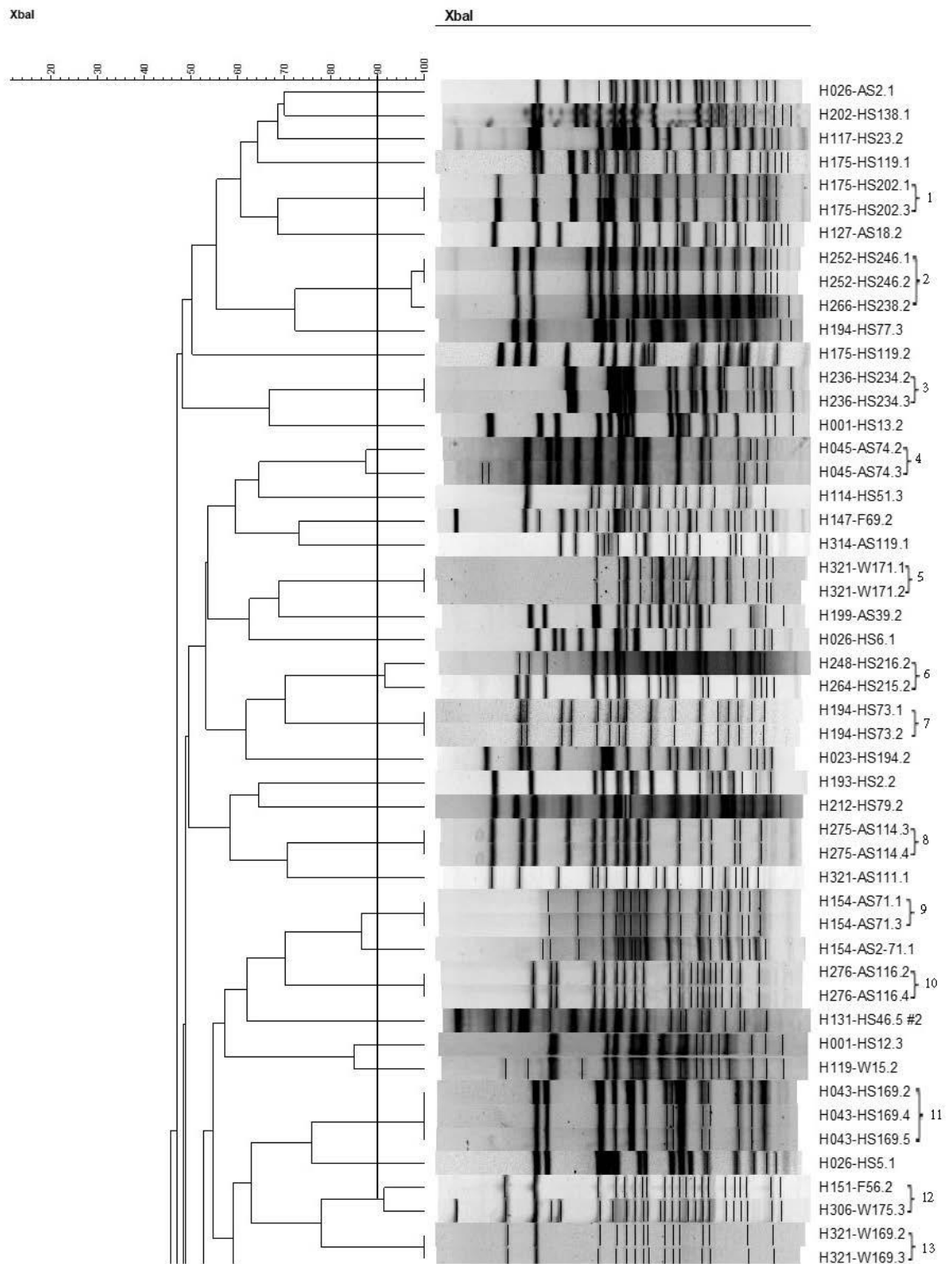
Nghiên cứu không đánh giá tỷ lệ KKS của các chủng *E. coli* phân lập từ nước và thức ăn do số chủng phân lập được quá ít.

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

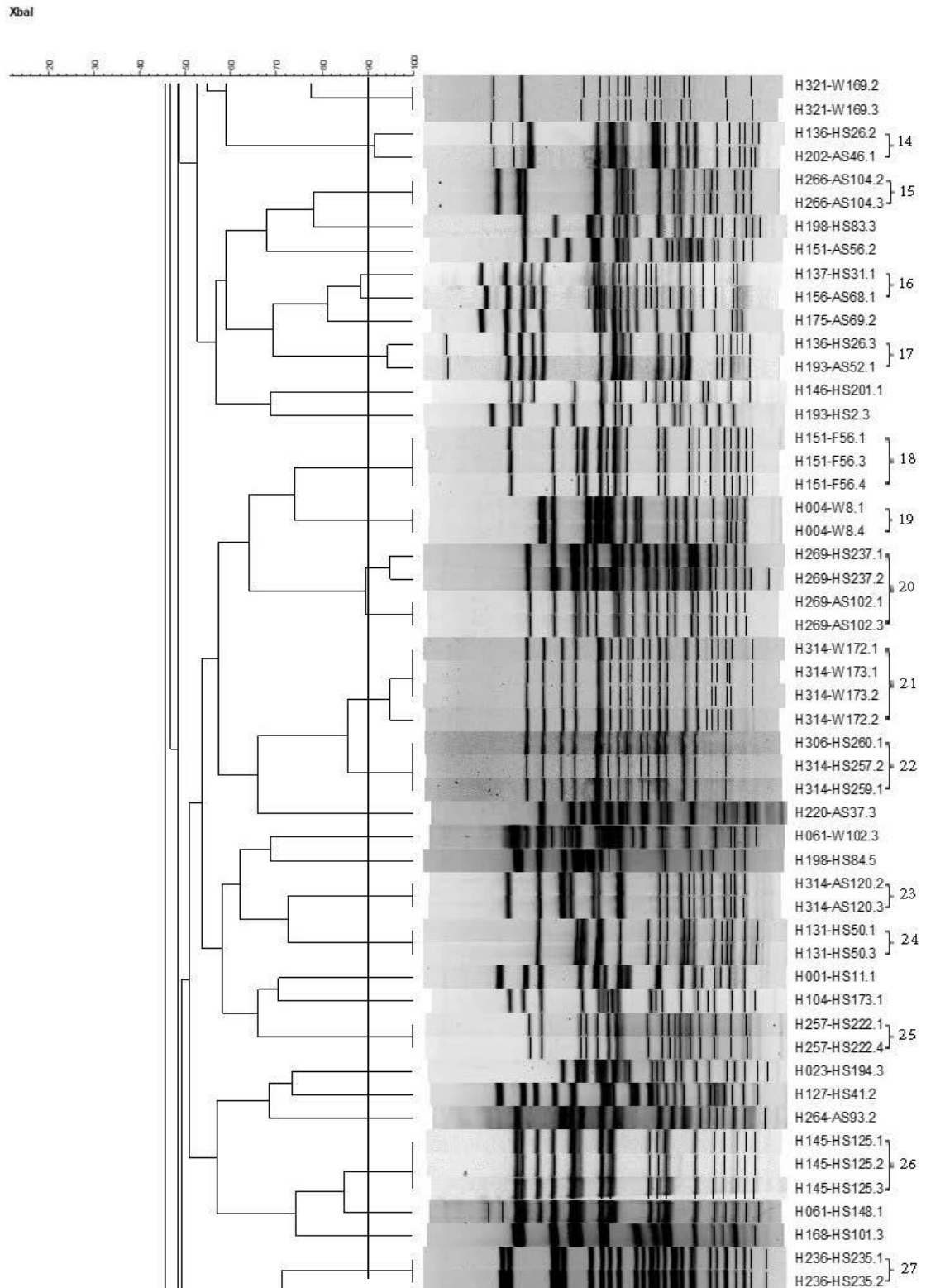
3.2.2.1. Xác định mối liên hệ về kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bằng kỹ thuật PFGE



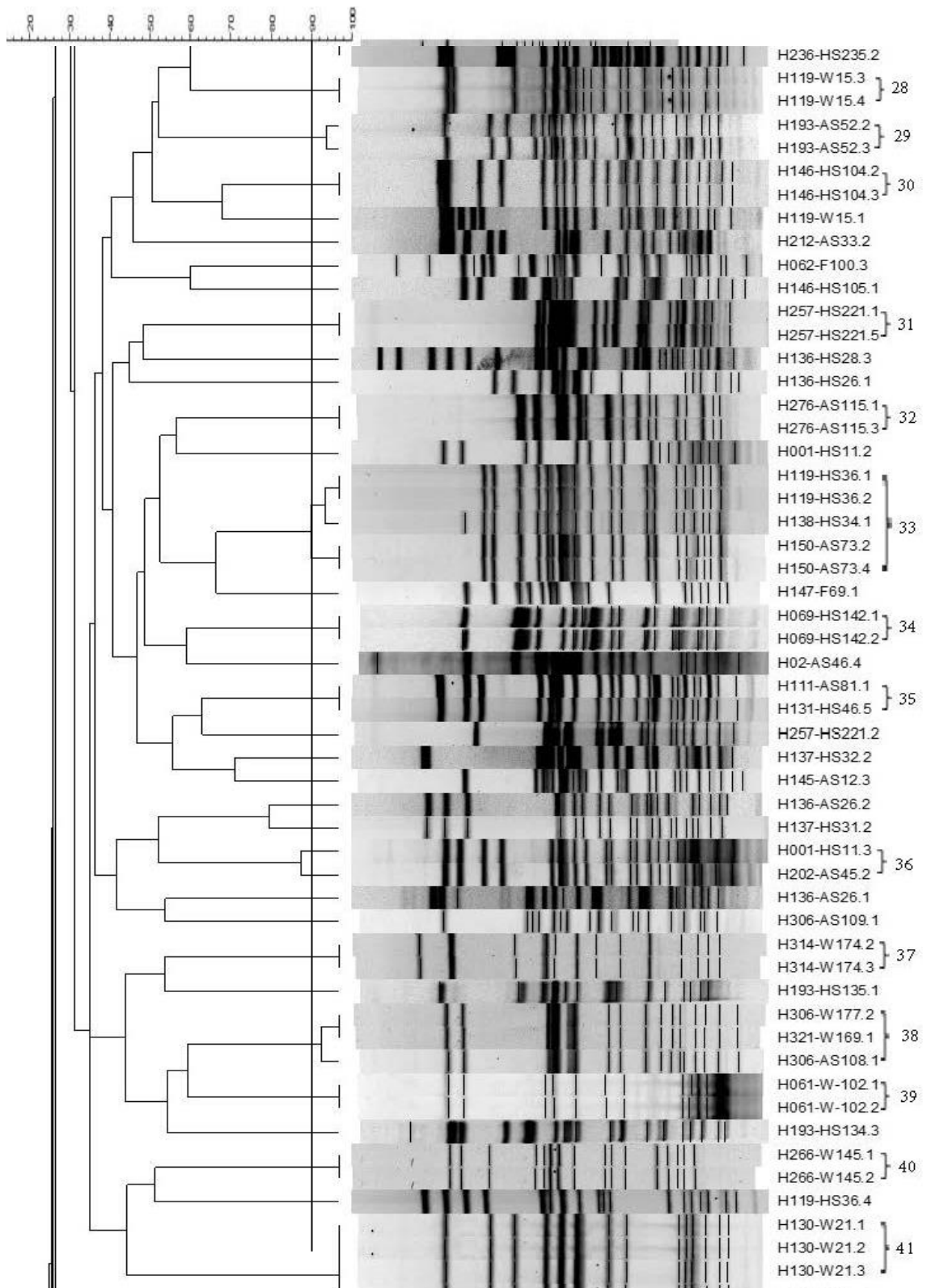
Hình 3.1: Hình ảnh đại diện kết quả điện di xung trường của đại diện một số chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được



**Hình 3.2: Mối liên hệ kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại Hà Nam**

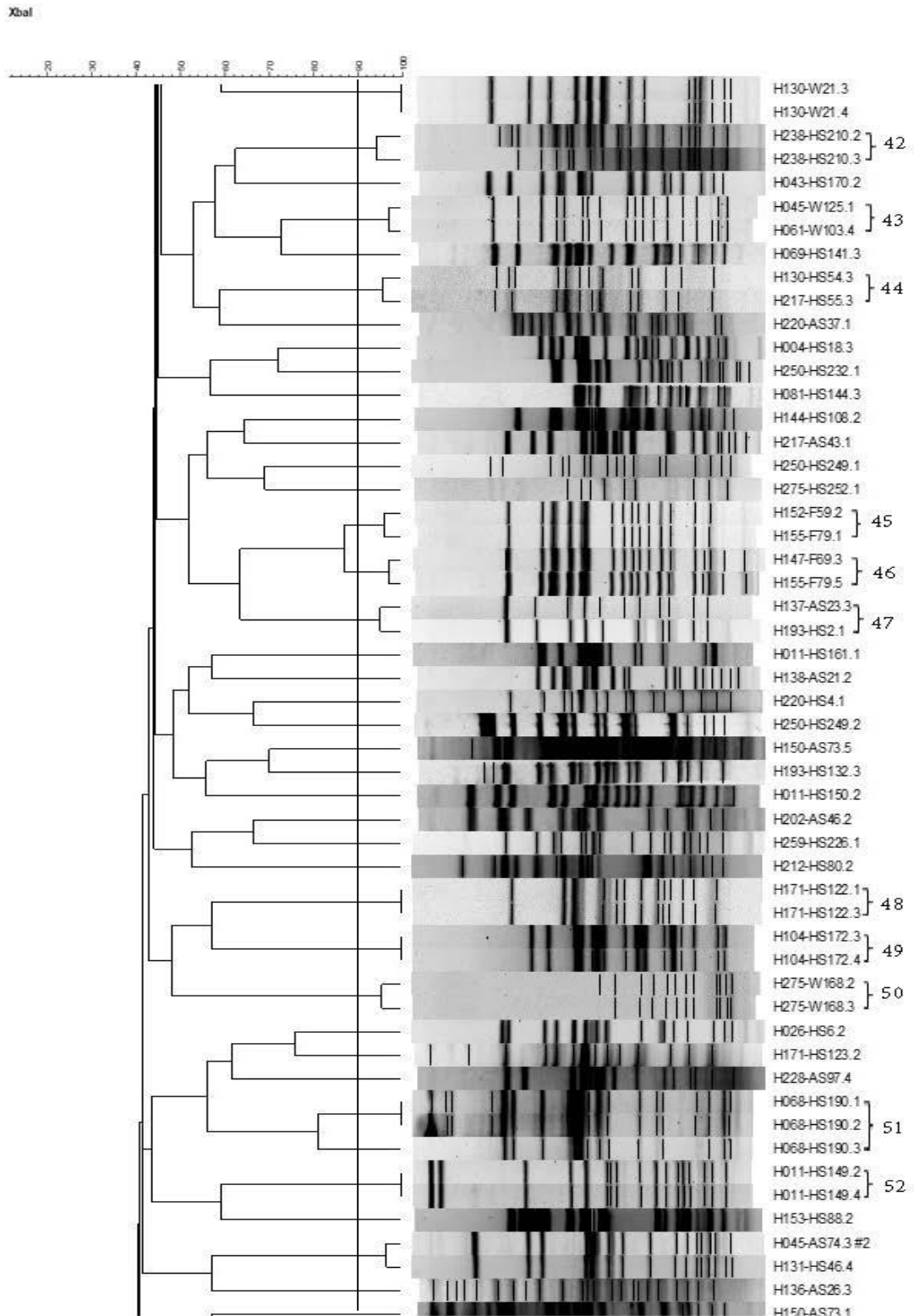


**Hình 3.3: Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại Hà Nam (tiếp)**

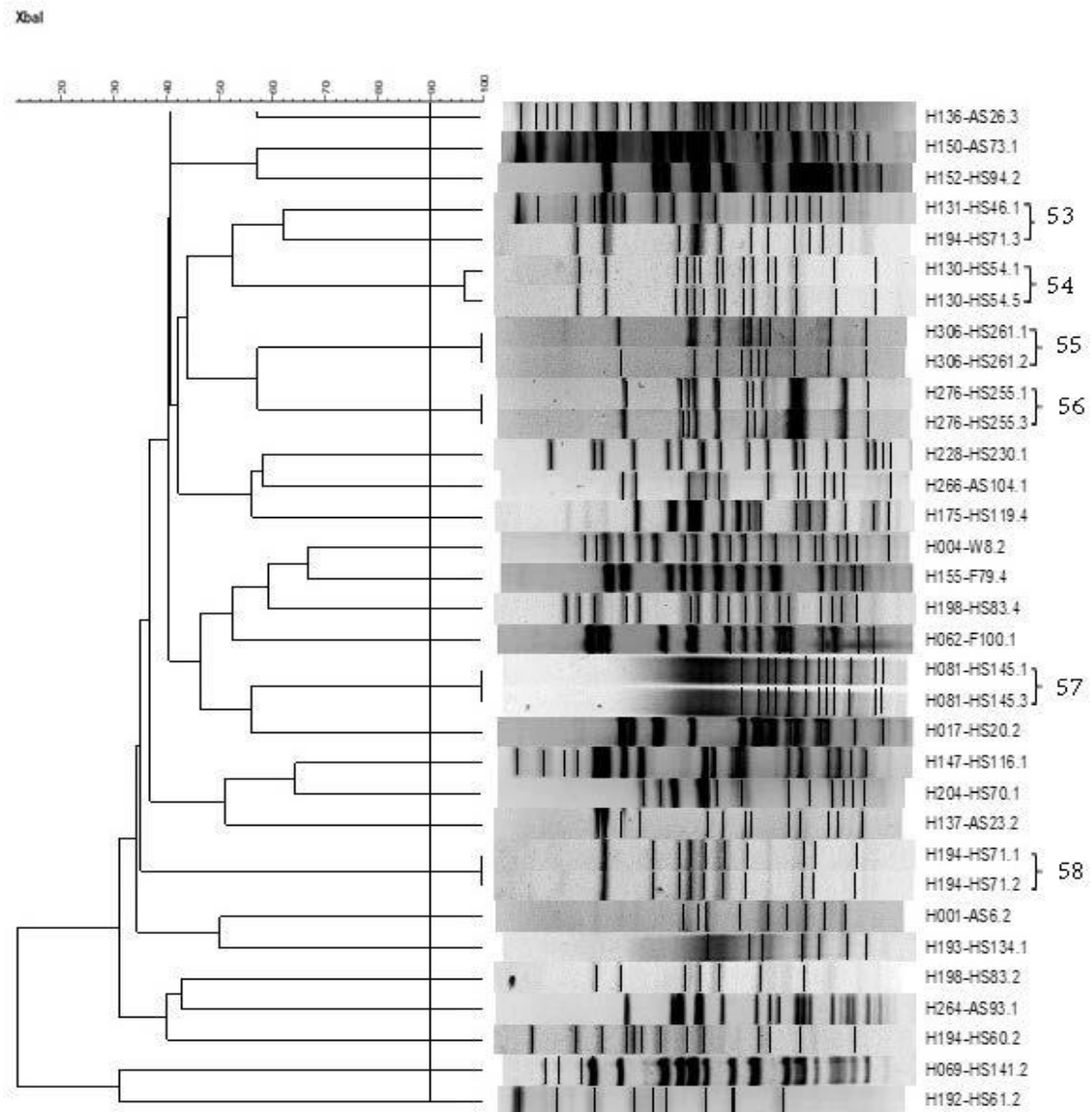


**Hình 3.4: Môi liên hệ kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại Hà Nam (tiếp)**





**Hình 3.5: Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại Hà Nam (tiếp)**



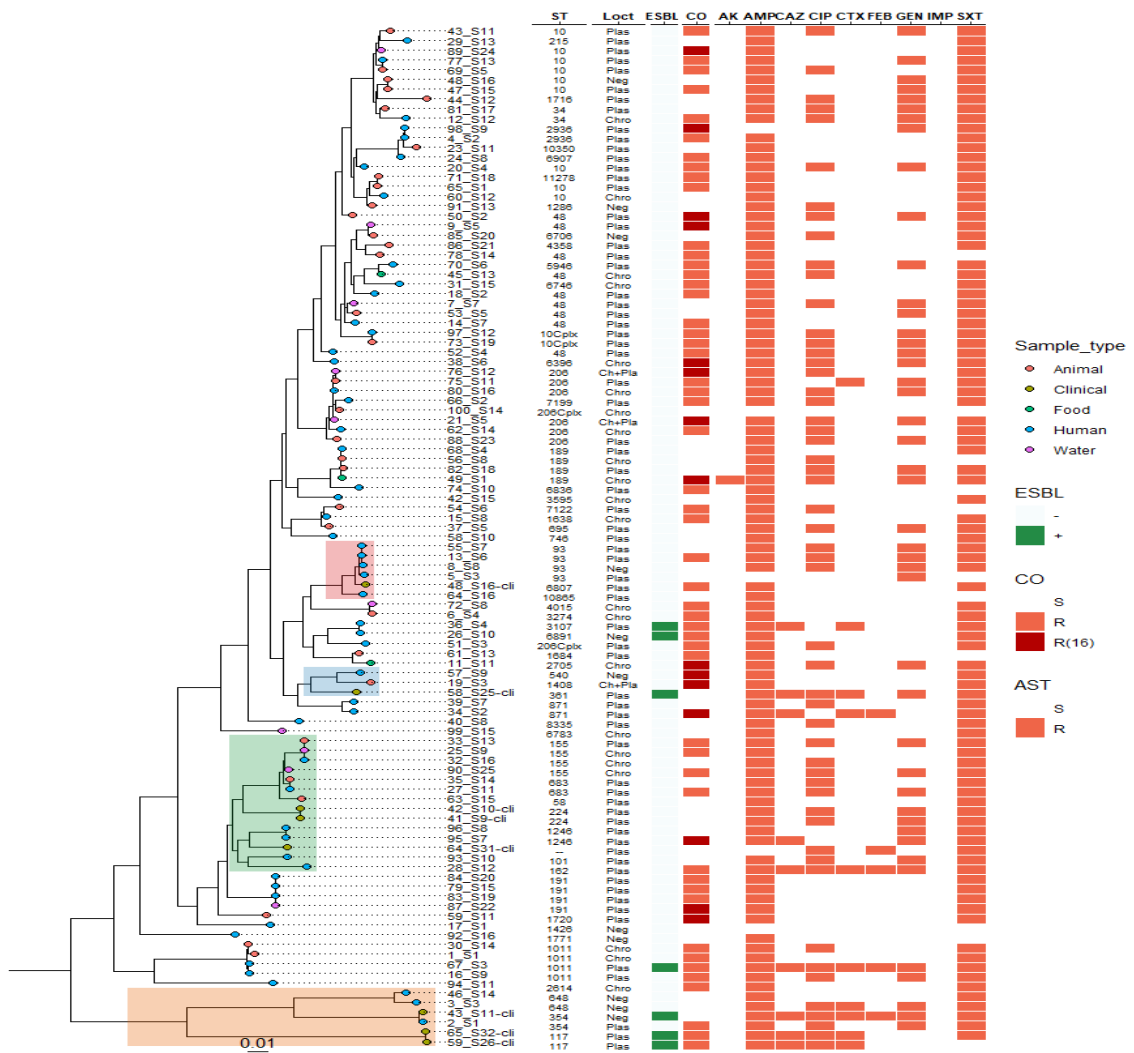
**Hình 3.6: Mối liên hệ về kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập tại Hà Nam (tiếp)**

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.

### 3.2.3. 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 bộ 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.

**Bảng 3.8. Tỷ lệ phân bố các STs trong quần thể các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được**

Loại mẫu	Tổng số mẫu (n)	Tổng số STs	Các ST phổ biến
PN	45	37	ST10 (n=3); ST48 (n=3); ST93 (n=3); ST191 (n=3)
PĐVN	29	22	ST10 (n=4); ST48 (n=3)
TĂ	3	3	ST48; ST189; ST2075
N	10	7	ST48 (n=2); ST155 (n=2); ST206 (n=2)
Tổng	87	56	ST48 (n=9); ST10 (n=8); ST206 (n=7)

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

Bảng 3.8 cho thấy các ST phổ biến trong cộng đồng bao gồm ST48 (10,3%; n=9); ST10 (9,2%; n=8); ST206 (8,1%; n=7)

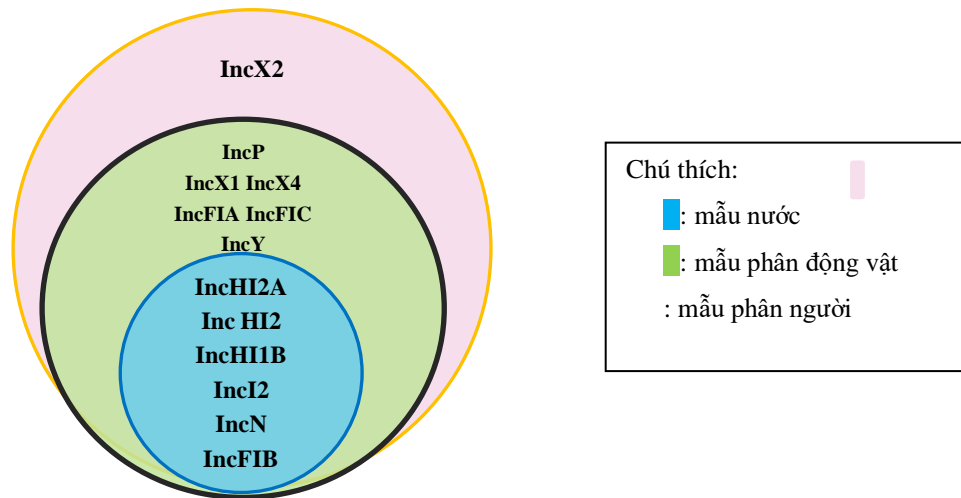
**Bảng 3.9. Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có cùng STs chung được phân lập từ các loại mẫu trong cùng hộ gia đình**

ST chủng	Mã hộ	Mã mẫu	Loại mẫu	<i>mcr-1</i> chromosom/ <i>mcr-1</i> plasmid	Loại plasmid mang gen <i>mcr-1</i>
155	H137	H32.2	PN	chromosom	
		AS23.2	PĐVN	Plasmid	IncHI1B, Inc X1
10	H154	AS71.1	PĐVN	Plasmid	IncI2
		AS71.3	PĐVN	Plasmid	IncI2
48	H175	H202.2	PN	Plasmid	IncHI1B, IncHI2A IncN
		AS69.2	PĐVN	Plasmid	IncX4
206	H275	AS114.4	PĐVN	Plasmid	IncI2
		W168.2	N	Plasmid	IncI2
191	H314	H257.2	PN	Plasmid	IncHI1B, IncHI2A
		H259.1	PN	Plasmid	IncHI2, IncN
		W173	N	Plasmid	IncHI2A, IncHI2, IncN

Bảng 3.9 cho thấy: có 5/69 (7,25%) hộ có tìm thấy các chủng có cùng ST được phân lập từ các loại mẫu khác nhau như từ mẫu của người - động vật, mẫu động vật-nước, mẫu người-người và mẫu từ người - nước trong cùng một hộ gia đình

### 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*

#### 3.3.1. Xác định đặc điểm của các plasmid mang gen *mcr-1*



**Biểu đồ 3.4:** Biểu đồ Venn các loại replicon của plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli*. (Các replicon nằm ở các đường tròn khác nhau là các replicon của các plasmid nằm trên các loại mẫu khác nhau).

Biểu đồ 3.4 cho thấy có 6 loại replicon của plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập từ các mẫu nước. 06 type này cũng được tìm thấy ở các chủng *E. coli* phân lập từ phân động vật và phân người. Các chủng *E. coli* phân lập từ phân người và phân động vật nuôi đều có chung 12 type plasmid mang gen *mcr-1*. Có 1 type plasmid mang gen *mcr-1* (IncX2) chỉ có ở chủng phân lập từ phân.

**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

Bảng 3.10 trình bày về số lượng và các loại plasmid mang gen *mcr-1* được tìm thấy trong nghiên cứu. 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%)

**Bảng 3.11. Các gen KKS cùng nằm trên plasmid mang gen *mcr-1***

STT	Loại Replicon (in silico)	Số chủng	Loại mẫu	Số lượng gen KKS	Các loại gen KKS
1	IncFIA	3	PN +PĐVN	9	<i>aadA2</i> (2), <i>blaTEM-1B</i> (3), <i>cmlA1</i> (2), <i>dfrA12</i> (2), <i>floR</i> (3), <i>qnrS1</i> (2), <i>sul2</i> (2), <i>sul3</i> (2), <i>tet(M)</i> (2)
2	IncFIA: IncFIC: rep2327	1	PĐVN	6	<i>aadA2</i> (1), <i>blaTEM-106</i> (1), <i>cmlA1</i> (1), <i>dfrA12</i> (1), <i>tet(A)</i> (1), <i>tet(M)</i> (1)
3	IncFIB: IncHI1B	2	PĐVN + N	11	<i>aadA2</i> (2), <i>aph</i> (3'')-Ib (1), <i>aph</i> (3')-Ia (1), <i>aph</i> (6)-Id (1), <i>cmlA1</i> (1), <i>dfrA12</i> (2), <i>floR</i> (2), <i>qnrS1</i> (1), <i>sul2</i> (2), <i>sul3</i> (1), <i>tet(M)</i> (1)
4	IncFIB: IncHI1B: IncHI1B	2	PN +PĐVN	3	<i>aph</i> (3')-Ia (2), <i>mph(A)</i> (2), <i>sul2</i> (2)5
5	IncFIB: IncHI1B: IncHI1B: IncN	1	PĐVN	2	<i>aph</i> (3')-Ia (1), <i>qnrS1</i> (1)
6	IncFIB: IncHI1B: IncHI2A: IncHI2: IncN	1	PN	10	<i>aph</i> (3'')-Ib (1), <i>aph</i> (3')-Ia (1), <i>aph</i> (6)-Id (1), <i>catA2</i> (1), <i>dfrA14</i> (1), <i>floR</i> (1), <i>qnrS1</i> (1), <i>sul2</i> (1), <i>tet(A)</i> (1), <i>tet(M)</i> (1)
7	IncFIB: IncHI1B: IncN	2	PN +PĐVN	4	<i>aac</i> (3)-IId (1), <i>cmlA1</i> (1), <i>dfrA12</i> (1), <i>tet(M)</i> (1)
8	IncFIB: IncI2	1	PN	0	

9	IncFIC: rep2244: IncHI2A: IncHI2	1	PN	8	<i>Aac (3)-IId (1), aadA2(1), aph(3')-Ia (1), blaTEM-106 (1), catA2 (1), cmlA1 (1), sul3 (1), tet(M) (1)</i>
10	IncHI1B	3	PN + N	7	<i>aadA2(2), blaCARB-2 (1), blaTEM-1B (1), cmlA1 (1), dfrA16 (1), qnrS1 (1), sul3 (1)</i>
11	IncHI1B: IncHI1B	1	PN	4	<i>aadA2(1), dfrA12 (1), sul3 (1), tet(A) (1)</i>
12	IncHI1B: IncHI1B: rep2327	1	PN	2	<i>blaTEM-106 (1), tet(A) (1)</i>
13	IncHI1B: IncHI2A: IncHI2	2	PĐVN	16	<i>aac(3)-IVa(1), aadA1(1), aph(3'')-Ib (2), aph(3')-Ia (2), aph(4)-Ia (1), aph(6)-Id (2), blaCTX-M-14 (1), dfrA12 (1), dfrA14 (1), lnu(F) (1), mef(B) (1), qnrS1 (1), qnrS2 (1), sul2 (1), tet(A) (2), tet(M) (3)</i>
14	IncHI1B: IncHI2A: IncHI2: IncN	4	PN +PĐVN	20	<i>aac(3)-IId(1), aadA2(3), aph(3'')-Ib (4), aph(3')-Ia (4), aph(6)-Id (3), blaTEM-106 (1), blaTEM-1B (1), catA1(1), catA2 (2), cmlA1 (2), dfrA12 (2), dfrA14 (2), dfrA17 (1), floR (3), qnrS1 (3), sul1 (1), sul2 (2), sul3 (2), tet(A) (4), tet(M) (3)</i>
15	IncHI1B: IncX1	2	PN +PĐVN	9	<i>aac(3)-IIa (1), aadA2(1), blaTEM-106 (1), blaTEM-1B (1), dfrA12 (2), qnrS1 (1), sul2 (1), sul3 (1), tet(A) (1)</i>
16	IncHI1B: IncX2	1	PN	6	<i>Aph (3'')-Ib (1), aph(6)-Id (1), blaTEM-106 (1), cmlA1 (1), sul3 (1), tet(A)(1)</i>
17	IncHI1B: rep2327	1	PĐVN	2	<i>blaTEM-106 (1), tet(A) (1)</i>
18	IncHI2A: IncHI2	3	PN +PĐVN	18	<i>aac(3)-IId(2), aac(3)-IVa(1), aadA2(2), aph(3'')-Ib (1), aph(3')-Ia (3), aph(4)-Ia (1), aph(6)-Id (1), blaCTX-M-14 (1), blaTEM-106 (2), cmlA1 (1), dfrA12 (1), floR (2), fosA3 (1), sul1 (1), sul3 (1), tet(A) (1), tet(M) (3), CTX-M-55(1)</i>



19	IncHI2A: IncHI2: IncI2	2	PN	13	<i>aac (3)-IId (2), aadA2(2), aph (3'')-Ib (2), aph (3')-Ia (2), aph (6)-Id (2), blaTEM-106 (1), dfrA12 (2), floR (2), qnrS1 (2), sul1 (2), sul3 (2), tet(A) (1), tet(M) (2)</i>
20	IncHI2A: IncHI2: IncN	1	N	8	<i>aph (3'')-Ib (1), aph (3')-Ia (1), aph (6)-Id (1), dfrA14 (1), floR (1), qnrS1 (1), sul2 (1), tet(M) (1)</i>
21	IncHI2A: IncHI2: IncY	2	PN +PĐVN	15	<i>aac (3)-IId (2), aadA22(1), aadA2(1), aph (3'')-Ib (2), aph(3')-Ia (2), aph(6)-Id (2), catA2 (2), dfrA12 (2), floR (2), mph(A) (2), sul1 (2), sul2 (1), sul3 (2), tet(A) (1), tet(M) (2)</i>
22	IncHI2A: IncI2: IncN: IncHI2	1	PN	9	<i>aadA2(1), aph (3')-Ia (1), cmlA1 (1), dfrA12 (1), mph(A) (1), qnrS1 (1), sul3 (1), tet(A) (1), tet(M) (1)</i>
23	IncI2	8	PN +PĐVN + N	2	<i>mef(B) (2), CTX-M-55(1)</i>
24	IncN	1	PĐVN	7	<i>aadA2(1), aph (3')-Ia (1), blaOXA-10 (1), dfrA12 (1), mef(B) (1), qnrS1 (1), sul3 (1)</i>
25	IncP	7	PN +PĐVN	1	<i>qnrS1 (1)</i>
26	IncX1	1	PN	6	<i>aph (3')-Ia (1), blaTEM-1B (1), cmlA1 (1), dfrA12 (1), mef(B) (1), sul3 (1)</i>
27	IncX4	5	PN +PĐVN	3	<i>Aac (3)-IIa (1), aac(3)-IId (1), aph(3')-Ia (1)</i>
28	undetected	6	PN +PĐVN	0	

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

Kết quả bảng 3.11 cho thấy các plasmid mang gen *mcr-1* bao gồm cả các single replicon plasmid hay multi replicon plasmid đều mang rất nhiều các gen KKS kháng các nhóm KS thông thường đồng thời với gen *mcr-1* kháng colistin.

### 3.3.2. Xác định khả năng lan truyền gen kháng qua trung gian plasmid giữa các chủng vi khuẩn

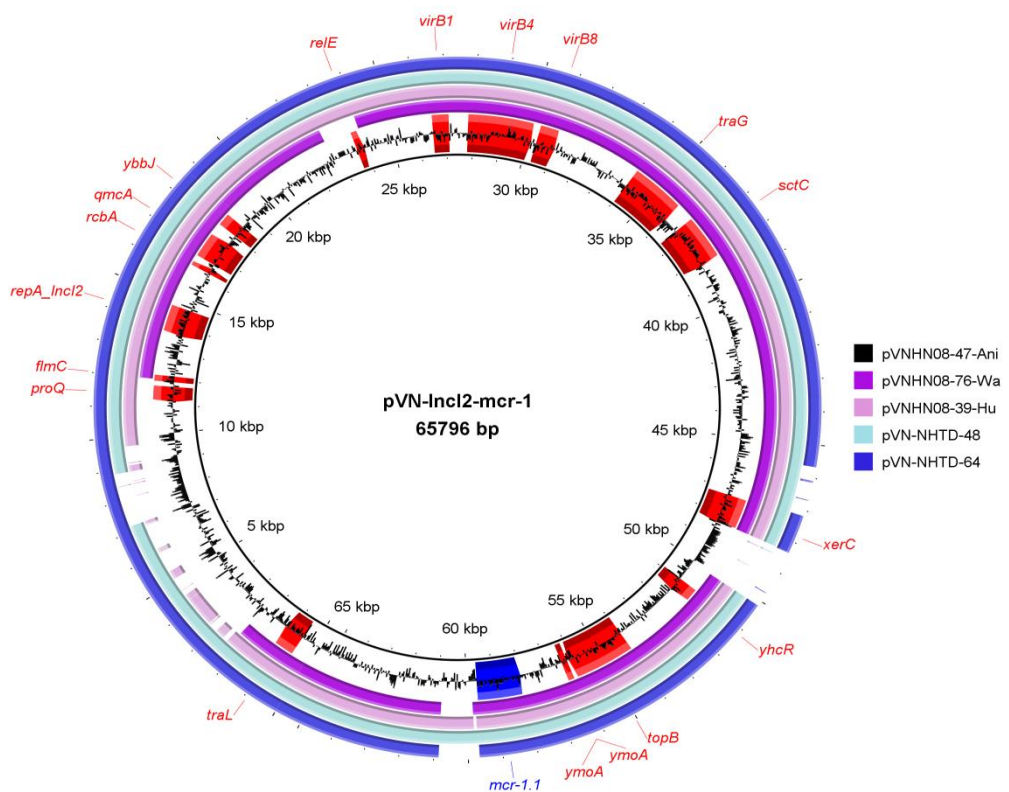
**Bảng 3.12: Kết quả thử nghiệm tiếp hợp truyền plasmid giữa các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* và chủng vi khuẩn nhận *E. coli* J53**

Mã mẫu	Loại mẫu (chủng cho)	Loại plasmid mang <i>mcr-1</i>	Kết quả truyền gen <i>mcr-1</i> cho <i>E. coli</i> J53	Mã mẫu	Loại mẫu (chủng cho)	Loại plasmid mang <i>mcr-1</i>	Kết quả truyền gen <i>mcr-1</i> cho <i>E. coli</i> J53
4	PN	IncHI1B, IncX1	+	44	PĐVN	-	+
7	N	IncHI2A, IncHI2	+	47	PĐVN	IncI2	+
11	N	-	+	50	PĐVN	IncFIB, IncHI1B	+
13	PN	-	+	53	PĐVN	IncX4	(-)
16	PN	IncX4	+	54	PĐVN	IncFIA, IncFIC, rep_cluster_2327	+
19	PN	IncP	+	59	PĐVN	IncFIA	+
21	N		(-)	74	PN	rep_cluster_312	+
23	PĐVN	IncFIB, IncHI1B, IncHI1B, IncN	(-)	76	N	IncI2	(-)
27	PN	IncHI1B, IncHI1B, rep_cluster_2327	+	78	PĐVN	IncP	+
34	PN	IncP	(-)	79	PN	IncFIB, IncHI1B, IncHI2A, IncHI2, IncN	+
37	PN	-	(-)	86	PĐVN	IncHI1B, IncHI2A, IncHI2	+
40	PN	IncFIA	(-)	89	N	IncFIB, IncHI1B	+
Tổng số mẫu n=24							

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

Nghiên cứu lựa chọn 24 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* đã được xác định nằm trên plasmid thông qua giải trình tự short read để làm thực nghiệm tiếp hợp đánh giá sự lan truyền *mcr-1* qua plasmid. 24 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được tiếp hợp với các chủng nhận là *E. coli* J53. Bảng 3.10 thể hiện kết quả tiếp hợp cho thấy: các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên single-replicon và multi-replicon đều có khả năng truyền ngang gen *mcr-1* sang chủng khác qua hình thức tiếp hợp. Có 67% (n=16) chủng *E. coli* truyền thành công gen *mcr-1* sang chủng nhận *E. coli* J53. Các plasmid mang gen *mcr-1* này bao gồm 13 type replicon plasmid trong biểu đồ 3.4 được phân lập từ phân người, phân động vật và nước.

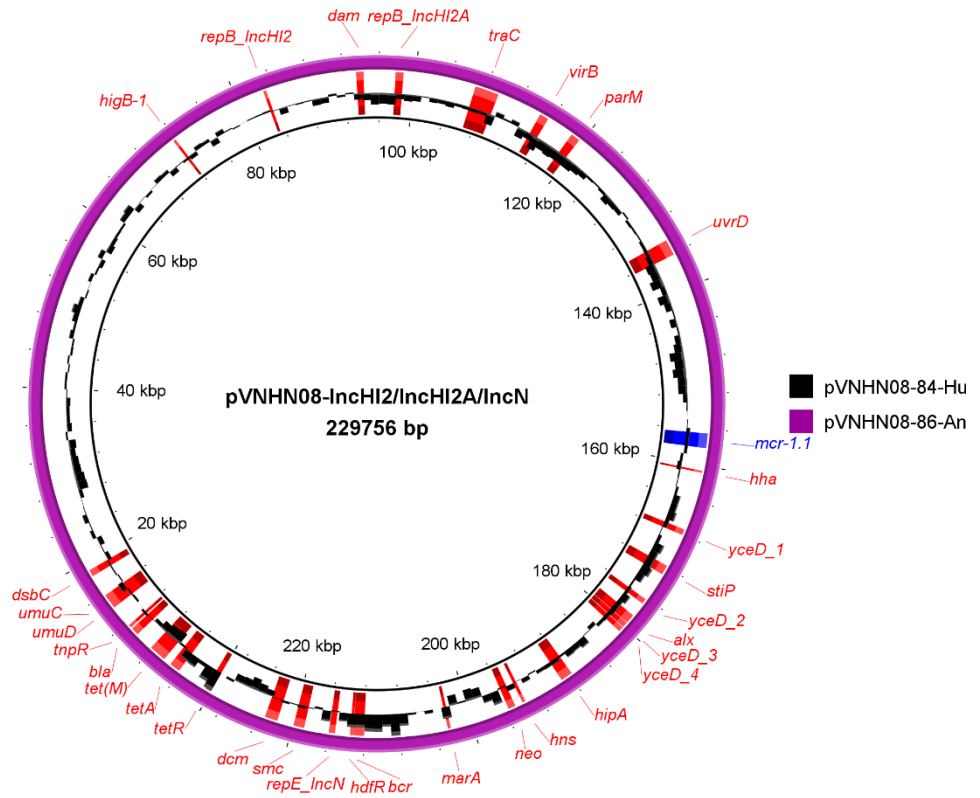
### 3.3.3. Xác định cấu trúc của các yếu tố di truyền di động mang gen *mcr-1*



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

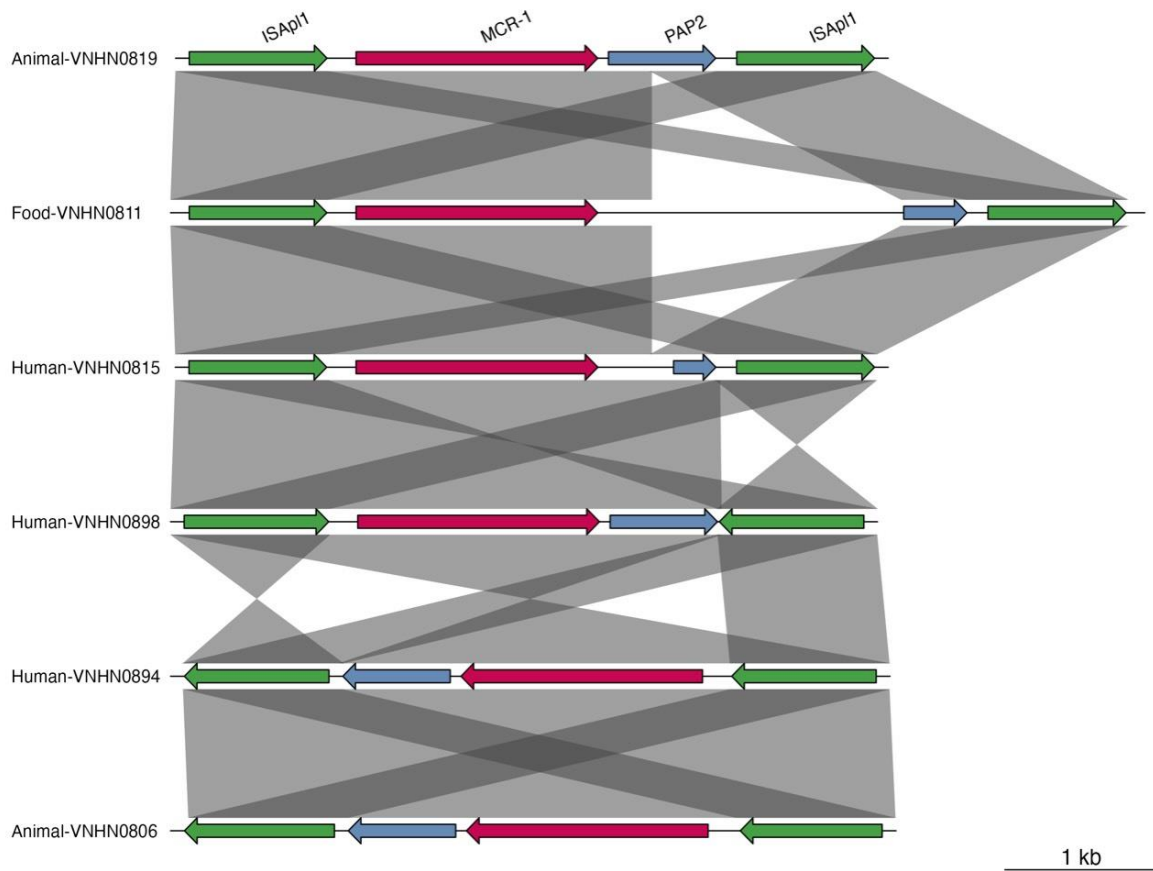
Sử dụng dữ liệu long-read và short-read để so sánh trình tự của plasmid IncI2 của phân người, động vật, nước trong cộng đồng nghiên cứu và mẫu từ lâm sàng

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. ISAp1: mũi tên màu xanh lam; gen *mcr-1*: mũi tên màu đỏ; PAP2: mũi tên màu xanh da trời.

## CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

Kể từ khi chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin đầu tiên được phát hiện vào năm 2016 bởi Liu và cộng sự, cho đến nay vấn đề nghiên cứu sâu hơn về các đặc điểm mang gen, về đặc điểm dịch tễ học phân tử đối với các chủng vi khuẩn đường ruột nói chung và đối với chủng *E. coli* nói riêng đã, đang và sẽ vẫn là một vấn đề cần thiết đặc biệt ở những nước có sử dụng nhiều kháng sinh và lạm dụng kháng sinh cả trong nông nghiệp và trong lâm sàng như ở một số nước Châu Á (Trung Quốc, Thái Lan...) trong đó có Việt Nam. Các bằng chứng khoa học rõ ràng về thực trạng kháng colistin, về đặc điểm cơ chế kháng, cơ chế lan truyền gen KKS của các chủng vi khuẩn đường ruột nói chung và *E. coli* nói riêng sẽ là những cơ sở khoa học cần thiết để tham khảo khi đưa ra các giải pháp nhằm giảm thiểu sự gia tăng tỷ lệ kháng colistin-thuốc kháng sinh cuối cùng đối với các vi khuẩn đường ruột đa kháng có kháng carbapenem.

### **4.1. Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập được từ người, vật nuôi, thực phẩm và nước tại xã Thanh Hà huyện Thanh Liêm, Hà Nam giai đoạn 2014-2015**

#### **4.1.1. Một số đặc điểm về quần thể thu thập mẫu nghiên cứu**

Quần thể thu thập mẫu nghiên cứu là 80 hộ gia đình thuộc 7 thôn thuộc xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam. Các hộ gia đình có các đối tượng tham gia thuộc nhiều nghề nghiệp khác nhau, trong đó nông dân chiếm tỷ lệ cao nhất: 45,3%; tiếp theo là nhóm trẻ em/học sinh với tỷ lệ 34,3%; nhóm công nhân, cán bộ chiếm 16,6%, nhóm nghề nghiệp thủ công, buôn bán chiếm tỷ lệ thấp nhất 3,8%. Hầu hết các hộ gia đình đều có vật nuôi trong nhà. Các mẫu được thu thập bao gồm cả phân của những người khỏe mạnh, phân động vật nuôi trong nhà, thức ăn (rau, thịt), nước tưới, nước giếng, nước mưa của hộ gia đình. Có thể nói các mẫu trong nghiên cứu đã thể hiện được các đối tượng liên quan trong việc lây lan KKS trong một cộng đồng thông qua “chuỗi thức ăn”: Gia súc gia cầm ăn thức ăn có kháng sinh → vi khuẩn kháng thuốc phát triển trong gia súc, gia cầm → vi khuẩn kháng thuốc xâm nhập vào người qua thức ăn, môi trường (nước) hoặc tiếp xúc trực tiếp. Từ đó vi khuẩn kháng thuốc lây nhiễm trong cộng đồng.

#### 4.1.2. 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 2014-2015

Khi xác định tỷ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin, chúng tôi xác định 2 loại tỷ lệ: tỷ lệ mẫu chứa chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* và tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong tổng số chủng *Enterobacteriaceae* phân lập được trong nghiên cứu.

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 [60], 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). Đánh giá tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên số chủng *Enterobacteriaceae* phân lập (1 mẫu lấy 1-5 chủng *Enterobacteriaceae*) cho thấy tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong số các chủng vi khuẩn đường ruột phân lập được rất cao: 36,4% số chủng *Enterobacteriaceae* phân lập từ phân người và 36,6% số chủng *Enterobacteriaceae* phân lập từ phân động vật, trong nước và thức ăn cũng tìm thấy tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* cũng rất cao: 23,3% và 15,5% số chủng *Enterobacteriaceae* phân lập (Hình 3.1). Các tỷ lệ này cũng tương đồng với tỷ lệ các mẫu có chứa chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*.

Như vậy kết quả nghiên cứu đã cho thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* không chỉ tồn tại ở động vật- là đối tượng sử dụng colistin một thời gian dài do tập quán chăn nuôi, sử dụng colistin như một thuốc tăng trưởng ở các động vật nuôi [10] mà còn tồn tại trong cộng đồng dân cư với tỷ lệ cao, đồng thời cũng tồn tại trong cả môi trường thức ăn và nước (nước sinh hoạt, nước tưới, nước mưa).

Từ thực trạng này, nhóm nghiên cứu đưa ra giả thuyết rằng có thể các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* tồn tại ở động vật do việc lạm dụng colistin trong chăn nuôi

một thời gian dài đã gây ô nhiễm môi trường (thức ăn, nước uống, nước tưới) làm lây lan nhanh các chủng kháng này qua “chuỗi thức ăn” làm cho tỷ lệ nhiễm các chủng kháng này ở người cũng rất cao. Nhóm nghiên cứu tiếp tục đi sâu vào đánh giá toàn cảnh thực trạng này và phân tích các đặc điểm sinh học phân tử của các chủng này để chứng minh giả thuyết nghiên cứu.

Để đánh giá sự lây lan của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong hộ gia đình theo chuỗi thức ăn, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra sự lây lan của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* theo hộ gia đình. Kết quả cho thấy trong số 80 hộ gia đình được khảo sát, chúng tôi đã phát hiện được các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở 69 hộ (86,2%). Tỷ lệ tìm thấy > 2 loại mẫu trong cùng hộ gia đình có chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* là 47,8%, tỷ lệ hộ gia đình có > 2 người cùng sống trong một hộ gia đình đều có chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* là 37,7%, (Hình 3.1, Hình 3.2). Đây là một trong những bằng chứng cho thấy có thể có sự lan truyền các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong hộ gia đình giữa người và động vật thông qua môi trường sinh hoạt như nước, thức ăn bị ô nhiễm.

So sánh với các nghiên cứu khác tương tự ở Việt nam, chúng tôi thấy tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong phân động vật trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đương với nghiên cứu của Malhotra-Kumar phân lập các chủng *E. coli* từ phân động vật ở trang trại Văn Lâm, Hưng Yên năm 2014-2015 với tỷ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* là 37,5% [60] và nghiên cứu của HH Phương và cs trên thịt heo và người bán thịt heo tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2018 cũng thấy tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong thịt heo là 35,8% [11]. Tuy nhiên tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở phân người sống tại các hộ gia đình trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn rất nhiều so với nghiên cứu của HH Phương và cs. Ở nghiên cứu này, tỷ lệ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở phân người bán thịt heo là 7,8%. Điều này có thể là do quần thể nghiên cứu khác nhau. Quần thể nghiên cứu của chúng tôi tại các hộ gia đình có chăn nuôi có thể sẽ có nhiều nguy cơ lây lan các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* cao hơn.



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 nông thôn Bắc Bộ.

So sánh với các nghiên cứu khác tương tự trong khu vực Châu Á và trên thế giới cho thấy tỷ lệ mẫu/chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với một số nghiên cứu của các nước trong khu vực và trên thế giới như Trung Quốc, Nhật Bản, Pháp [79, 57, 70]. 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. Tỷ lệ *E. coli* mang gen *mcr-1* ở tất cả các nguồn trong cộng đồng (phân động vật, phân người, thức ăn, nước) tại Việt Nam đều cao hơn so với các nước trên thế giới có thể là do colistin bị lạm dụng trong chăn nuôi tại Việt Nam trong thời gian dài, gây ô nhiễm môi trường và lây truyền sang người khỏe mạnh thông qua “chuỗi thức ăn” mà chưa có biện pháp ngăn chặn hiệu quả. Kết quả này là một cảnh báo rất rõ về các nguồn có chứa *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin có thể lây lan âm thầm trong cộng đồng. Chúng tôi tiếp tục làm rõ thêm về mức độ kháng colistin của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập được, sự phổ biến của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* này trên NST hay plasmid, đánh giá tình trạng kháng kháng sinh thông thường của các chủng này để từ đó có thể biết rõ thêm về cách thức mà các chủng này có thể lây lan trong cộng đồng nghiên cứu.

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

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 >2µg/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 = 4µg/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 µg/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 µg/ml [37, 119]

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có biểu hiện kiểu hình kháng colistin (MIC ≥ 8 µg/ml) trong nước và thức ăn mặc dù có số lượng ít hơn so với các chủng phân lập từ phân động vật và phân người nhưng các chủng này có MIC kháng colistin rất cao: 5/10 chủng (50%) *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập từ thức ăn có MIC ≥ 16 µg/ml; 7/23 chủng (30,4%) *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin phân lập từ nước có MIC ≥ 16 µg/ml (Bảng 3.3). Câu hỏi đặt ra là: liệu các chủng đề kháng cao thì dễ tồn tại trong môi trường hơn hay không? Trong nghiên cứu này của chúng tôi, do số lượng chủng phân lập được từ nước và thức ăn còn ít nên cần có những nghiên cứu tiếp theo sâu hơn về vấn đề này.

Mặc dù biểu hiện kiểu hình kháng colistin của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở người khỏe mạnh và động vật chỉ là 15,3% và 10,3% nhưng tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* lại có tỉ lệ cao trong cộng đồng là một vấn đề rất đáng báo động và đây có thể là một nhân tố tác động làm tăng thêm tình trạng kháng kháng sinh của *E. coli* cũng như các vi khuẩn gram âm khác. Theo nghiên cứu của Leigh B. Rosengre và cs [83] cho thấy các mối liên hệ không có điều kiện giữa các gen kháng thuốc đã được đánh giá; những mối liên hệ này tạo ra các giả thuyết về mối quan hệ sinh lý giữa các gen quy định sự “đồng chọn lọc”- gen kháng thuốc kháng với một loại kháng sinh có thể gây kháng thuốc với nhiều kháng sinh khác nếu các gen cùng nằm trên plasmid. Hơn nữa, *E. coli* kháng thuốc, tuy hiếm khi gây bệnh trực tiếp, nhưng lại là một ổ chứa các gen AMR. Những gen này có thể được chuyển sang các vi khuẩn khác từ động vật, ví dụ như *Salmonella*, hoặc các vi

khuẩn gram âm khác trong đường tiêu hóa dẫn tới nguy cơ hình thành các chủng đa kháng hoặc toàn kháng nguy hiểm [99]. Hơn nữa, *E. coli* lại là một vi khuẩn gây bệnh cơ hội ở cả người và động vật, tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* lại có tỉ lệ cao trong cộng đồng cũng là một nguồn lây lan âm thầm từ người sang người và/hoặc từ động vật sang người hoặc lây lan giữa các loại vi khuẩn trong đường ruột, từ đó sẽ hình thành các chủng vi khuẩn gram âm đường ruột nói chung và *E. coli* nói riêng gây bệnh trên người và động vật kháng với nhiều loại kháng sinh [91, 120], đặc biệt là nhóm kháng sinh có hiệu quả với các trực khuẩn gram âm đường ruột như nhóm cephalosporin thế hệ 3, thế hệ 4 hay carbapenem. Một số nghiên cứu hiện nay cũng đã phát hiện ra các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* gây nhiễm khuẩn trên người mang đồng thời gen sinh ESBL kháng nhóm  $\beta$ -lactam và gen kháng nhóm carbapenem [4, 62, 64]. Có thể nói, tỉ lệ cao các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng là một vấn đề đáng báo động về nguy cơ gia tăng khả năng KKS của các chủng này với colistin ở trong cộng đồng, từ đó có thể làm gia tăng khả năng kháng colistin - KS lựa chọn cuối cùng đối với các chủng vi khuẩn gram âm đa kháng gây nhiễm khuẩn trong bệnh viện.

Qua đó, chúng tôi cũng thấy rằng việc xác định kiểu hình không đủ để phản ánh tình trạng kháng colistin của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*, một tỷ lệ lớn các chủng này có mang gen nhưng chưa có biểu hiện kiểu hình kháng colistin. Các yếu tố thuận lợi như các chủng này tiếp tục chịu áp lực của chọn lọc kháng sinh nếu colistin vẫn được dùng trong cộng đồng và khả năng lan truyền gen *mcr-1* rộng rãi sẽ làm các chủng mang gen này sẽ biểu hiện ra kiểu hình, từ đó làm gia tăng tỉ lệ kháng colistin. Vì vậy, việc xác định kiểu gen KKS song song cùng với kiểu hình KKS là rất cần thiết để có thể đánh giá và tầm soát được tình trạng KKS thực sự của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng.

Việc nghiên cứu các hiểu biết cơ bản về gen *mcr-1*, cách thức lan truyền của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng này như thế nào để có biện pháp ngăn chặn quá trình lan truyền gen kháng sinh một cách hiệu quả là rất cần thiết. Do đó, chúng tôi tiếp tục đánh giá về sự phân bố của gen *mcr-1* của các chủng phân lập được trong cộng đồng trên NST và plasmid

#### 4.1.4. 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.

Gen *mcr-1* kháng colistin được Liu và cộng sự phát hiện từ năm 2016 ở các chủng vi khuẩn gram âm đường ruột phân lập từ động vật và người được xác định nằm trên plasmid. Từ đó đến nay đã rất nhiều nước phát hiện được gen này trên các trực khuẩn phổ biến nhất là *E. coli* từ phân động vật, phân người, trong môi trường (thức ăn, nước). Nhiều nghiên cứu ghi nhận gen này tồn tại trên plasmid [123, 70], tuy nhiên, một số nghiên cứu đã tìm thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên NST [86]

Tại Việt Nam, một số các nghiên cứu đã phát hiện gen *mcr-1* nằm trên NST của *E. coli* phân lập từ người bệnh và người khỏe mạnh [115, 92]. Nghiên cứu của T. Tada và cộng sự (2017) đã phân lập được 2 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên NST trên lâm sàng. Nghiên cứu của Yamaguchi và cộng sự (2020) trên cộng đồng tại tỉnh Thái Bình cho thấy tỷ lệ gen *mcr-1* kháng colistin nằm trên NST của các chủng *E. coli* phân lập từ phân người cũng khá cao 36,8% và có 1,8% số chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên cả NST và plasmid. Như vậy có thể thấy gen *mcr-1* nằm trên các chủng *E. coli* trong cộng đồng tại Việt Nam trên các loại mẫu khác nhau phân động vật, phân người, thức ăn, nước đều có thể tồn tại ở cả trên NST và plasmid và cũng có thể nằm đồng thời trên cả 2 vị trí NST và plasmid.

Các gen KKS nằm trên NST sẽ lan truyền dọc gen kháng trong cùng loài thông qua quá trình phân chia của vi khuẩn, tốc độ lây truyền chậm hơn các gen KKS nằm trên plasmid nhưng có sự ổn định lâu dài qua các thế hệ. Ngược lại gen KKS nằm trên plasmid sẽ lan truyền gen kháng từ chủng này sang chủng khác trong

cùng loài hoặc sang các loài khác với tốc độ lan truyền rất nhanh chóng nhưng không ổn định, nó có thể mất đi khi không còn chịu áp lực chọn lọc của kháng sinh. Gen *mcr-1* được tìm thấy cả ở NST và plasmid, thậm chí trong nghiên cứu của chúng tôi còn tìm thấy gen này nằm đồng thời cả trên NST và plasmid của cùng một chủng *E. coli* cho thấy nhờ có gen *mcr-1* nằm trên các vị trí đa dạng như vậy nên các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng vừa có sự ổn định lâu dài, vừa rất có sự phân bố rất đa dạng trong các loại mẫu khác nhau. *mcr-1* nằm trên nhiễm sắc thể có thể đóng vai trò quan trọng đảm bảo sự ổn định và *mcr-1* nằm trên plasmid đóng vai trò trong sự phân phối đa dạng của các chủng này trong cộng đồng. Để hiểu thêm về cơ chế lan truyền của các chủng này, trong các phần tiếp theo của nghiên cứu này chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu về vị trí, cấu trúc chuyên vị *mcr-1*, cấu trúc các plasmid của gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* thu được từ phân động vật, phân người, thức ăn, nước trong cộng đồng, nơi có sự phổ biến của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*.

#### **4.1.5. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* tại cộng đồng trong nghiên cứu**

277 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ các loại mẫu trong nghiên cứu bao gồm các chủng phân lập từ phân người (n=160), phân động vật (n=65), thức ăn (n=16) và nước (n=32) được đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của 10 kháng sinh thuộc các nhóm KS cơ bản thường dùng để đánh giá mức độ KKS của các chủng này.

Kết quả cho thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có tỉ lệ KKS rất cao với các KS cơ bản (Bảng 3.5): Tỷ lệ các chủng kháng ampicillin (AM) phân lập từ phân người là 97,6%; từ phân động vật là 98,5%, từ thức ăn và nước là 100%. Tỷ lệ các chủng kháng với gentamicin (GM) phân lập từ phân người là 49,4%, từ phân động vật là 29,2%, từ thức ăn là 43,75% và từ nước là 31,3%. Tỷ lệ các chủng kháng ciprofloxacin (CIP) cũng khá cao với tỷ lệ các chủng kháng phân lập từ phân người, phân động vật, thức ăn và nước tương ứng là 39,6%; 47,7%; 82,25% và 31,3%. Tương tự với KS Sulfamethoxazon + Trimethoprim (SXT) cũng gần như không còn

tác dụng với các chủng này với tỷ lệ kháng của các chủng kháng phân lập từ phân người, phân động vật, thức ăn và nước tương ứng là 93,9%; 89,2%; 81,25% và 96,9%. Đối với nhóm kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 và 4 thì chỉ xuất hiện các chủng kháng phân lập từ phân người và phân động vật: các chủng từ phân người kháng ceftazidime (CAZ) 9,8% (n=16), Cefotaxim (CTX) là 7,9% (n=13) và cefepime (FEP) là 4,3% (n=7); các chủng phân lập từ phân động vật chỉ kháng cefotaxim (CTX) 4,6% (n=3)

Có thể thấy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng nghiên cứu có tỷ lệ kháng cao với 4 nhóm kháng sinh AM-GM-CIP-SXT. Các chủng đa kháng kháng sinh (kháng từ 3 kháng sinh trở lên) chiếm tỷ lệ cao (Bảng 3.6). Các chủng đa kháng kháng sinh tính chung cho tất cả các loại mẫu là 51,62% (n=143) trong đó các chủng đa kháng kháng sinh phân lập từ thức ăn chiếm tỷ lệ cao nhất 81,25% (n=13), tiếp theo là các chủng phân lập từ phân người chiếm tỷ lệ 53,05%

Đáng chú ý là có 7/278 (2.5%) chủng kháng toàn bộ các KS nhóm  $\beta$ -lactam bao gồm AM-CAZ-CTX-FEP. Thử nghiệm ESBL cũng có 7 chủng sinh ESBL trong đó có 2 chủng kháng toàn bộ các KS nhóm  $\beta$ -lactam.

Nghiên cứu của J Xie và cộng sự tại Thượng Hải của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người bệnh trên lâm sàng cho kết quả tương tự như trong nghiên cứu của chúng tôi với > 50% số chủng là đa kháng KS và tỷ lệ kháng với ampicillin và sulfonamid rất cao [114]

Nghiên cứu của chúng tôi chưa phát hiện chủng kháng với carbapenem, các chủng còn nhạy cảm cao với kháng sinh amikacin. Một số nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam cũng chưa ghi nhận các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng kháng với carbapenem[116, 60]. Đây là điểm sáng trong bức tranh về KKS của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng mà chúng ta cần có các biện pháp phòng ngừa và ngăn chặn để có thể bảo tồn tác dụng của carbapenem trên các chủng này.

## 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. Các gen kháng kháng sinh

Kết quả đánh giá tình trạng KKS của 277 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở trên đã cho thấy tình trạng KKS của các chủng rất đáng báo động với tỷ lệ kháng cao với các KS AM, GM, CIP và SXT. Chúng tôi lựa chọn 87 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* để giải trình tự toàn bộ bộ gen (WGS). Kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy có rất nhiều các gen KKS của các nhóm KKS khác nhau được phát hiện trên các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*. Chúng tôi đã xác định được 46 loại gen KKS của 9 nhóm KS (Biểu đồ 3.3). Số lượng các gen KKS được tìm thấy nhiều nhất cũng tương đồng với tỉ lệ KKS ở kiểu hình: nhóm  $\beta$ -lactam có 9 gen KKS gen trong đó các gen chiếm ưu thế là *ampC*-95,4%; *bla<sub>TEM-1</sub>*-54,0%; *bla<sub>TEM-135</sub>*-24,1%. Gen KKS nhóm aminoglycosid có 14 gen KKS, các gen chiếm ưu thế bao gồm: *kdpE*-58,6%; *aadA2*-49,5%; *aadA*-42,5%; và *APH6-Id*-39,8%; AAC (3)-IIa-14,9%; AAC (3)-IIb-11,5%. Gen KKS nhóm quinolon gồm có 2 gen là *qnrS1*-43,7% và *qnrS2*-5,8%. Gen KKS trimethoprim có 5 gen, gen chiếm ưu thế là *dfrA12*-49,4%; *dfrA14*-19,5% và sulfonamid có 8 gen, gen chiếm ưu thế là *sul1*-12,6%; *sul2*-44,8%; *sul3*-56,3%. Gen KKS nhóm phenicol có 4 gen trong đó gen chiếm ưu thế bao gồm *catII*-13,8%; *cmlA6*-44,8%; *floR*-52,8%; gen KKS nhóm tetracyclin có *tetM*-32,2%.

Các gen sinh ESBL nằm trên plasmid được tìm thấy bao gồm *bla<sub>TEM-1</sub>*(47 chủng); *bla<sub>TEM-135</sub>* (21 chủng); *bla<sub>CTX-M-14</sub>* (1 chủng); *bla<sub>CTXM-55</sub>* (2 chủng). Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận được 38 gen điều hòa bơm đẩy có ở hầu hết các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* (Biểu đồ 3.3).

Kết quả cho thấy tương ứng với kết quả tỷ lệ KKS kiểu hình cao ở các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* gặp ở tất cả các loại mẫu phân người, phân động vật, thức ăn và môi trường, rất nhiều các kiểu gen KKS đã được ghi nhận ở các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* tương ứng (Bảng 3.7). Biểu hiện kiểu gen KKS có tỷ lệ cao hơn rất nhiều so với biểu hiện kiểu hình KKS gặp ở các chủng phân lập từ phân người và phân động vật ở các KS nhóm  $\beta$ -lactam (CAZ, CTX, FEP)- tỷ lệ KKS trên kiểu

hình là 9,6%, 9,6%, 5,8% ở người và 0%, 3,1%, 1% ở động vật trong khi đó tỷ lệ các chủng mang gen KKS của nhóm này ở các mẫu phân người là 34,6% và ở phân động vật là 21,9%. Tương tự với các KS nhóm aminoglycozid (GM, AK) với sự khác biệt giữa tỷ lệ KKS kiểu hình và tỷ lệ mang gen KKS ở mẫu phân người là 42,3% và 73,1%, ở phân động vật là 37,5% và 81,3%. KS nhóm quinolone (CIP) có biểu hiện kiểu hình và kiểu gen tương đương nhau trong khi đó KS SXT có biểu hiện kháng kiểu hình cao hơn kiểu gen (90,4% so với 76,9% ở phân người; 84,4% và 81,3% ở phân động vật). Mặc dù biểu hiện của kiểu hình KKS của một chủng vi khuẩn phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như môi trường ngoại cảnh, sự có mặt của các ion kim loại...nhưng gen KKS là một yếu tố chính tạo nên sự đề kháng KS [21]. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ kháng trên kiểu hình chỉ phản ánh một phần nổi của tình trạng kháng kháng sinh thật sự của các chủng này. Điều này cũng một lần nữa cho thấy để đánh giá đầy đủ tình trạng KKS của chủng vi khuẩn cần phải đánh giá song song cả kiểu hình và kiểu gen của KS.

Hầu hết các gen KKS của các nhóm KS  $\beta$ -lactam, aminoglycoside, quinolon, sulfonamid đều là các gen nằm trên plasmid, có thể làm cho tăng khả năng lan truyền KKS điều này lý giải tỷ lệ KKS với các KS này đều rất cao. Thêm vào đó, 38 gen điều hòa bơm đẩy có ở hầu hết các chủng, các gen này giúp tạo ra hệ thống bơm đẩy của các chủng này để bơm đẩy KS ra ngoài tế bào của vi khuẩn, càng tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ra các chủng đa kháng thuốc [75, 111]

So sánh về đặc điểm KKS của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ cộng đồng trong nghiên cứu với các nghiên cứu trong và ngoài nước thấy: Katarzyna Cwiek nghiên cứu các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên gia cầm tại Ba Lan thấy 88,2% các chủng mang gen KKS bao gồm  $\beta$ -lactam (*bla*<sub>TEM</sub>), tetracyclin (*tetA*, *tetB*), sulfonamid (*sul1*, *sul2*, *sul3*) [33]. Tỷ lệ gen tìm thấy cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi có thể do các kỹ thuật phát hiện gen khác nhau và các vùng khác nhau nên tỷ lệ khác nhau.

Nghiên cứu của Akiyo Nakano và cộng sự trên động vật và người khỏe mạnh ở 72 trang trại tại Nhật đã ghi nhận các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có mang gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-27</sub> và *bla*<sub>CTX-M-156</sub> từ mẫu phân động vật [70], trong nghiên cứu



của chúng tôi không ghi nhận các gen họ CTX-M- từ mẫu phân động vật mà chỉ có 1 chủng mang gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> và 2 chủng mang gen *bla*<sub>CTX-M-55</sub> từ mẫu phân người. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Nguyễn Quốc Phong và cộng sự đánh giá sự phổ biến gen *mcr-1* ở các chủng *E. coli* mang có sinh enzym  $\beta$ -lactamase trên các mẫu thức ăn sống bán lẻ tại Nha Trang có phát hiện các gen phổ biến là *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> và *bla*<sub>CTX-M-9</sub> bằng phương pháp PCR [5]. Một số nghiên cứu khác tại Việt Nam cũng cho thấy *bla*<sub>CTX-M-1</sub> và *bla*<sub>CTX-M-9</sub> là 2 loại gen phổ biến ở các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* có sinh enzym  $\beta$ -lactamase trên người và động vật [13, 71]. Trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ ghi nhận 1 chủng *E. coli* có mang gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> và 2 chủng *E. coli* có mang gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> đều phân lập từ phân người, đây là những gen ít gặp nên vấn đề này cần phải theo dõi thêm trên các nghiên cứu theo dõi dọc trên cộng đồng.

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

Như phần 4.1 đã đề cập, việc nghiên cứu sâu thêm về mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ phân người, phân động vật, thức ăn và nước trong hộ gia đình, giữa các thành viên trong hộ gia đình, lây lan trong cộng đồng có khu vực địa lý gần nhau để hiểu rõ hơn về cơ chế lan truyền gen KKS của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* là rất cần thiết để từ đó có các biện pháp ngăn chặn và giảm thiểu hiệu quả sự lan truyền nhanh chóng các chủng vi khuẩn KKS.

Trước khi có kỹ thuật next-generated sequencing có thể giải trình tự toàn bộ bộ gen của vi khuẩn ra đời, có thể nói kỹ thuật PFGE là tiêu chuẩn quan trọng để xác định mối liên hệ kiểu gen, đánh giá khả năng lan truyền KKS của vi khuẩn.

Nghiên cứu của chúng tôi đã chọn lọc ra 240 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* bao gồm: 136 chủng phân lập từ phân người, 57 chủng phân lập từ phân động vật, 33 chủng từ nước và 14 chủng từ thức ăn nhằm đánh giá mối liên hệ kiểu gen ban đầu từ các chủng này.

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. Trong số 58 nhóm kiểu gen có độ tương đồng cao có 40 nhóm gen có các cụm chủng trong nhóm phân lập từ một mẫu bao gồm các nhóm 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 37, 39, 40, 41, 42, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58.

Có 18 nhóm kiểu gen giống nhau nhưng được phân lập từ các hộ khác nhau và/hoặc các loại mẫu khác nhau bao gồm các nhóm 2, 6, 12, 14, 16, 20, 22, 33, 35, 36, 38, 43, 44, 45, 46, 47, 53. Trong số đó, nhóm kiểu gen số 20, 22 và 38 có các chủng phân lập trong cùng 1 hộ gia đình có kiểu gen giống nhau. Nhóm kiểu gen số 20 gồm có 4 chủng trong đó có 2 chủng phân lập từ mẫu phân người và 2 chủng phân lập từ mẫu phân động vật tại thôn Mậu Chủ. Nhóm kiểu gen số 22 bao gồm 3 chủng trong đó có 2 chủng phân lập từ phân của 2 thành viên trong cùng 1 hộ gia đình và 1 chủng phân lập từ phân của thành viên trong 1 hộ ở cùng thôn Thạch Tổ, Nhóm kiểu gen số 38 có 3 chủng trong đó có 1 chủng phân lập từ nước, 1 chủng phân lập từ phân động vật trong cùng 1 hộ, 2 chủng này có chung kiểu gen cùng 1 chủng phân lập từ nước từ hộ thuộc cùng 1 thôn Thạch Tổ. Đây là bằng chứng chứng minh có sự lan truyền gen KKS *mcr-1* của các chủng *E. coli* trong cùng 1 hộ gia đình giữa người và động vật, giữa các thành viên trong hộ gia đình và giữa động vật sang môi trường nước. Nhóm kiểu gen số 2, 6, 22, 38, 43, 45, 46 có các chủng vi khuẩn phân lập từ phân người/ phân động vật/ thức ăn/nước của cùng một thôn. Đáng chú ý là nhóm kiểu gen số 43 gồm 2 chủng vi khuẩn phân lập từ nguồn nước của 2 hộ khác nhau nhưng cùng 1 thôn Hòa Ngãi. Bằng chứng này cho thấy có thể có sự lây nhiễm các chủng vi khuẩn từ động vật vào nguồn nước gây ô nhiễm nguồn nước ở khu vực địa lý gần nhau. Điều thú vị nữa chúng tôi thấy nhóm kiểu gen 45 và 46 bao gồm các chủng phân lập từ thịt và rau của cùng một thôn Dương Xá. Như vậy giả thuyết ô nhiễm nguồn nước có thể gây nhiễm sang thức ăn và tạo nên sự lây truyền qua chuỗi thức ăn giữa động vật-thức ăn-môi trường nước- người là có cơ sở. Trên thực tế, nghiên cứu của Nguyen T Nhung và cs đã chứng minh tại Hà Nội, nguồn nước thải ô nhiễm chưa được xử lý có chứa gen *mcr-1* và góp phần vào việc

lan truyền gen *mcr-1* trong môi trường nước bị ô nhiễm vào thức ăn [8]. Ngoài ra, các nhóm kiểu gen còn lại là nhóm 12, 14, 16, 33, 35, 36, 44, 47, 53 là những nhóm có các chủng vi khuẩn có kiểu gen giống nhau được phân lập từ loại mẫu khác nhau ở các hộ gia đình khác nhau và giữa các thôn khác nhau. Chúng tôi chưa tìm được mối liên quan dịch tễ giữa các chủng này. Có thể việc lây nhiễm của các chủng này trong môi trường đã trở nên rộng rãi nên có thể gặp ở các khu vực địa lý xa hơn.

Kết quả PFGE còn thấy 93 chủng không có mối liên quan kiểu gen mà có sự phân bố kiểu gen rất đa dạng. Điều này có thể giải thích rằng do gen *mcr-1* trong nghiên cứu của chúng tôi đã xác định được nằm phần lớn trên plasmid (71,2%). Lây truyền qua plasmid là lây truyền ngang nên tạo ra tính đa dạng về kiểu gen.

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.

Để tiếp tục hiểu rõ hơn về đặc điểm của plasmid và NST mang gen *mcr-1* của các chủng này và xác định chính xác các sequence type của chúng, chúng tôi tiếp tục thực hiện kỹ thuật giải trình tự toàn bộ bộ gen một số chủng đại diện trong nghiên cứu. Các chủng trong cùng một nhóm kiểu gen sẽ chỉ lựa chọn đại diện 1 chủng để giải trình tự.

#### **4.2.3. 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.**

Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (next-generated sequencing), giải trình tự toàn bộ bộ gen (WGS) là kỹ thuật hiện đại nhất hiện nay để đánh giá các đặc điểm sinh học phân tử của vi khuẩn, là kỹ thuật quan trọng trong việc kiểm soát KKS hiện nay [54]

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* bao gồm 45 chủng từ phân người, 29 chủng từ phân động vật, 10 chủng từ nước, 3 chủng từ thức ăn để giải trình tự toàn bộ bộ gen nhằm xác định về sự phân bố các sequence type trong cộng đồng, các đặc điểm và cấu tạo của plasmid và NST của mang gen *mcr-1*. Với mục đích so sánh với các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên lâm sàng xem có sự khác biệt hay không, trong quá trình phân tích dữ liệu giải trình tự, chúng tôi có sử dụng thêm dữ liệu giải trình tự gen của 7 chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* được phân lập từ các bệnh phẩm lâm sàng (2 chủng phân lập từ bệnh phẩm mủ; 2 chủng phân lập từ bệnh phẩm ngoáy họng, 1 chủng phân lập từ máu, 2 chủng phân lập từ bệnh phẩm đờm) năm 2016 của Bệnh viện Nhiệt đới Trung ương.

#### 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

Cây phân loại core genome và sequence type trong giải trình tự toàn bộ bộ gen sẽ cho thấy về mối quan hệ về kiểu gen của các chủng. Các chủng có mối quan hệ chặt chẽ về kiểu gen là các chủng cùng thuộc một ST và nằm cùng trên một nhánh của cây phân loài.

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. Sự phân bố STs cụ thể đối với từng loại mẫu như sau: các chủng phân lập từ 45 mẫu phân người có 32 loại ST, các ST thường gặp ở các chủng phân lập từ phân người là ST10, ST48, ST93 và ST191. Các chủng phân lập từ 29 mẫu phân động vật có 22 STs khác nhau trong đó 2 loại ST thường gặp là ST10 và ST48. 10 chủng phân lập từ nước có 7 STs khác nhau trong đó có 3 ST hay gặp là ST48, ST155 và ST206 (Bảng 3.8). Như vậy các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng có sự rất đa dạng về kiểu gen. 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 [38]. ST48 là ST được ghi nhận nhiều tại Trung Quốc trên các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ động vật [121, 117]

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 [101, 122]. 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. Chủng có ST93 trong nghiên cứu này thường gặp ở mẫu phân người nhưng đây là chủng ít gặp trên thế giới, nó được ghi nhận rải rác ở gia cầm, bệnh phẩm ngoài ruột gây ỉa chảy ở người, ở thức ăn, nó cũng được phát hiện ở các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* ở lợn tại Lào, ở mèo tại Quảng Châu, Trung Quốc, ở bệnh nhân tại Phần Lan và gần đây nó là chủng chiếm ưu thế ở động vật nuôi tại Quảng Châu, Trung Quốc [104]. Tại Việt Nam chúng tôi chưa tìm được các nghiên cứu đánh giá sự phân bố các ST của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* lưu hành trong cộng đồng nên chúng tôi chưa có dữ liệu để so sánh.

Phân tích các STs theo hộ gia đình, nghiên cứu của chúng tôi tìm thấy có 4 nhóm mà các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ các nguồn khác nhau (phân người và/ hoặc phân động vật và/hoặc nước) trong cùng một hộ gia đình có các STs giống nhau nằm trên cùng 1 nhánh của cây phân loại, gồm: cặp 32-33 của hộ H137-ST 155; cặp 47-48 của hộ H154; cặp 75-76 của hộ H275-ST 206 và cặp 83-84-87 của hộ H314-ST191. Ngoài ra còn cặp 52-53 của hộ H175 đều có cùng ST10 tuy không trên cùng một nhánh nhưng có mối liên quan gần (Bảng 3.9). Như trong phần đánh giá mối liên hệ kiểu gen bằng PFGE chúng tôi cũng đã tìm ra 2 cặp chủng có cùng 1 kiểu nhóm gen ở trong cùng một hộ gia đình. Lựa chọn các mẫu không có độ tương đồng về kiểu gen để tiếp tục giải trình tự toàn bộ gen đã phát hiện thêm 4 nhóm có cùng ST trong cùng hộ gia đình có mối quan hệ kiểu gen chặt chẽ. Điều này cũng cho thấy ưu điểm của kỹ thuật giải trình tự toàn bộ gen có độ nhạy và chính xác cao hơn kỹ thuật PFGE khi đánh giá mối liên hệ kiểu gen của các chủng. Đây cũng là bằng chứng củng cố thêm nhận định của chúng tôi là có sự lây lan của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cùng 1 hộ gia đình giữa động vật nuôi trong nhà và người qua môi trường ô nhiễm (nước). Nghiên cứu của chúng tôi chưa tìm được bằng chứng lan truyền qua thức ăn có thể do số lượng chủng phân lập còn ít nên hạn chế sự phát hiện này.

Cây phân loại còn cho thấy sự đa dạng về STs của các chủng này, điều này có thể được giải thích do sự lan truyền qua plasmid do các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* nằm trên plasmid. Để chứng minh sự lan truyền của các chủng này qua plasmid chúng tôi tiếp tục đánh giá khả năng lan truyền của các chủng này qua plasmid cũng như các đặc điểm của các plasmid mang gen *mcr-1*

#### 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 (35 chủng từ phân người, 24 chủng từ phân động vật và 5 chủng từ nước) dựa trên dữ liệu giải trình tự short-read cho thấy chúng tôi đã xác định được 13 loại replicon của plasmid mang gen *mcr-1*, trong đó các chủng phân lập từ nước gồm 6 loại IncI2, IncN, IncFIB, IncHI1B, IncHI2, IncHI2A. Các chủng phân lập từ phân động vật có 12 loại trong đó bao gồm 6 loại có trong các chủng từ nước và thêm 6 loại replicon khác là IncP, IncX1, IncX4, IncFIA, IncFIC, IncY. Các chủng từ phân người mang nhiều loại nhất là 13 loại) trong đó bao gồm 12 loại của các chủng từ động vật và thêm IncX2 (Biểu đồ 3.4). 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). Các chủng phân lập từ nước có các loại đơn vị sao chép của plasmid hoàn toàn chung với các chủng phân lập từ động vật và người gợi ý rằng có thể các plasmid này có nguồn gốc từ các chủng từ động vật và người. 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 [60]. 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 [115].

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%), 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. 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 plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép bao gồm các đơn vị sao chép khác nhau kết hợp với nhau. 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 đơn vị sao chép khác (n= 23, 4%) và IncH với IncF (n= 12,3%) (Bảng 3.10). Trong số các plasmid chứa một đơn vị sao chép duy nhất, gen *mcr-1* được phát hiện có cùng contig với đơn vị sao chép của plasmid ở 8 chủng trong cộng đồng bao gồm IncI2 (n= 3), IncP (n= 2), InX4 (n= 2) và IncHI1B (n= 1). Trong số các plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép, gen *mcr-1* được phát hiện có cùng khuôn mẫu với đơn vị sao chép ở 2 chủng trong cộng đồng bao gồm IncHIA/IncHI1B (n= 1) và IncHI2/IncHI2A (n= 1). Như chúng ta đã biết, plasmid là những ADN vòng có khả năng tự nhân lên trong tế bào của vi khuẩn. Plasmid có khả năng thu nhận gen mới từ các yếu tố di truyền động như transposon, trình tự chèn và nhân bản ở nhiều loại tế bào chủ (vi khuẩn) khác nhau nên nó trở thành một vector hoàn hảo trong việc lan truyền gen KKS [84]. Việc nhận biết về đặc điểm sinh học phân tử và phân loại về mặt gen học của plasmid sẽ có thể được phân biệt các cách lan truyền gen KKS của các loại plasmid khác nhau. Hơn nữa, các gen KKS nằm trên plasmid thường ít khi chỉ có một loại gen, mỗi loại plasmid thường hay mang cùng lúc nhiều nhóm gen KKS khác nhau. Xác định các loại plasmid giúp ta nhận biết không chỉ một mà là các nhóm gen KKS thường gặp nằm trên loại

plasmid này [84] Plasmid IncI2, IncHI2, and IncX4 là những plasmid thường gặp ở những chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* [105]. Plasmid IncI2 là plasmid chiếm ưu thế ở Châu Âu, thường nằm trên các chủng *E. coli* phân lập được từ các trang trại, nó có thể tích hợp vào nhiều loại vi khuẩn khác nhau [84]. Ngoài gen *mcr-1* plasmid IncI2 còn mang gen CTX-M-55 [59]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, plasmid IncI2 mang gen *mcr-1* và cũng có 1 chủng phân lập từ phân người (67-HS235.2) có *bla*CTX-M-55 cùng nằm trên plasmid này. IncP là loại plasmid có phổ rộng đối với các tế bào chủ. Ngoài mang gen *mcr-1* thì IncP được phát hiện mang rất nhiều loại gen KKS bao gồm các gen KKS nhóm  $\beta$ -lactams, sulphonamid, aminoglycosid và tetracyclin [84], tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận gen kháng nhóm quinolon *qnrS1* nằm cùng trên plasmid này. Đây là loại plasmid mang đơn vị sao chép duy nhất thường gặp thứ 2 trong nghiên cứu (10,6%), điều này cũng lý giải tại sao tỷ lệ kháng quinolon của các chủng trong nghiên cứu rất cao (>30%). IncX4 là một loại đơn vị sao chép duy nhất thường gặp trong nghiên cứu và có nằm cùng các gen KKS nhóm aminoglycosid (Bảng 3.11). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi còn thấy có một tỷ lệ lớn các plasmid chứa đơn vị sao chép kết hợp. Loại thường gặp nhất là IncHI2 với các loại plasmid khác. Loại plasmid này được tìm thấy ở Châu Âu trên cả chủng từ người và động vật và thường kết hợp với các plasmid khác. Các plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép có IncHI2 thường được báo cáo mang rất nhiều gen KKS của các nhóm KS khác nhau như ESBL gen, sulphonamid, aminoglycosid, tetracyclin and streptomycin [84, 47]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự, rất nhiều các gen KKS khác ngoài *mcr-1* được phát hiện nằm trên loại plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép này như gen KKS nhóm  $\beta$ -lactam (*bla*CTX-M-14, *bla*TEM-1, *bla*TEM-106) aminoglycoside (*aac(3)-IId*, *aac(3)-IVa*, *aadA2*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aph(4)-Ia*, *aph(6)-Id*), nhóm sulfonamid (*sul1*, *sul2*, *sul3*), nhóm tetracyclin(*tetA*, *tetM*) (Bảng 3.11). Plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép có IncH kết hợp IncF cũng thường gặp và cũng chứa các gen KKS của các nhóm KS tương tự như nhóm có IncHI2. Như vậy, nhìn chung, plasmid chứa nhiều đơn vị sao chép này có 1 lượng lớn các gen KKS của các nhóm KKS khác nhau cùng nằm



trên plasmid với *mcr-1* (Bảng 3.11). Số lượng gen KKS trung bình nằm trên plasmid cùng gen *mcr-1* là 9 gen dao động từ 1-17 gen (Bảng 3.11). Đây là một vấn đề rất đáng báo động vì không chỉ trên kiểu hình có rất nhiều các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* đa kháng mà ở kiểu gen còn rất nhiều các gen KKS nằm trên plasmid sẽ làm cho việc lan truyền các chủng đa KKS mang gen *mcr-1* sẽ xảy ra nhanh chóng nếu không có các biện pháp ngăn chặn kịp thời, hiệu quả và nếu các chủng này lây lan trên lâm sàng sẽ càng làm cho việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn *E. coli* ngày càng trở nên khó khăn hơn.

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*

Như kết quả đã trình bày ở phần trên, nhóm nghiên cứu đã xác định được nhiều loại plasmid mang gen *mcr-1* của các chủng *E. coli* phân lập được trong cộng đồng nghiên cứu. Để trả lời câu hỏi liệu các plasmid này có khả năng lan truyền gen *mcr-1* sang các chủng *E. coli* khác hay không, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm tiếp hợp để đánh giá sự lan truyền gen qua plasmid từ các chủng mang gen *mcr-1* sang chủng *E. coli* J53 là chủng không mang gen *mcr-1* và có trạng thái có thể nhận plasmid từ chủng khác. Chúng tôi lựa chọn 24 chủng *E. coli* (10 chủng từ phân người, 9 chủng từ động vật, 5 chủng từ nước) đã được xác định mang gen *mcr-1* nằm trên các loại plasmid khác nhau bao gồm cả loại plasmid có một đơn vị sao chép và plasmid có nhiều đơn vị sao chép. 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 [5]. 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*

Để đánh giá cấu trúc di truyền của các chủng *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), InHI2 (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

chúng 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 [115]. Cũng giống như các gen KKS khác, khi nó đã chèn vào NST của tế bào chủ sẽ mất đi cấu trúc ban đầu của nó, thu nhận các đặc điểm của tế bào chủ và để tạo ra tình ổn định của nó cũng như thay đổi mức độ biểu hiện của các chức năng. Vì vậy lây truyền dọc do sự tích hợp transposon vào NST có tính ổn định. Trong nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận thấy Tn6330 mà không có ISAp11 ở trình tự bên cạnh của chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên NST. Điều này có thể gợi ý đây là khả năng mới được chèn gần đây.

Tóm lại, nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng có sự xuất hiện với tỉ lệ cao các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng tại một xã của vùng nông thôn Bắc Bộ ở Việt Nam. Các chủng này nằm trên cả NST và plasmid nên vừa có tính ổn định lại vừa có tính đa dạng trong quá trình lan truyền. 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*. Các biện pháp này giúp ngăn chặn hoặc giảm tỷ lệ lây lan các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* giữa người và động vật.

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

Nghiên cứu đã đánh giá được thực trạng mang, mức độ kháng thuốc, và một số đặc điểm của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin tại cộng đồng

nông thôn tỉnh Hà Nam. Nhiều kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã được áp dụng trong nghiên cứu và đã từng bước chứng minh sự lây truyền của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* và lan truyền gen *mcr-1* thông qua các plasmid. Những phát hiện này góp phần quan trọng để hiểu được cơ chế kháng kháng sinh, nguồn truyền nhiễm và khả năng lây truyền của vi khuẩn *E. coli* mang gen *mcr-1* và là cơ sở khoa học để đưa ra các biện pháp phòng ngừa và giảm thiểu sự lây lan của vi khuẩn này trong cộng đồng. Tuy nhiên do 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 của nghiên cứu, ban đầu, 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 do chúng tôi chỉ có thể thu thập được dữ liệu của một số lượng rất nhỏ chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trên lâm sàng (n=7) nên việc so sánh bị hạn chế. 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.

## **ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN**

Đây là nghiên cứu đầu tiên của Việt Nam nghiên cứu tổng thể các loại mẫu từ phân người, phân động vật nuôi trong nhà, thức ăn và môi trường nước (nước giếng, nước tưới, nước mưa) đánh giá tình trạng các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng

colistin tại một vùng nông thôn Bắc Bộ để có thể thấy được bức tranh toàn cảnh thực trạng KKS của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong cộng đồng của một xã thuộc nông thôn Bắc Bộ.

Nghiên cứu đã xác định được các ST của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* đang lưu hành trong cộng đồng

Nghiên cứu đã xác định được các replicon plasmid của các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin đang lưu hành trong cộng đồng, từ đó làm sáng tỏ cơ chế lây lan của các chủng này trong cộng đồng

Nghiên cứu đã xác định được cấu trúc của một số replicon 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 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- $p < 0.001$ .

- Các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* kháng colistin có MIC từ 4  $\mu\text{g/ml}$  đến  $>16$  4  $\mu\text{g/ml}$  chủ yếu có MIC là 4  $\mu\text{g/ml}$  với tỷ lệ 80% trong số các chủng kháng colistin.

- 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 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%).

- Có nhóm mà các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* phân lập từ các nguồn khác nhau (phân người và/ hoặc phân động vật và/hoặc nước) trong cùng một hộ gia đình có các STs giống nhau nằm trên cùng 1 nhánh của cây phân loại (10,3%) gợi ý có sự lây lan lẫn nhau giữa những người trong cùng hộ gia đình, giữa người và động vật thông qua thức ăn và nước bị ô nhiễm các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* trong hộ gia đình.

- Toàn bộ 87 chủng *E. coli* đều mang gen *mcr-1* có subtype *mcr-1.1*.

- 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%) và 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)

## KIẾN NGHỊ

1. Chúng *E. coli* mang gen *mcr-1* lưu hành trong cộng đồng có tỷ lệ khá cao, đặc biệt tìm thấy ở cả người khỏe mạnh, động vật và môi trường. Đây là mối nguy cơ lây nhiễm vào bệnh viện và có gây ra các bệnh nhiễm khuẩn khó điều trị vì vậy cần có những biện pháp can thiệp hiệu quả để giảm tỷ lệ này trong cộng đồng

2. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy sự lây nhiễm trong cộng đồng các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1* từ giữa người và động vật qua môi trường ô nhiễm nước, thức ăn. Tuy nhiên do số mẫu còn ít nên chúng tôi chưa đánh giá được tình trạng ô nhiễm từ nguồn thức ăn do đó cần các nghiên cứu có quy mô lớn hơn, đánh giá trên diện rộng để có các biện pháp can thiệp hiệu quả.



## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI 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. Bich Vu Thi Ngoc, Thanh Le Viet, **Mai Nguyen Thi Tuyet**, 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.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu tiếng Việt:

1. Lê Huy Chính (2007), *Vi sinh vật y học*, Vol. 1. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 395.
2. Dương Thị Toan và Nguyễn Văn Lưu; (2015), "Tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi lợn thịt, gà thịt ở một số trại chăn nuôi trên địa bàn tỉnh Bắc Giang", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 13(5), tr. 717-722.
3. Hà Thu Hà (2016), *Khảo sát sử dụng colistin tại Bệnh viện Nhiệt đới Trung ương*, Đại học Dược Hà Nội.
4. Hong-NGOC Le-Vo và các cộng sự. (2019), "Complex Class 1 Integron in a Clinical Escherichia coli Strain From Vietnam Carrying Both mcr-1 and blaNDM-1", *Frontiers in microbiology*, tr. 2472.
5. Lê Quốc Phong và các cộng sự. (2021), "Prevalence of mobile colistin resistance (mcr) genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli isolated from retail raw foods in Nha Trang, Vietnam", *International Journal of Food Microbiology*. 346, tr. 109164.
6. Bộ môn Dược lý; (2004), *Dược lý học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học.
7. GARP Việt Nam (2009), "Báo cáo sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại 15 bệnh viện Việt Nam năm 2008-2009", *Dự án hợp tác toàn cầu về kháng kháng sinh GARP Việt Nam và Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford*.
8. Nguyen M Hoa Nguyen T Nhung, Cuong V Nguyen, Trung V Nguyen, Men T Nguyen, Hieu Q Thai, Mai H Ho, Guy Thwaites, Hoa T. Ngo, Stephen Baker, Juan Carrique-Mas. (2020), "Association of the colistin resistance gene mcr-1 with fecal pollution in water environments in Hanoi, Vietnam", *Letters in Applied Microbiology*.
9. Phạm Duy Thái Nguyễn Thị Tuyết Mai, 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, 2015-2016", *Tạp chí Y học Dự phòng*. 29, tr. 57-64.

10. Nguyễn Tú Nam Phạm Kim Đăng, Bùi Thị Tho, Phạm Hồng Ngân, Lương Xuân Thế; (2012), "điều tra tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi gà ở thành phố hải phòng", *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*. 5, tr. 92-97.
11. Hoàng Hoài Phương và các cộng sự. (2021), "Tỷ lệ vi khuẩn Escherichia coli có mang gen đề kháng colistin phân lập từ thịt heo và người bán thịt heo sống tại Thành phố Hồ Chí Minh", *Tạp chí Y học Dự phòng*. 31(7), tr. 25-32.
12. Bộ Y tế (2009), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản y học, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
13. Nguyễn Hoàng Thu Trang (2011), "Đặc điểm gen mã hóa  $\beta$ -lactamase phổ rộng ở một số vi khuẩn gram âm và nguy cơ lan truyền qua plasmid", *Luận văn thạc sỹ di truyền học Trường Đại học Khoa học tự nhiên TP Hồ Chí Minh*.

#### **Tài liệu tiếng Anh:**

14. European Centers for Disease Control and Prevention (ECDC) (2015), "Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union", *European Centre for Disease Prevention and Control*. Stockholm.
15. European Centers for Disease Control and Prevention (ECDC) (2016), "Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union Antibiotic consumption in Europe", *European Centre for Disease Prevention and Control*. Stockholm.
16. Muna F Anjum và các cộng sự. (2016), "Colistin resistance in Salmonella and Escherichia coli isolates from a pig farm in Great Britain", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71(8), tr. 2306-2313.
17. EFS Authority (2015), "ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals", *EFSA Journal*. 13(1).

18. I Azevedo và các cộng sự. (2015), "Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from the domestic food related environments", *Journal of food quality and hazards control*. 2(2), tr. 51-55.
19. Anton Bankevich và các cộng sự. (2012), "SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing", *Journal of computational biology*. 19(5), tr. 455-477.
20. José Antonio Bengoechea và Mikael Skurnik (2000), "Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*", *Molecular microbiology*. 37(1), tr. 67-80.
21. Johan Bengtsson-Palme, Erik Kristiansson và DG Joakim Larsson (2018), "Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance", *FEMS microbiology reviews*. 42(1), tr. fux053.
22. Silpak Biswas và các cộng sự. (2012), "Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century", *Expert review of anti-infective therapy*. 10(8), tr. 917-934.
23. Rossana Bojalil và Juan J Calva (1994), "Antibiotic misuse in diarrhea. A household survey in a Mexican community", *Journal of clinical epidemiology*. 47(2), tr. 147-156.
24. CLSI Breakpoints (2011), "CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing", *Nineteenth informational supplement CLSI document M100-S21* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
25. Karen Bush và George A Jacoby (2010), "Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54(3), tr. 969-976.
26. Rafael Cantón và Teresa M Coque (2006), "The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic", *Current opinion in microbiology*. 9(5), tr. 466-475.
27. Alessandra Carattoli (2009), "Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(6), tr. 2227-2238.

28. Alessandra Carattoli và các cộng sự. (2005), "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing", *Journal of microbiological methods*. 63(3), tr. 219-228.
29. Boudewijn Catry và các cộng sự. (2015), "Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health", *International journal of antimicrobial agents*. 46(3), tr. 297-306.
30. CLSI (2010), *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twentieth informational supplement M100-S20, M100-S20*.
31. Centers for Disease Control và Prevention (2021), Multidrug-resistant organisms (MDRO) management, chủ biên.
32. MARTINE Couturier và các cộng sự. (1988), "Identification and classification of bacterial plasmids", *Microbiological reviews*. 52(3), tr. 375-395.
33. Katarzyna Ćwiek và các cộng sự. (2021), "Phenotypic and genotypic characterization of mcr-1-positive multidrug-resistant Escherichia coli ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland", *Brazilian Journal of Microbiology*. 52(3), tr. 1597-1609.
34. Naomi Datta và RW Hedges (1971), "Compatibility groups among fi- R factors", *Nature*. 234(5326), tr. 222-223.
35. Johna CB DeNap và Paul J Hergenrother (2005), "Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria", *Organic & biomolecular chemistry*. 3(6), tr. 959-966.
36. Valentina Donà và các cộng sự. (2017), "Heterogeneous genetic location of mcr-1 in colistin-resistant Escherichia coli isolates from humans and retail chicken meat in Switzerland: emergence of mcr-1-carrying IncK2 Plasmids", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 61(11), tr. e01245-17.
37. Warawan Eiamphungporn và các cộng sự. (2018), "Prevalence of the colistin resistance gene mcr-1 in colistin-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from humans in Thailand", *Journal of global antimicrobial resistance*. 15, tr. 32-35.

38. Mohammed Elbediwi và các cộng sự. (2019), "Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980–2018)", *Microorganisms*. 7(10), tr. 461.
39. Miriam R Fernandes và các cộng sự. (2016), "First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the mcr-1 gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 60(10), tr. 6415-6417.
40. Luria Leslie Founou, Raspail Carrel Founou và Sabiha Yusuf Essack (2016), "Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective", *Frontiers in microbiology*. 7, tr. 1881.
41. BARRY R Goldin và SHEROOD L Gorbach (1984), "The effect of oral administration of *Lactobacillus* and antibiotics on intestinal bacterial activity and chemical induction of large bowel tumors", *Dev Ind Microbiol*. 25, tr. 139-150.
42. Eduardo A Groisman, Jason Kayser và Fernando C Soncini (1997), "Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg<sup>2+</sup> environments", *Journal of bacteriology*. 179(22), tr. 7040-7045.
43. Sebastian Guenther và các cộng sự. (2017), "Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene mcr-1 from German swine farms", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(5), tr. 1289-1292.
44. A Barman Guyon và các cộng sự. (1994), "A baseline survey on use of drugs at the primary health care level in Bangladesh", *Bulletin of the World Health Organization*. 72(2), tr. 265.
45. Linda Hadjadj và các cộng sự. (2019), "How to discover new antibiotic resistance genes?", *Expert review of molecular diagnostics*. 19(4), tr. 349-362.
46. Linda Hadjadj và các cộng sự. (2017), "Study of mcr-1 Gene-Mediated Colistin Resistance in Enterobacteriaceae Isolated from Humans and Animals in Different Countries", *Genes*. 8(12), tr. 394.

47. Marisa Haenni và các cộng sự. (2016), "Co-occurrence of extended spectrum  $\beta$  lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids", *The Lancet infectious diseases*. 16(3), tr. 281-282.
48. Jon Iredell, Jeremy Brown và Kaitlin Tagg (2016), "Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications", *Bmj*. 352.
49. Alexandra Irrgang và các cộng sự. (2016), "Prevalence of mcr-1 in E. coli from livestock and food in Germany, 2010–2015", *PloS one*. 11(7), tr. e0159863.
50. Aminul Islam và các cộng sự. (2017), "Colistin resistant Escherichia coli carrying mcr-1 in urban sludge samples: Dhaka, Bangladesh", *Gut pathogens*. 9(1), tr. 77.
51. Mikiko Ito-Kagawa và Yasuo Koyama (1980), "Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase", *The Journal of antibiotics*. 33(12), tr. 1551-1555.
52. George A Jacoby (2005), "Mechanisms of resistance to quinolones", *Clinical Infectious Diseases*. 41(Supplement\_2), tr. S120-S126.
53. Michiko Kawanishi và các cộng sự. (2017), "Prevalence of colistin resistance gene mcr-1 and absence of mcr-2 in Escherichia coli isolated from healthy food-producing animals in Japan", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 61(1), tr. e02057-16.
54. Claudio U Köser, Matthew J Ellington và Sharon J Peacock (2014), "Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance", *Trends in Genetics*. 30(9), tr. 401-407.
55. Karthikeyan K Kumarasamy và các cộng sự. (2010), "Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study", *The Lancet infectious diseases*. 10(9), tr. 597-602.
56. Yi-Yun Liu và các cộng sự. (2017), "Structural modification of lipopolysaccharide conferred by mcr-1 in gram-negative ESKAPE pathogens", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 61(6), tr. e00580-17.

57. Yi-Yun Liu và các cộng sự. (2016), "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study", *The Lancet infectious diseases*. 16(2), tr. 161-168.
58. Xin Lu và các cộng sự. (2017), "MCR-1.6, a new MCR variant carried by an IncP plasmid in a colistin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate from a healthy individual", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 61(5), tr. e02632-16.
59. Luchao Lv và các cộng sự. (2013), "Genetic characterization of IncI2 plasmids carrying bla CTX-M-55 spreading in both pets and food animals in China", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 57(6), tr. 2824-2827.
60. Surbhi Malhotra-Kumar và các cộng sự. (2016), "Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring mcr-1 isolated from food animals in Hanoi, Vietnam", *The Lancet infectious diseases*. 16(3), tr. 286-287.
61. Geraldine Marcadé và các cộng sự. (2008), "Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases", *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 63(1), tr. 67-71.
62. Patrick McGann và các cộng sự. (2016), "*Escherichia coli* harboring mcr-1 and bla CTX-M on a novel IncF plasmid: first report of mcr-1 in the United States", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 60(7), tr. 4420-4421.
63. Alan McGregor (1997), Counterfeit drugs flood developing world, chủ biên, Elsevier.
64. Jocelin Merida-Vieyra và các cộng sự. (2019), "First clinical isolate of *Escherichia coli* harboring mcr-1 gene in Mexico", *PloS one*. 14(4), tr. e0214648.
65. Jennifer H Moffatt, Marina Harper và John D Boyce (2019), "Mechanisms of polymyxin resistance", *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, tr. 55-71.
66. Daniel Farias Monte và các cộng sự. (2017), "Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying mcr-1 genes in South America", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 61(5), tr. e02718-16.



67. RICHARD A Moore, LYDIA Chan và RE Hancock (1984), "Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 26(4), tr. 539-545.
68. RICHARD A Moore và RE Hancock (1986), "Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 30(6), tr. 923-926.
69. Jose M Munita và Cesar A Arias (2016), "Mechanisms of antibiotic resistance", *Microbiology spectrum*. 4(2).
70. Akiyo Nakano và các cộng sự. (2021), "Prevalence and Relatedness of mcr-1-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated From Livestock and Farmers in Japan", *Frontiers in Microbiology*. 12, tr. 887.
71. Tatsuya Nakayama và các cộng sự. (2015), "Wide dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in community residents in the Indochinese peninsula", *Infection and Drug Resistance*. 8, tr. 1.
72. Lam-Tung Nguyen và các cộng sự. (2015), "IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies", *Molecular biology and evolution*. 32(1), tr. 268-274.
73. Nguyen Thi Khanh Nhu và các cộng sự. (2010), "The sudden dominance of blaCTX-M harbouring plasmids in *Shigella* spp. circulating in Southern Vietnam", *PLoS neglected tropical diseases*. 4(6), tr. e702.
74. SQ Nizami, IA Khan và ZA Bhutta (1996), "Drug prescribing practices of general practitioners and paediatricians for childhood diarrhoea in Karachi, Pakistan", *Social Science & Medicine*. 42(8), tr. 1133-1139.
75. Haruko Okusu, Dzwokai Ma và Hiroshi Nikaido (1996), "AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants", *Journal of bacteriology*. 178(1), tr. 306-308.
76. CM Ovejero và các cộng sự. (2017), "Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(4), tr. 1050-1053.

77. Patricia Paredes và các cộng sự. (1996), "Factors influencing physicians' prescribing behaviour in the treatment of childhood diarrhoea: knowledge may not be the clue", *Social science & medicine*. 42(8), tr. 1141-1153.
78. Jean B Patel (2017), *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, Clinical and Laboratory Standards Institute.
79. Agnès Perrin-Guyomard và các cộng sự. (2016), "Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014", *Eurosurveillance*. 21(6), tr. 30135.
80. Yvonne Pfeifer và các cộng sự. (2012), "Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, tr. AAC. 05315-11.
81. Johann DD Pitout và Kevin B Laupland (2008), "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern", *The Lancet infectious diseases*. 8(3), tr. 159-166.
82. Wanda C Reygaert (2018), "An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria", *AIMS microbiology*. 4(3), tr. 482.
83. Leigh B Rosengren, Cheryl L Waldner và Richard J Reid-Smith (2009), "Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs", *Applied and environmental microbiology*. 75(5), tr. 1373-1380.
84. M Rozwandowicz và các cộng sự. (2018), "Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(5), tr. 1121-1137.
85. Stefan Schwarz và các cộng sự. (2004), "Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol", *FEMS microbiology reviews*. 28(5), tr. 519-542.
86. Cong Shen và các cộng sự. (2020), "Genomic patterns and characterizations of chromosomally-encoded mcr-1 in *Escherichia coli* populations", *Gut pathogens*. 12(1), tr. 1-7.

87. Randall S Singer và các cộng sự. (2003), "Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings", *The Lancet infectious diseases*. 3(1), tr. 47-51.
88. Erik Snesrud, Patrick McGann và Michael Chandler (2018), "The birth and demise of the IS Apl1-mcr-1-IS Apl1 composite transposon: the vehicle for transferable colistin resistance", *MBio*. 9(1), tr. e02381-17.
89. S Stefani, A Agodi và G Russo (1994), "Role of molecular methodologies in the epidemiologic study of infections", *Igiene Moderna*. 102, tr. 181-181.
90. Jian Sun và các cộng sự. (2017), "Plasmid-mediated colistin resistance in animals: current status and future directions", *Animal health research reviews*. 18(2), tr. 136.
91. Ama Szmolka và Béla Nagy (2013), "Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health", *Frontiers in microbiology*. 4, tr. 258.
92. Tatsuya Tada và các cộng sự. (2017), "Emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates harboring mcr-1 in Vietnam", *International Journal of Infectious Diseases*. 63, tr. 72-73.
93. Tatiana Tatusova và các cộng sự. (2016), "NCBI prokaryotic genome annotation pipeline", *Nucleic acids research*. 44(14), tr. 6614-6624.
94. RB Taylor, O Shakoor và RH Behrens (1995), "Drug quality, a contributor to drug resistance?", *The Lancet*. 346(8967), tr. 122.
95. Fred C Tenover và các cộng sự. (1995), "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing", *Journal of clinical microbiology*. 33(9), tr. 2233.
96. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing và European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017), Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017, chủ biên.
97. Christopher M Thomas và Kaare M Nielsen (2005), "Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria", *Nature reviews microbiology*. 3(9), tr. 711.

98. Nguyen Vinh Trung và các cộng sự. (2017), "Zoonotic transmission of mcr-1 colistin resistance gene from small-scale poultry farms, Vietnam", *Emerging infectious diseases*. 23(3), tr. 529.
99. Anthony E van den Bogaard và Ellen E Stobberingh (2000), "Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans", *International journal of antimicrobial agents*. 14(4), tr. 327-335.
100. Angela HAM Van Hoek và các cộng sự. (2011), "Acquired antibiotic resistance genes: an overview", *Frontiers in microbiology*. 2, tr. 203.
101. Joaquim Viñes và các cộng sự. (2021), "Transmission of similar mcr-1 carrying plasmids among different Escherichia coli lineages isolated from livestock and the farmer", *Antibiotics*. 10(3), tr. 313.
102. Christian von Wintersdorff và các cộng sự. (2016), "Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer", *Frontiers in Microbiology*. 7.
103. John Wain và các cộng sự. (1997), "Quinolone-resistant Salmonella typhi in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment", *Clinical infectious diseases*. 25(6), tr. 1404-1410.
104. Jing Wang và các cộng sự. (2018), "Clonal spread of Escherichia coli ST93 carrying mcr-1-harboring IncN1-IncHI2/ST3 plasmid among companion animals, China", *Frontiers in microbiology*. 9, tr. 2989.
105. Ruobing Wang và các cộng sự. (2018), "The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1", *Nature communications*. 9(1), tr. 1-9.
106. Yang Wang và các cộng sự. (2017), "Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production", *Nature microbiology*. 2(4), tr. 16260.
107. P Wayne (2018), "CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100", *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

108. Hattie E Webb và các cộng sự. (2017), "Illustrative examples of probable transfer of resistance determinants from food animals to humans: Streptothricins, glycopeptides, and colistin", *F1000Research*. 6.
109. Henrik C Wegener và các cộng sự. (1999), "Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe", *Emerging infectious diseases*. 5(3), tr. 329.
110. Julius Weinberg và các cộng sự. (1999), "Establishing priorities for European collaboration in communicable disease surveillance", *The European Journal of Public Health*. 9(3), tr. 236-240.
111. Xi Wen, Ariel M Langevin và Mary J Dunlop (2018), "Antibiotic export by efflux pumps affects growth of neighboring bacteria", *Scientific reports*. 8(1), tr. 1-9.
112. Sally CY Wong và các cộng sự. (2016), "Colistin-resistant Enterobacteriaceae carrying the mcr-1 gene among patients in Hong Kong", *Emerging infectious diseases*. 22(9), tr. 1667.
113. Basil Britto Xavier và các cộng sự. (2016), "Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016", *Eurosurveillance*. 21(27).
114. Jing Xie và các cộng sự. (2022), "Identification of mcr-1-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from clinical samples in Shanghai, China", *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.
115. Takahiro Yamaguchi và các cộng sự. (2020), "High prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* with chromosomally carried mcr-1 in healthy residents in Vietnam", *MSphere*. 5(2), tr. e00117-20.
116. Yoshimasa Yamamoto và các cộng sự. (2019), "Colistin-resistant *Escherichia coli* with mcr genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador", *BMC Research Notes*. 12(1), tr. 1-5.

117. Yong-Qiang Yang và các cộng sự. (2017), "Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 61(5), tr. e01204-16.
118. Xu Yao và các cộng sự. (2016), "Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1", *The Lancet infectious diseases*. 16(3), tr. 288-289.
119. Magdalena Zając và các cộng sự. (2019), "Occurrence and characterization of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Poland, 2011–2016", *Frontiers in microbiology*. 10, tr. 1753.
120. Xue-Fei Zhang và các cộng sự. (2016), "Possible transmission of *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* between companion animals and human", *Emerging infectious diseases*. 22(9), tr. 1679.
121. Xiaonan Zhao và các cộng sự. (2020), "Prevalence and molecular characteristics of avian-origin *mcr-1*-Harboring *Escherichia coli* in Shandong Province, China", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 255.
122. Beiwen Zheng và các cộng sự. (2018), "Discovery and characterisation of an *Escherichia coli* ST206 strain producing NDM-5 and MCR-1 from a patient with acute diarrhoea in China", *International journal of antimicrobial agents*. 51(2), tr. 273-275.
123. Lan-Lan Zhong và các cộng sự. (2018), "High rates of human fecal carriage of *mcr-1*-positive multidrug-resistant Enterobacteriaceae emerge in China in association with successful plasmid families", *Clinical Infectious Diseases*. 66(5), tr. 676-685.
124. JC Brown và các cộng sự. (1996), "Mutations responsible for reduced susceptibility to 4-quinolones in clinical isolates of multi-resistant *Salmonella typhi* in India", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 37(5), tr. 891-900.
125. Nga TT Do và các cộng sự. (2021), "Community-based antibiotic access and use in six low-income and middle-income countries: a mixed-method approach", *The Lancet Global Health*. 9(5), tr. e610-e619.

126. Mikhail Kolmogorov và các cộng sự. (2019), "Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs", *Nature biotechnology*. 37(5), tr. 540-546.
127. H. E. Smith và S. Yun (2017), "Evaluating alignment and variant-calling software for mutation identification in *C. elegans* by whole-genome sequencing", *PLoS One*. 12(3), tr. e0174446.
128. PA Wayne, "CLSI; 2010", *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100-S20*.

**Phụ lục 1:**  
**PHIẾU THU THẬP THÔNG TIN NGHIÊN CỨU**

**I. Thông tin chung:**

HỌ TÊN NGƯỜI PHỎNG VẤN.....

HỌ TÊN CHỦ HỘ .....

HỌ TÊN NGƯỜI TRẢ LỜI PHỎNG VẤN .....

Mã cá nhân của người trả lời phỏng vấnS

Giới tính: Nam  Nữ

Tuổi

Vị trí của người trả lời phỏng vấn trong gia đình

- Bó/mẹ  
 Ông/bà  
 Con  
 Khác: \_\_\_\_\_

Ngày kiểm tra số liệu (ngày/tháng/năm): \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Họ và tên Cán bộ nhập số liệu: .....

Ngày nhập số liệu (ngày/tháng/năm): \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Ngày kiểm tra số liệu đã được nhập (ngày/tháng/năm): \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

**II. Thông tin kinh tế xã hội và nhân khẩu:**

1. Gia đình mình có bao nhiêu người?

2. Đây là nhà thuê hay nhà riêng của anh/chị?

- Nhà thuê  
 Nhà riêng

3. Diện tích ngôi nhà này là bao nhiêu? \_\_\_\_\_ (m<sup>2</sup>)

4. Diện tích đất nông nghiệp của gia đình mình như thế nào? (điền 0 nếu không có)

Vườn, ao nuôi cá \_\_\_\_\_ (m<sup>2</sup>)

Trồng trọt (lúa, hoa quả) \_\_\_\_\_ (m<sup>2</sup>)

Cây công nghiệp \_\_\_\_\_ (m<sup>2</sup>)



5. Nhà anh/chị có mấy tầng?  (ít nhất là 1 tầng)
6. Nhà anh/chị có mấy phòng (không kể nhà tắm và bếp)?
7. Nhà anh/chị có bếp không?
- Có
  - Không
8. Nhà anh/chị có nhà tắm không?
- Có
  - Không
9. Nền nhà anh/chị là nền nhà gì?
- Xi măng
  - Gạch lát
  - Gỗ
  - Khác (ghi rõ: \_\_\_\_\_)
10. Mái nhà anh/chị là mái nhà gì?
- Tôn
  - Bê tông
  - Ngói
  - Khác (ghi rõ: \_\_\_\_\_)

### III. Các yếu tố phơi nhiễm:

1. Nhà anh/chị sử dụng loại nhà vệ sinh nào?
- Hố xí tự hoại (hố xí bệt);
  - Hố xí xôm dùng riêng;
  - Hố xí xôm tập thể;
  - Không có nhà vệ sinh/đi ở vườn/ao hồ;
  - Khác (ghi rõ: \_\_\_\_\_)
2. Đường thoát của hệ thống vệ sinh của nhà mình là như thế nào?
- Ra ao
  - Ra cống
  - Để ủ phân
  - Khác (ghi rõ: \_\_\_\_\_)

3. Anh/chị có trồng rau không?

Có

Không

4. Anh chị dùng loại phân bón nào để trồng rau?

Có ủ trước khi sử dụng không?

Phân người

Phân động vật

Phân hóa học

Khác (ghi rõ: \_\_\_\_\_)

5. Gia đình mình thường dùng nguồn năng lượng đun nấu nào? (Chọn một loại sử dụng nhiều nhất)

Ga,

Củi,

Điện,

Than,

Khác (ghi rõ: \_\_\_\_\_)

6. Gia đình mình thường sử dụng nguồn nước nào? Cho những mục đích gì?

Nước máy cho hộ gia đình;  Ăn uống  Sinh hoạt  Tưới tiêu  Khác (\_\_\_\_\_)

Nước đóng chai;  Ăn uống  Sinh hoạt  Tưới tiêu  Khác (\_\_\_\_\_)

Giếng nước của nhà;  Ăn uống  Sinh hoạt  Tưới tiêu  Khác (\_\_\_\_\_)

Nước mưa;  Ăn uống  Sinh hoạt  Tưới tiêu  Khác (\_\_\_\_\_)

Nước ao/hồ;  Ăn uống  Sinh hoạt  Tưới tiêu  Khác (\_\_\_\_\_)

Khác (ghi rõ: \_\_\_\_\_)  Ăn uống  Sinh hoạt  Tưới tiêu  Khác (\_\_\_\_\_)

7. Gia đình mình có xử lý nước trước khi uống hay không?

Không làm gì;

Đun sôi;

Lọc;

Khác (Ghi rõ: \_\_\_\_\_)

**8. Tần suất sử dụng những loại thực phẩm dưới đây của gia đình mình như thế nào?**

	Hằng ngày	Hơn 1 lần/tuần	1 lần/tuần	Ít hơn 1 lần/tuần
Cơm	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Thịt	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tôm, cá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Trứng	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Rau	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Đậu phụ	_____	_____	_____	_____

**IV. Thông tin về động vật:**

Xin vui lòng cung cấp cho chúng tôi một số thông tin về động vật trong gia đình mình:

Động vật	Số lượng	Sử dụng phân động vật làm phân bón	Sử dụng kháng sinh hay không?	Tên kháng sinh
<input type="checkbox"/> Lợn	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Bò	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Trâu	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Gà	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Vịt	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Ngan	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Ngỗng	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Chó	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Mèo	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Chim	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<input type="checkbox"/> Khác: [_____]	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

## SỔ THEO DÕI THU THẬP CÁC LOẠI MẪU

### 1. Mẫu phân người

Địa chỉ Hộ Gia đình: .....

Mã hộ gia đình:

Thời gian	Mã cá nhân	Ngày thu thập	Giờ thu thập (24 giờ)	Có thu thập mẫu phân được không?		Kiểu phân	Mã phân trên nhãn
		(ngày/tháng/năm)		Có	Không		
1	S[ ] [ ]	[ ]/[ ]/[ ]	[ ]/[ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	S[ ] [ ]
1	S[ ] [ ]	[ ]/[ ]/[ ]	[ ]/[ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	S[ ] [ ]
1	S[ ] [ ]	[ ]/[ ]/[ ]	[ ]/[ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	S[ ] [ ]
1	S[ ] [ ]	[ ]/[ ]/[ ]	[ ]/[ ]	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[ ] [ ]	S[ ] [ ]

## 2. Theo dõi thực phẩm Hộ Gia đình

Địa chỉ Hộ Gia đình: .....

Mã hộ gia đình:

<b>Thời gian</b>	<b>Loại thực phẩm</b>	<b>Ngày thu thập</b> <i>(ngày/tháng/năm)</i>	<b>Mã thực phẩm</b>	<b>Ghi rõ tên mẫu</b>	<b>Nơi lưu trữ</b>	<b>Nguồn gốc</b>
1/2	<input type="checkbox"/> Rau và/hoặc rau sống	[ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]	[ ][ ][ ]			<input type="checkbox"/> Nhà trồng <input type="checkbox"/> Mua
1/2	<input type="checkbox"/> Thịt và/hoặc cá	[ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]	[ ][ ][ ]			<input type="checkbox"/> Nhà nuôi <input type="checkbox"/> Mua

### 3. Mẫu nước sinh hoạt và nước ăn uống

Địa chỉ Hộ Gia đình:

Mã hộ gia đình:.....

<b>Loại mẫu</b>	<b>Ngày thu thập (ngày/tháng/năm)</b>	<b>Mã mẫu nước</b>	<b>Ghi rõ tên mẫu</b>	<b>Nguồn nước</b>
Nước mưa	[ ]/[ ]/[ ]	[ ]		
Nước giếng	[ ]/[ ]/[ ]	[ ]		
Nước tưới tiêu, chăn nuôi	[ ]/[ ]/[ ]	[ ]		

#### 4. Mẫu phân động vật

Địa chỉ Hộ Gia đình: .....

Mã hộ gia đình: .....

<b>Loại mẫu</b>	<b>Ngày thu thập (ngày/tháng/năm)</b>	<b>Mã phân động vật</b>	<b>Ghi rõ tên mẫu</b>	<b>Có sử dụng kháng sinh không?</b>	<b>Tên kháng sinh</b>
Phân của động vật chính	[ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]	[ ][ ][ ]		<input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không	
Phân ủ của động vật	[ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]	[ ][ ][ ]		<input type="radio"/> Có <input type="radio"/> Không	

## PHỤ LỤC 2:

### Hướng dẫn cách lấy mẫu phân

- Đề nghị đối tượng tham gia nghiên cứu đi tiêu trước khi lấy phân để tránh mẫu phân nhiễm bẩn bởi nước tiêu.



- Sử dụng dụng cụ chứa mẫu để thu thập phân.










- Sử dụng găng tay khi thu thập mẫu phân





- Ngay sau khi thu thập mẫu phân, phải đánh giá mẫu phân đó (dựa trên Thang tính chất phân Bristol)

1		Phân táo, rời, giống hạt đỗ
2		Phân táo hơi khô
3		Phân táo độ 3
4		Phân bình thường
5		Phân nát
6		Phân dạng sệt, có nhầy mũi
7		Phân lỏng

- Xúc 1 thìa (5-10 gram) (không có nước tiểu hay giấy vệ sinh!) vào lọ đựng mẫu. **Phải đảm bảo đối tượng nghiên cứu sử dụng lọ chứa mẫu có điền mã cá nhân của họ.**



- Điền đầy đủ thông tin vào nhãn đã dán sẵn trên lọ đựng mẫu. Khoanh tròn vào kiểu phân phù hợp với phân đã thu thập. Ghi rõ ngày và giờ lấy mẫu

MNC: **H001-S01-M1** Thôn: An Hòa

Tên: **Nguyễn Văn A** - 1975

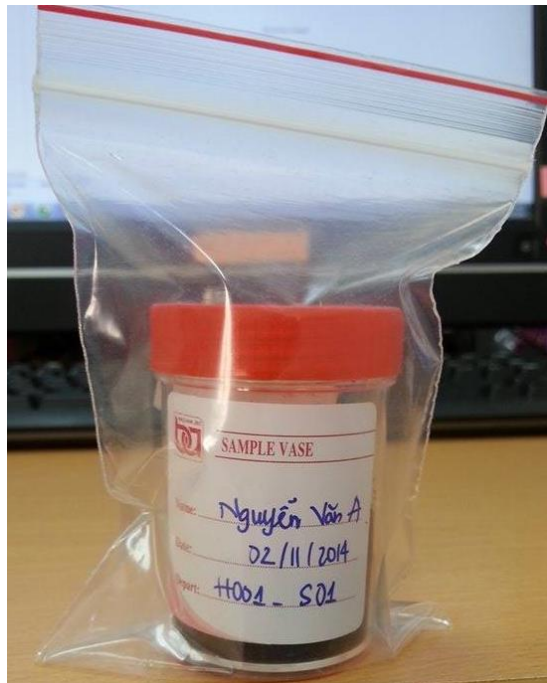
Loại mẫu: **phân người**

Kiểu phân: 1 2 3 4 5 6 7

Ngày lấy: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Giờ: \_\_\_ : \_\_\_

- Cho lọ đựng mẫu vào túi zip lock.



- Chuyển mẫu và bộ câu hỏi tới Trạm Y tế hoặc yêu cầu cán bộ nghiên cứu tới lấy mẫu **trong vòng 2 giờ sau khi thu thập mẫu.**
- Trong trường hợp, một hộ gia đình có nhiều đối tượng tham gia nghiên cứu cần lấy mẫu phân, **phải rửa dụng cụ lấy mẫu cẩn thận với nước và xà phòng và phải rửa với nhiều nước. Dụng cụ lấy mẫu phải được để khô cho lần dùng tiếp theo.**
- Phải rửa tay sau khi lấy mẫu.

### **PHỤ LỤC 3:**

#### **Quy trình thao tác chuẩn – Thu thập mẫu phân động vật**

- Điền đầy đủ thông tin vào Sổ theo dõi thu thập mẫu phân động vật.
- Sử dụng găng tay để lấy mẫu
- Thu thập 1 thìa phân tươi (phân ướt) của 2 loài động vật chính trong hộ gia đình vào lọ đựng mẫu (khoảng ½ lọ)
- Nếu có phân ủ, thu thập 1 thìa phân ủ vào 1 lọ đựng mẫu khác (khoảng ½ lọ)
- Cần xác định xem phân động vật có dùng làm phân ủ không
- Để lọ đựng mẫu trong túi có khóa kéo.
- Chuyển mẫu và Sổ theo dõi tới Trạm Y tế trong vòng 02 giờ sau khi thu thập mẫu
- Rửa tay sau khi lấy mẫu.

## **PHỤ LỤC 4:**

### **Quy trình thao tác chuẩn – Thu thập Thực phẩm**

- Thu thập mẫu thực phẩm có trên bàn ăn của ngày hôm đó.
- Điền đầy đủ thông tin vào Sổ theo dõi thu thập mẫu thực phẩm
- Rau: thu thập rau đã nấu/rau sống (khoảng 10 lá/cành và để vào lọ đựng mẫu đã dán nhãn (khoảng ½ lọ)
- Thịt/cá/đậu: lựa chọn thực phẩm cung cấp protein chủ yếu trong bữa ăn đó và thu thập khoảng ½ lọ đựng mẫu đã được dán nhãn.
- Lưu giữ mẫu ở nhiệt độ 4 °C cho tới khi chuyển tới Viện VSDTTW trong vòng 24 giờ.

## **PHỤ LỤC 5:**

### **Quy trình thao tác chuẩn – Thu thập mẫu nước**

- Điền đầy đủ thông tin vào Sổ theo dõi thu thập mẫu nước
- Thu thập mẫu của 3 loại nước chưa được xử lý (nước mưa, nước giếng và nước tưới tiêu(nếu sử dụng loại nước khác)
- Mỗi loại nước thu thập 2 mẫu
- Mỗi mẫu thu thập 100ml nước vào lọ đựng mẫu có dán nhãn trước.
- Lưu mẫu ở nhiệt độ 4 °C cho đến khi chuyển mẫu tới Viện VSDTTW trong vòng 24 giờ

## **PHỤ LỤC 6:**

### **TRANG THIẾT BỊ, SINH PHẨM VÀ DỤNG CỤ TIÊU HAO**

- Tủ an toàn sinh học cấp 2, lò sấy khô, lò hấp ướt, tủ ấm 37<sup>0</sup>C, tủ lạnh, tủ âm sâu - Máy ly tâm, ủ nhiệt, máy tập trung mẫu (Eppendorf, Đức) - Pipet định mức các loại - Máy luân nhiệt PCR Applied Biosystem-veriti (Mỹ) - Máy giải trình tự gen Applied Biosystem ABI-3130 (Mỹ) - Hệ thống điện di CHEF-DR III (Bio-Rad laboratories, Richmond, Calif, Mỹ). - Hệ thống chuyển màng Biometra-analytic (hãng Jena, Pháp) - Lò lai ADN UPV HL-2000 HybriLinker (Đức) - Hệ thống điện di ngang ENDURTM GEL XL (Mỹ) - Bộ chụp ảnh gen UPV (Đức) Môi trường sinh phẩm và dụng cụ tiêu hao - Thạch MacConkey (hãng Bio-Rad, Pháp) - Thạch LB (Hãng invitrogen, Mỹ) - Canh thang LB (hãng invitrogen, Mỹ) - Thạch Mueller-Hinton (hãng Merck, Đức) - Kháng sinh bột (hãng Sigma, Mỹ): Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Ceftazidime (CAZ), Cefotaxime (CTX), Cefepime(FEP); Ciprofloxacin (CIP), Gentamicin (GM) Amikacin (AK), Ampicillin (AMP), Colistin (CS) và Sulfamethoxazole/ Trimethoprim(SXT)

- Kít tinh sạch ADN và kít tách chiết plasmid Miniprep (QIAGEN, Mỹ) - 2X Go-taq Master-Mix (GoTaq® DNA Polymerase, Promega) - Bigdye 3.1v kít (Applied Biosystem, Mỹ). - Bigdye XTterminator kít, HiDi - Thang chuẩn ADN: 100bp, 1kb và - Dung dịch TE, dung dịch ly giải tế bào - Thạch điện di, thạch Seakem gold - Dung dịch đệm chạy điện di: TAE, TBE - Enzym giới hạn XbaI, ApaI và S1 - Dung dịch nhuộm ethidium bromide - Dung dịch SSC 20X - Dung dịch HCL 0,25 M - Dung dịch biến tính (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) - Dung dịch trung hòa (1.0 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5) - Kít đánh dấu đoạn dò ADN: Direct Nucleic Acid Labelling and Detection system (Hãng ECLTM Amersham) - Gold hybridization buffer (Hãng ECLTM Amersham) - Kít phát hiện ADN: nucleic acid detection system (Hãng ECLTM Amersham) - Film Hyper (Hãng ECLTM Amersham) - Các chủng chuẩn: E. coli ATCC 25922 (thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh), S. braenderup H9812 làm thang chuẩn ADN, E. coli J53 thử nghiệm khả năng truyền plasmid mang gen MCR-1... - Tấm bông lấy bệnh phẩm, que cấy, hộp lồng 9cm, pipet nhựa ... - Đầu côn, tube PCR, 1,5ml, phiến nhựa 96 giếng chạy sequence...

## PHỤ LỤC 7

### QUY TRÌNH CHẠY GIẢI TRÌNH TỰ TOÀN BỘ GENOME VI KHUẨN TRÊN HỆ THỐNG MISEQ-ILLUMINA

#### 1. Kit và hóa chất sử dụng

STT	Cat #	Mô tả	SL	
1		ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (hoặc bộ Kit thích hợp tách chiết genomic vi khuẩn)		
2	FC-131-1024	Nextera XT DNA Sample Prep Kit (24 sample hoặc 96 Samples)	1	
3	FC-131-1001	Nextera XT Index Kit (24 indices hoặc 96 Indices, 384 Samples)	1	
5	<b>MS-102-2003</b>	<b>Miseq V2 300 cycle reagent kit</b>	1 bộ	
6		Ampure Bead		
7		Qubit	30	
8		Vật tư tiêu hao ống PCR, đầu côn, agarose, PhiX Control		

#### 2. Chuẩn bị mẫu và các hóa chất, vật tư khác

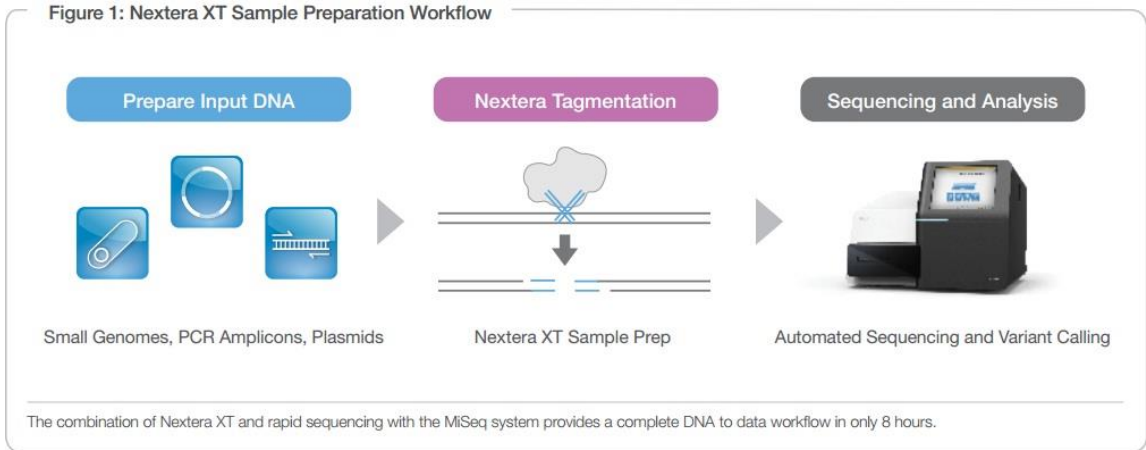
- 0.2ml PCR tube
- 1.5ml microcentrifuge tube
- AMPure XP beads 2° to 8°C
- 80% Ethanol (chuẩn bị mới)
- 0.2 N NaOH
- Resuspension Buffer

#### 3. Thiết bị phòng Lab

- Máy PCR
- Block nhiệt
- Giá từ
- Qubit

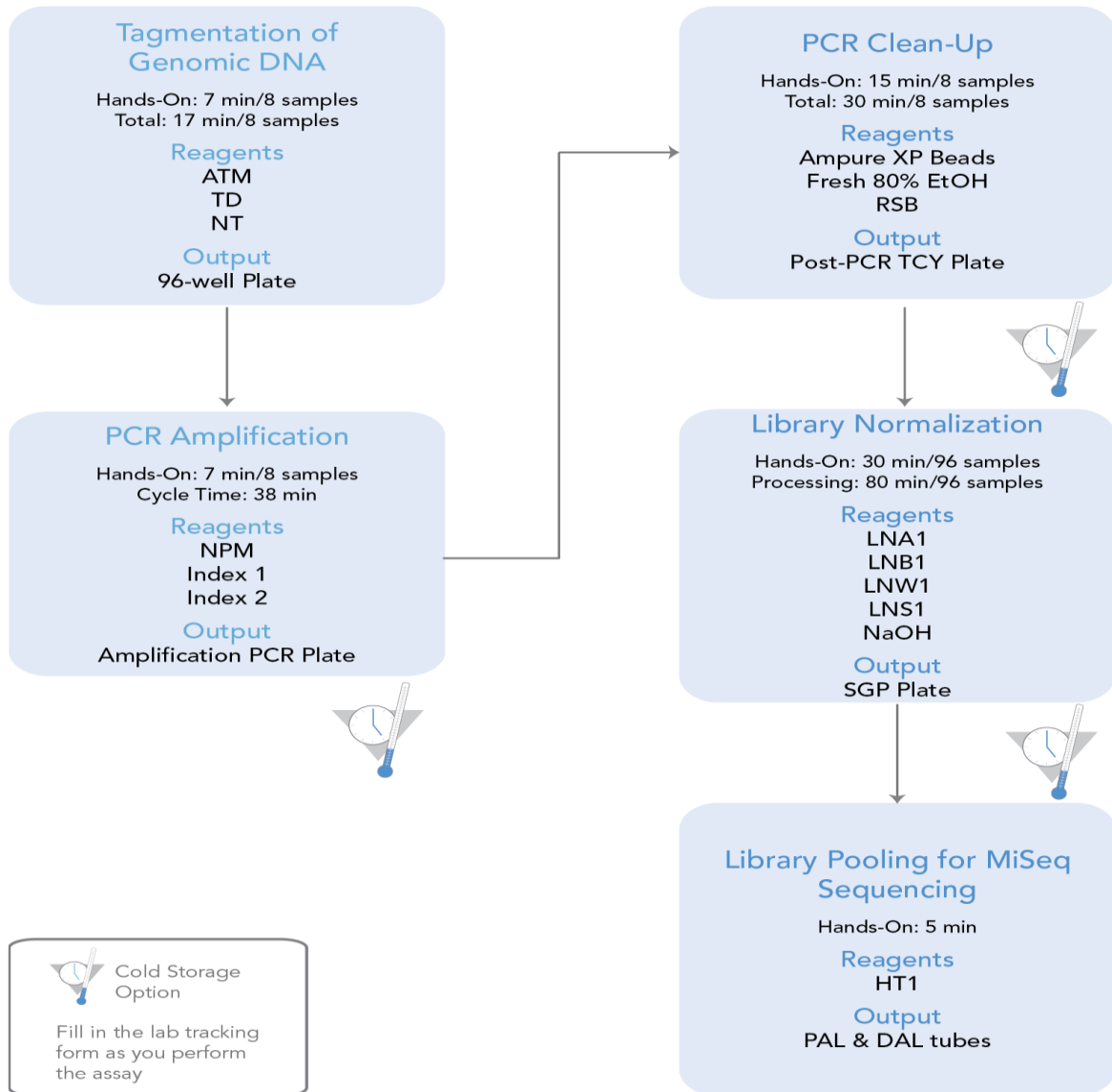
#### 4. Tài liệu hướng dẫn

- a) Nextera XT Sample Preparation Guide
- b) KAPA Library Quantification Kits
- c) Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq
- d) Hướng dẫn sử dụng bộ Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo)



## Quy trình chuẩn bị mẫu sử dụng Nextera XT Sample Prep Kit

### Chuẩn bị mẫu cho giải trình tự





## I. Các bước tiến hành

1. Tách chiết DNA tổng số vi khuẩn
2. Đo nồng độ DNA tổng số
3. Chuẩn bị thư viện giải trình tự
4. Phân tích kết quả

## II. Quy trình

### 1. Tách chiết DNA tổng số vi khuẩn sử dụng bộ Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (đối với vi khuẩn Lao)

Để đạt hiệu quả tối đa, bổ sung beta-mercaptoethanol vào Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer tới nồng độ pha loãng cuối cùng 0.5% (v/v) tức là 500 $\mu$ l trong 100ml.

1. Bổ sung 50-100mg tế bào (nấm hoặc vi khuẩn) đã được hòa tan trong 200 $\mu$ l nước hoặc PBS hoặc 200mg mô vào ZR Bashing Bead Lysis Tube. Bổ sung 750 $\mu$ l Lysis Solution vào trong ống.
2. Đảm bảo ống bead khít với bộ phân giữ (Disruptor Genie) và tiến hành ở vận tốc tối đa trong vòng 5 phút.
3. Ly tâm ZR Bashing Bead Lysis Tube ở vận tốc 1000 x g trong vòng 1 phút
4. Chuyển 400  $\mu$ l dịch lỏng sang Zymo-Spin IV Spin Filter (nắp màu vàng) trong ống Collection và ly tâm ở 7000 rpm (~ 7000 x g) trong 1 phút.
5. Bổ sung 1200  $\mu$ l Fungal/Bacteria DNA Binding Buffer vào trong màng lọc của ống Collection từ bước 4. (chia làm 2 lần mỗi lần 600  $\mu$ l)
6. Chuyển 800  $\mu$ l hỗn hợp từ bước 5 vào Zymo-Spin IIV Column trong ống Collection và ly tâm ở 10000 x g trong 1 phút.
7. Loại bỏ phần dịch trong ống Collection và lặp lại bước 6
8. Bổ sung 200  $\mu$ l DNA Pre-Wash Buffer vào Zymo-Spin IIC Column trong ống Collection mới và ly tâm ở 10000 x g trong 1 phút.
9. Bổ sung 500  $\mu$ l Fungal/ Bacteria DNA Wash Buffer vào Zymo-Spin IIC Column và ly tâm ở 10000 x g trong 1 phút.
10. Chuyển Zymo-Spin IIC Column vào một ống tube 1.5 ml sạch và bổ sung 100  $\mu$ l (tối thiểu là 25  $\mu$ l) DNA Elution Buffer trực tiếp vào cột. Để nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm ở 10 000 x g trong 30 giây để thu lấy DNA.

**Lưu ý: Tùy từng loại vi khuẩn mà có thể sử dụng các bộ Kit tách chiết DNA tổng số khác nhau**

### 2. Đo và chuẩn hóa nồng độ DNA

- a) **Mục đích:** đo nồng độ sản phẩm PCR thu được và pha loãng về nồng độ yêu cầu cho bước chuẩn bị mẫu cho quá trình giải trình tự.

Sử dụng: máy Qubit, các ống đo chuyên dụng và bộ kit: dsDNA HS Assay

**b) Quy trình:**

- Pha hóa chất Qubit Working Solution theo tỷ lệ 1 ul Qubit reagent: 199 ul Qubit Buffer.
- Pha hỗn hợp dung dịch đo nồng độ DNA trong các ống đo chuyên dụng theo các bước như sau:
  - Standard : 10 ul standard trong 190 ul Qubit working solution
  - Mẫu cần đo nồng độ DNA: 2 ul mẫu trong 198 ul Qubit working solution.
- Đưa standard và mẫu vào máy Qubit và đo nồng độ DNA.
- Hòa trộn các sản phẩm PCR theo nồng độ đồng đều.
- Pha loãng hỗn hợp trên đến nồng độ 0.2 ng/ul.

**3. Cắt DNA thành các đoạn ngắn**

**a) Mục đích:** Cắt DNA thành những đoạn ngắn.

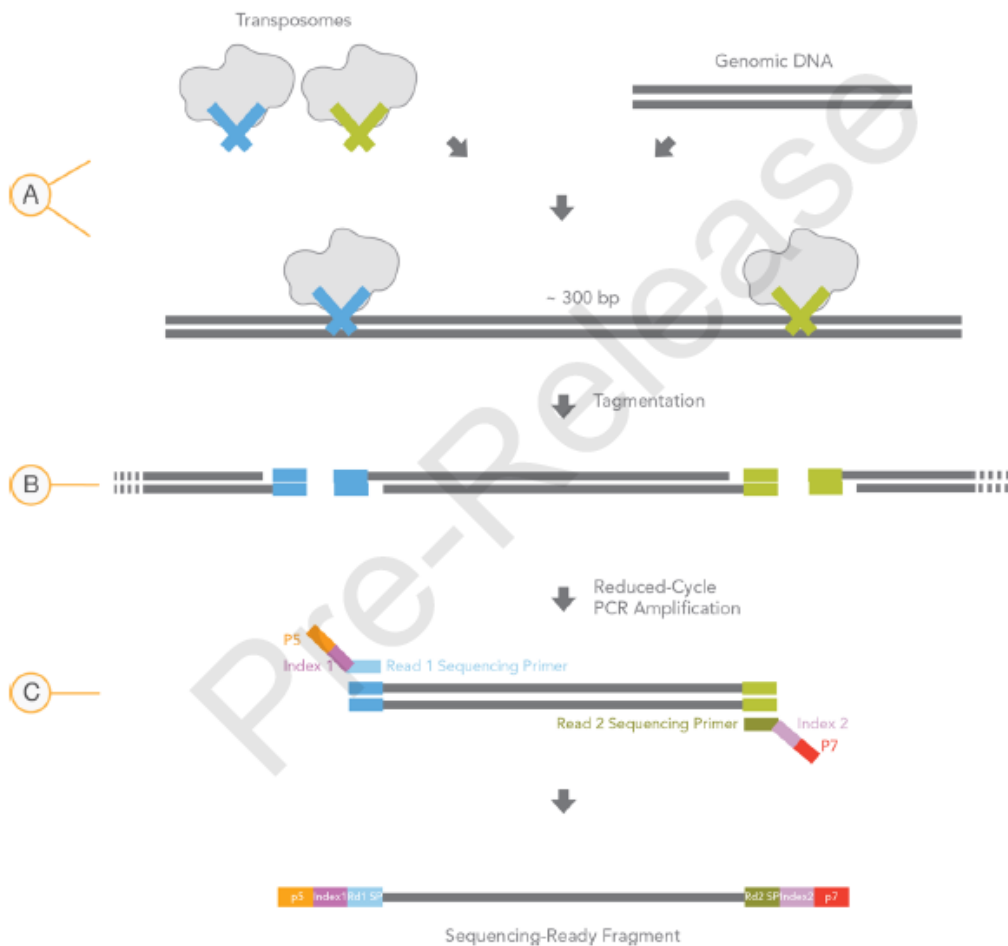
**b) Chuẩn bị:**

- Bộ kit Nextera XT sample preparation (24 mẫu)
- Bộ kit Nextera XT index (24 index, 96 mẫu)
- Sử dụng protocol chuẩn bị mẫu
- Ống PCR 0.2ml

**c) Quy trình**

- Rã đông các ống ATM (*Amplicon Tagment Mix*), TD (*Tagment DNA Buffer*), và các mẫu DNA, giữ trong khay đá.
- Làm ấm ống NT (*Neutralize Tagment Buffer*) đến nhiệt độ phòng.
- Sau khi rã đông, nhẹ nhàng đảo ngược các ống hóa chất 3-5 lần để trộn đều.
- Chuẩn bị NTA (*Nextera XT Tagment Amplicon*) .Mục đích: kích hoạt enzym ở nhiệt độ 55°C để cắt DNA thành những đoạn có kích thước khoảng 300 bp.
- Ký hiệu ống PCR mới là NTA.
- Cho 10 ul dung dịch đệm TD vào mỗi ống, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Cho 5 ul hỗn hợp DNA của từng mẫu (đã pha loãng đến nồng độ 0,2 ng / ml) vào mỗi ống NTA riêng biệt.
- Thêm 5 ul ATM vào các ống, hút nhả pipet 5 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác,
- Đậy nắp các ống và ly tâm ở 280 xg ở 20 ° C trong 1 phút để đảm bảo các hóa chất được tập trung ở phần đáy ống
- Đưa các ống NTA vào máy PCR và chạy chương trình sau để kích hoạt enzym:
  - 55 ° C: 5 min
  - Hold: 10 ° C
- Ngay sau khi đạt đến 10°C, chuyển ngay sang bước tiếp theo.

- Vô hiệu hóa enzym trong các ống NTA. Mục đích: vô hiệu hóa enzym cắt, loại bỏ nguy cơ DNA sẽ tiếp tục bị phân cắt ở các bước tiếp theo
- Cần thận mở nắp các ống NTA và thêm 5 ul đệm NT vào từng ống để vô hiệu hóa enzym, hút nhỏ pipet 5 lần để trộn đều, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Đậy nắp và ly tâm ở 280 xg ở 20 ° C trong 1 phút.
- Ủ các ống NTA ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để đảm bảo enzym bị bất hoạt hoàn toàn



- A** Nextera XT transposome with adapters is combined with template DNA  
**B** Tagmentation to fragment and add adapters  
**C** Limited cycle PCR to add sequencing primer sequences and indices

#### 4. PCR gắn Index

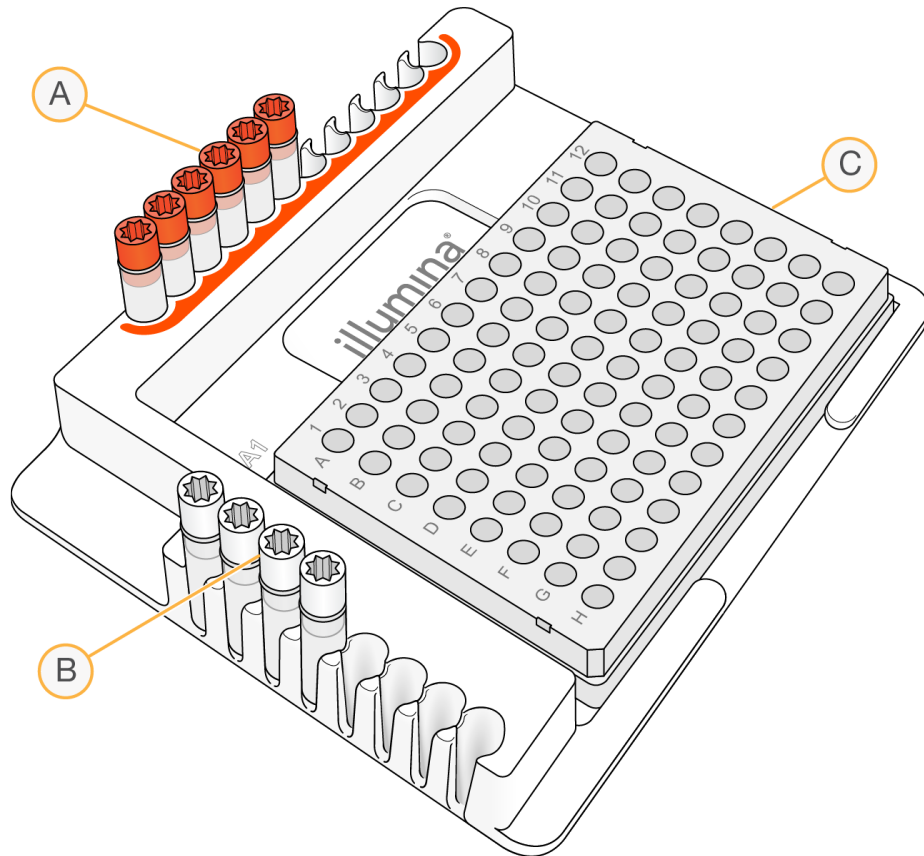
##### a) Hóa chất

- NPM: 15 ul mỗi mẫu.
- Nextera XT Index 1 Primers (N7XX): 5 μl mỗi mẫu
- Nextera XT Index 2 Primers (S5XX) :5 μl mỗi mẫu
- 0.2 ml PCR tube

## b) Quy trình

### Chuẩn bị:

- Rã đông hóa chất NPM (Nextera PCR Master Mix) và các index ở nhiệt độ phòng trong khoảng 20 phút, nhẹ nhàng đảo thuận nghịch các ống 3-5 lần.
- Do index được gắn vào 2 đầu các sợi đơn DNA, Theo bộ kit 96 index, sắp xếp các ống index trên đĩa TruSeq Index Plate Fixture như sau:
  - Sắp xếp các index 1 (mỗi I7 có nắp màu cam) để theo chiều ngang,
  - Sắp xếp các index 2 (mỗi I5 có nắp trắng) theo thứ tự theo chiều dọc



A: index 1 (I7)

B: index 2 (I5)

C: Đĩa TruSeq Index Plate Fixture.

- Thêm 15  $\mu$ l NPM vào từng ống mẫu, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Thêm 5  $\mu$ l index 2 (nắp trắng) vào từng ống theo cột, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác. Thêm 5  $\mu$ l index 1 (nắp màu cam) vào từng ống theo hàng, hút nhả pipet 5 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Để tránh ô nhiễm chéo, loại bỏ tất cả các nắp đã dùng và thay bằng nắp mới được cung cấp theo bộ kit.
- Đậy nắp các ống và ly tâm ở 1000 xg ở 20 ° C trong 1 phút, để đảm bảo các hóa chất tập trung dưới đáy ống.

- Thành phần phản ứng như sau:

Thành phần	Thể tích
DNA sau khi targmentation	25 $\mu$ l
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 $\mu$ l
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 $\mu$ l
NPM	15 $\mu$ l
Tổng số	50 $\mu$ l

- Tiến hành phản ứng PCR để gắn index theo chu trình nhiệt sau:

72°C: 3 phút

95°C: 30sec

12 cycles of: 95°C: 10 sec

55°C: 30 sec

72°C: 30 sec

72°C: 5 phút

10°C:  $\infty$

Lưu ý: nếu chưa sử dụng sản phẩm PCR, có thể bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C trong 2 ngày.

## 5. Tinh sạch sản phẩm PCR

### a) Chuẩn bị:

- AMPure XP beads 90  $\mu$ l/ mẫu (đối với các mẫu có kích thước 300-500bp) (đưa về nhiệt độ thường trước khi sử dụng)
- Pha 80% Ethanol (EtOH) (400  $\mu$ l mỗi mẫu) từ EtOH tuyệt đối
- 0.2 ml PCR tube
- Giá từ

### b) Quy trình

- Tùy thuộc vào kích thước amplicon mà thể tích AMPure Bead sử dụng sẽ khác nhau

Kích thước amplicon	AMPure XP sử dụng	Thể tích AMPure XP
< 300 bp	1.8x AMPure XP	90 $\mu$ l
300 – 500 bp	1.8x AMPure XP	90 $\mu$ l
> 500 bp	0.6x AMPure XP (0.5x AmpureXP for 2x250 runs on the MiSeq)	30 $\mu$ l (25 $\mu$ l for 2x250 runs on the MiSeq)

- Ly tâm PCR amplicon Plate ở 1000 xg trong 1 phút (20 ° C).
- Điều chỉnh pipet ở mức 50  $\mu$ l, chuyển sản phẩm PCR sang ống mới. Thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.

- Vortex AMPure XP trong 30 giây, sử dụng pipet, thêm 90  $\mu$ l AMPure XP vào từng mẫu, hút nhả pipet 10 lần đảm bảo các hạt bead được hoàn toàn trộn đều.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để DNA bám vào các hạt bead.
- Đặt ống trên giá từ trong 2 phút, để đảm bảo lực từ giữ chặt hạt bead cùng với DNA bám trên đó.
- Sử dụng pipet hút toàn bộ dịch nổi trong ống, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Giữ nguyên plate trên giá từ, tiến hành các bước rửa với ethanol 80% như sau:
  - Thêm 200  $\mu$ l ethanol 80% vào các ống.
  - Để trong 30 giây.
  - Cẩn thận loại bỏ dịch nổi.
- Giữ nguyên plate trên giá từ, lặp lại bước rửa trên 1 lần nữa như sau:
  - Thêm 200  $\mu$ l ethanol 80% vào các ống.
  - Để trong 30 giây.
  - Cẩn thận loại bỏ dịch nổi.
- Giữ nguyên plate trên giá từ, để khô tự nhiên trong 15 phút.
- Nhấc plate khỏi giá từ,
- Dùng pipet thêm 52,5  $\mu$ l RSB (*Resuspension Buffer*) vào từng ống mẫu, hút nhả pipet 10 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác, bước này nhằm mục đích thổi DNA ra khỏi hạt bead.
- Để ở nhiệt độ phòng trong 2 phút, để đảm bảo DNA được thổi hết ra khỏi hạt bead.
- Đặt các ống lên giá từ trong 2 phút, để lực từ hút hết các hạt bead xuống dưới, lúc này phần dịch nổi là phần có chứa DNA.
- Ký hiệu một plate mới
- Dùng pipet, cẩn thận chuyển 50  $\mu$ l dịch nổi từ plate cũ sang plate mới, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.

Lưu ý: có thể bảo quản mẫu tinh sạch ở nhiệt độ từ -15 đến -25°C trong vòng 1 tuần

## 6. Chuẩn hóa mẫu, định lượng thư viện

### a) Chuẩn bị hóa chất

- LNA1 (Library Normalization Additives 1)
- LNB1 (Library Normalization Beads 1)
- LNW1 (Library Normalization Wash 1)
- LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1)
- 0.1 N NaOH
- 96-well plate: 2 plate
- Ống tube 15 ml : 1 ống

## b) Đo nồng độ DNA bằng Qubit

- Sử dụng: máy Qubit, các ống đo chuyên dụng và bộ kit: dsDNA HS Assay
- Pha hóa chất Qubit Working Solution theo tỷ lệ 1 ul QuBit reagent: 199 ul QuBit Buffer.
- Pha hỗn hợp dung dịch đo nồng độ DNA trong các ống đo chuyên dụng theo các bước như sau:
- Standard : 10 ul standard trong 190 ul Qubit working solution
- Mẫu cần đo nồng độ DNA: 2 ul mẫu trong 198 ul Qubit working solution.
- Đưa standard và mẫu vào máy Qubit và đo nồng độ DNA.
- **Tính toán nồng độ của DNA sang nM dựa trên kích thước DNA theo công thức như sau:**

$$\frac{(\text{concentration in ng/}\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$

For example:

$$\frac{15 \text{ ng/}\mu\text{l}}{(660 \text{ g/mol} \times 500)} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

## c) Quy trình chuẩn hóa mẫu

- Rã đông ống LNA1 (*Library Normalization Additives 1*) đến nhiệt độ phòng, bằng cách ngâm trong bể nước có nhiệt độ 20 ° đến 25 ° C.
- Làm ấm ống LNB1 (*Library Normalization Beads 1*) và LNW1 (*Library Normalization Wash 1*) ở nhiệt độ phòng , bằng các ngâm trong bể nước có nhiệt độ 20 ° đến 25 ° C.
- Voltex LNB1 trong ít nhất 1 phút và đảo nghịch liên tục khoảng 15 đến 20 lần
- Làm ấm ống LNS1 (*Library Normalization Storage Buffer 1*) về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Đánh dấu một plate 96 sạch
- Cẩn thận chuyển 20 ul dịch nổi từ sản phẩm PCR tinh sạch, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.  
Hút 1,1 mL LNA1 (hóa chất xúc tác DNA bám vào hạt bead) vào 1 ống Eppendorf 1.5 ml.
- Dùng pipet P1000, hút nhả pipet trong ống LNB1 20 lần để trộn đều hạt bead.
- Hút 200 ul LNB1 vào ống Eppendorf chứa sẵn LNA1, trộn đều bằng cách đảo ngược ống 20 lần.
- Hút 45 ul hỗn hợp LNA1/LNB1 vào mỗi ống LNP đã chứa sẵn mẫu.
- Đóng chặt nắp các ống LNP, và lắc các ống LNP trên tại vận tốc 1.800 rpm trong 30 phút để đảm bảo các sợi DNA bám vào hạt bead với mật độ đồng đều.

- Để các ống trên giá từ trong 2 phút để lực từ hút các hạt bead có gắn DNA xuống đáy ống.
- Giữ nguyên các ống LNP trên giá từ, vận pipet đến 80 ul, cẩn thận loại bỏ dịch nổi.
- Nhấc các ống LNP ra khỏi giá từ và tiến hành bước rửa với LNW1 như sau:
  - Thêm 45 ul LNW1 mỗi ống.
  - Đóng chặt nắp các ống.
  - Lắc với vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút.
  - Đặt các ống trên giá từ trong 2 phút.
  - Cẩn thận loại bỏ dịch nổi, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Nhấc các ống LNP ra khỏi giá từ và tiến hành bước rửa lần 2 với LNW1 như sau:
  - Thêm 45 ul LNW1 mỗi ống.
  - Đóng chặt nắp các ống.
  - Lắc với vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút.
  - Đặt các ống trên giá từ trong 2 phút.
  - Cẩn thận loại bỏ dịch nổi, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Nhấc các ống LNP khỏi giá từ, thêm 30 ul NaOH 0,1 N vào các ống để thổi mẫu.
- Đóng chặt nắp và lắc ống LNP tại vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút để đảm bảo DNA bị thổi hết khỏi hạt bead.
- Trong khi lắc, chuẩn bị ống SGP (StoraGe Plate) (là ống PCR)
- Cho 30 ul hóa chất bảo quản DNA LNS1 vào mỗi ống SGP.
- Sau 5 phút lắc, kiểm tra, đảm bảo tất cả các mẫu trong tám LNP đã trộn đều hoàn toàn. Nếu thấy các mẫu không trộn đều hoàn toàn, nhẹ nhàng hút nhả pipet 3 đến 5 lần, lắc thêm trong 5 phút nữa.
- Đặt các ống LNP trên giá từ trong 2 phút để hút toàn bộ hạt bead xuống đáy ống.
- Thiết lập pipet đến 30 ul, chuyển dịch nổi chứa DNA từ ống LNP sang ống SGP, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Đóng chặt nắp ống, ly tâm ở 1.000 xg trong 1 phút.

*Lưu ý:* có thể giữ các ống ở nhiệt độ -15 đến -20 °C nếu chưa muốn chạy giải trình tự ngay.

## **7. Đưa mẫu vào máy Miseq**

### **a) Chuẩn bị:**

- Điều chỉnh Block nhiệt cho ống 1.5ml ở 96 °C
- Rã đông hóa chất Miseq Reagent để ở nhiệt độ phòng
- Water ice
- HT1
- Resuspension Buffer



## **b) Quy trình**

- Nếu ống SGP đã được bảo quản đông lạnh, làm ấm các ống SGP đến nhiệt độ phòng, hút nhả 3-5 lần trong các ống SGP để trộn đều DNA.
- Ly tâm ống SGP tại 1000xg trong vòng 1 phút ở 20°C đảm bảo DNA tập trung ở phần dung dịch đáy ống
- Ký hiệu ống PAL (Pool Amplicon Library)
- Chuyển 12 ul của mỗi mẫu trong ống SGP sang ống PAL
- Ký hiệu ống DAL mới (Diluted Amplicon Library)
- Thêm 588 ul hóa chất hỗ trợ cho các sợi DNA bám vào flowcell HT1 vào ống DAL
- Chuyển 24 ul hỗn hợp DNA từ Pal sang DAL có chứa HT1. Sử dụng cùng đầu côn mix đều 3-5 lần
- Vortex ống DAL với tốc độ cao nhất
- Đưa ống DAL vào block nhiệt ở 96°C, ủ trong 2 phút để đảm bảo các sợi đơn DNA biến tính hoàn toàn thành mạch đơn DNA
- Sau khi ủ, đảo ngược ống DAL 1-2 lần để pha trộn và đặt vào box nước đã ngay lập tức trong vòng 5 phút
- Đưa toàn bộ hỗn hợp trong hộp DAL vào khay Miseq Reagent Cartridge theo vị trí load Samples trên khay
- Đưa vào thao tác trên miseq

**Phụ lục 8****DANH SÁCH MẪU NGHIÊN CỨU**

<b>STT</b>	<b>Mã hộ</b>	<b>Thôn</b>	<b>Loại mẫu</b>	<b>Mã mẫu</b>
1	H001	An Hòa	Phân động vật	AS5
2	H001	An Hòa	Phân động vật	AS6
3	H001	An Hòa	Rau	F5
4	H001	An Hòa	Thịt	F6
5	H001	An Hòa	Phân người	HS11
6	H001	An Hòa	Phân người	HS12
7	H001	An Hòa	Phân người	HS13
8	H001	An Hòa	Phân người	HS14
9	H001	An Hòa	Phân người	HS197
10	H001	An Hòa	Nước mưa	W10
11	H001	An Hòa	Nước giếng	W9
12	H004	An Hòa	Phân động vật	AS10
13	H004	An Hòa	Phân động vật	AS11
14	H004	An Hòa	Rau	F11
15	H004	An Hòa	Thịt	F12
16	H004	An Hòa	Phân người	HS17
17	H004	An Hòa	Phân người	HS18
18	H004	An Hòa	Phân người	HS19
19	H004	An Hòa	Nước giếng	W6
20	H004	An Hòa	Nước mưa	W7
21	H004	An Hòa	Nước tưới	W8
22	H011	Hòa Ngãi	Rau	F92
23	H011	Hòa Ngãi	Thịt	F93
24	H011	Hòa Ngãi	Phân người	HS149
25	H011	Hòa Ngãi	Phân người	HS150
26	H011	Hòa Ngãi	Phân người	HS151
27	H011	Hòa Ngãi	Phân người	HS205
28	H011	Hòa Ngãi	Nước mưa	W104
29	H011	Hòa Ngãi	Nước giếng	W105
30	H017	An Hòa	Phân động vật	AS7
31	H017	An Hòa	Phân động vật	AS8
32	H017	An Hòa	Rau	F7
33	H017	An Hòa	Thịt	F8
34	H017	An Hòa	Phân người	HS20
35	H017	An Hòa	Phân người	HS21
36	H017	An Hòa	Nước giếng	W13
37	H017	An Hòa	Nước mưa	W14
38	H020	An Hòa	Phân động vật	AS9

39	H020	An Hòa	Thịt	F10
40	H020	An Hòa	Rau	F9
41	H020	An Hòa	Phân người	HS15
42	H020	An Hòa	Phân người	HS16
43	H020	An Hòa	Phân người	HS196
44	H020	An Hòa	Nước giếng	W11
45	H020	An Hòa	Nước mưa	W12
46	H023	Hòa Ngãi	Rau	F117
47	H023	Hòa Ngãi	Thịt	F118
48	H023	Hòa Ngãi	Phân người	HS193
49	H023	Hòa Ngãi	Phân người	HS194
50	H023	Hòa Ngãi	Phân người	HS195
51	H023	Hòa Ngãi	Nước mưa	W132
52	H023	Hòa Ngãi	Nước giếng	W133
53	H024	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS85
54	H024	Hòa Ngãi	Rau	F108
55	H024	Hòa Ngãi	Thịt	F109
56	H024	Hòa Ngãi	Phân người	HS180
57	H024	Hòa Ngãi	Phân người	HS181
58	H024	Hòa Ngãi	Phân người	HS182
59	H024	Hòa Ngãi	Phân người	HS183
60	H024	Hòa Ngãi	Nước mưa	W121
61	H024	Hòa Ngãi	Nước giếng	W122
62	H026	An Hòa	Phân động vật	AS1
63	H026	An Hòa	Phân động vật	AS2
64	H026	An Hòa	Rau	F1
65	H026	An Hòa	Thịt	F2
66	H026	An Hòa	Phân người	HS5
67	H026	An Hòa	Phân người	HS6
68	H026	An Hòa	Nước mưa	W4
69	H026	An Hòa	Nước mưa	W5
70	H028	An Hòa	Phân động vật	AS3
71	H028	An Hòa	Phân động vật	AS4
72	H028	An Hòa	Rau	F3
73	H028	An Hòa	Thịt	F4
74	H028	An Hòa	Phân người	HS10
75	H028	An Hòa	Phân người	HS7
76	H028	An Hòa	Phân người	HS8
77	H028	An Hòa	Phân người	HS9
78	H028	An Hòa	Nước giếng	W1
79	H028	An Hòa	Nước mưa	W2
80	H028	An Hòa	Nước tưới	W3
81	H041	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS77

82	H041	Hòa Ngãi	Rau	F94
83	H041	Hòa Ngãi	Thịt	F95
84	H041	Hòa Ngãi	Phân người	HS152
85	H041	Hòa Ngãi	Phân người	HS153
86	H041	Hòa Ngãi	Phân người	HS154
87	H041	Hòa Ngãi	Phân người	HS155
88	H041	Hòa Ngãi	Nước mưa	W106
89	H041	Hòa Ngãi	Nước giếng	W107
90	H043	Hòa Ngãi	Rau	F102
91	H043	Hòa Ngãi	Thịt	F103
92	H043	Hòa Ngãi	Phân người	HS168
93	H043	Hòa Ngãi	Phân người	HS169
94	H043	Hòa Ngãi	Phân người	HS170
95	H043	Hòa Ngãi	Phân người	HS171
96	H043	Hòa Ngãi	Nước mưa	W115
97	H043	Hòa Ngãi	Nước giếng	W116
98	H045	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS74
99	H045	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS75
100	H045	Hòa Ngãi	Rau	F110
101	H045	Hòa Ngãi	Phân người	HS184
102	H045	Hòa Ngãi	Phân người	HS185
103	H045	Hòa Ngãi	Nước mưa	W123
104	H045	Hòa Ngãi	Nước giếng	W124
105	H045	Hòa Ngãi	Nước tưới	W125
106	H061	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS87
107	H061	Hòa Ngãi	Rau	F90
108	H061	Hòa Ngãi	Thịt	F91
109	H061	Hòa Ngãi	Phân người	HS147
110	H061	Hòa Ngãi	Phân người	HS148
111	H061	Hòa Ngãi	Phân người	HS157
112	H061	Hòa Ngãi	Nước mưa	W102
113	H061	Hòa Ngãi	Nước giếng	W103
114	H062	Hòa Ngãi	Rau	F100
115	H062	Hòa Ngãi	Thịt	F101
116	H062	Hòa Ngãi	Phân người	HS164
117	H062	Hòa Ngãi	Phân người	HS165
118	H062	Hòa Ngãi	Phân người	HS166
119	H062	Hòa Ngãi	Phân người	HS167
120	H062	Hòa Ngãi	Nước mưa	W113
121	H062	Hòa Ngãi	Nước giếng	W114
122	H063	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS78
123	H063	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS79
124	H063	Hòa Ngãi	Rau	F96

125	H063	Hòa Ngãi	Thịt	F97
126	H063	Hòa Ngãi	Phân người	HS156
127	H063	Hòa Ngãi	Phân người	HS158
128	H063	Hòa Ngãi	Phân người	HS159
129	H063	Hòa Ngãi	Nước mưa	W108
130	H063	Hòa Ngãi	Nước giếng	W109
131	H063	Hòa Ngãi	Nước tưới	W110
132	H068	Hòa Ngãi	Rau	F113
133	H068	Hòa Ngãi	Thịt	F114
134	H068	Hòa Ngãi	Phân người	HS189
135	H068	Hòa Ngãi	Phân người	HS190
136	H068	Hòa Ngãi	Nước mưa	W128
137	H068	Hòa Ngãi	Nước giếng	W129
138	H069	Hòa Ngãi	Rau	F86
139	H069	Hòa Ngãi	Thịt	F87
140	H069	Hòa Ngãi	Phân người	HS141
141	H069	Hòa Ngãi	Phân người	HS142
142	H069	Hòa Ngãi	Nước mưa	W98
143	H069	Hòa Ngãi	Nước giếng	W99
144	H076	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS83
145	H076	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS84
146	H076	Hòa Ngãi	Rau	F106
147	H076	Hòa Ngãi	Thịt	F107
148	H076	Hòa Ngãi	Phân người	HS176
149	H076	Hòa Ngãi	Phân người	HS177
150	H076	Hòa Ngãi	Phân người	HS178
151	H076	Hòa Ngãi	Phân người	HS179
152	H076	Hòa Ngãi	Nước mưa	W119
153	H076	Hòa Ngãi	Nước giếng	W120
154	H081	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS76
155	H081	Hòa Ngãi	Rau	F88
156	H081	Hòa Ngãi	Thịt	F89
157	H081	Hòa Ngãi	Phân người	HS143
158	H081	Hòa Ngãi	Phân người	HS144
159	H081	Hòa Ngãi	Phân người	HS145
160	H081	Hòa Ngãi	Phân người	HS146
161	H081	Hòa Ngãi	Nước giếng	W100
162	H081	Hòa Ngãi	Nước giếng	W101
163	H102	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS86
164	H102	Hòa Ngãi	Rau	F115
165	H102	Hòa Ngãi	Thịt	F116
166	H102	Hòa Ngãi	Phân người	HS191
167	H102	Hòa Ngãi	Phân người	HS192

168	H102	Hòa Ngãi	Nước mưa	W130
169	H102	Hòa Ngãi	Nước giếng	W131
170	H104	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS82
171	H104	Hòa Ngãi	Rau	F104
172	H104	Hòa Ngãi	Thịt	F105
173	H104	Hòa Ngãi	Phân người	HS172
174	H104	Hòa Ngãi	Phân người	HS173
175	H104	Hòa Ngãi	Phân người	HS174
176	H104	Hòa Ngãi	Phân người	HS175
177	H104	Hòa Ngãi	Nước mưa	W117
178	H104	Hòa Ngãi	Nước giếng	W118
179	H110	Hòa Ngãi	Rau	F111
180	H110	Hòa Ngãi	Thịt	F112
181	H110	Hòa Ngãi	Phân người	HS186
182	H110	Hòa Ngãi	Phân người	HS187
183	H110	Hòa Ngãi	Phân người	HS188
184	H110	Hòa Ngãi	Phân người	HS204
185	H110	Hòa Ngãi	Nước mưa	W126
186	H110	Hòa Ngãi	Nước giếng	W127
187	H111	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS80
188	H111	Hòa Ngãi	Phân động vật	AS81
189	H111	Hòa Ngãi	Rau	F98
190	H111	Hòa Ngãi	Thịt	F99
191	H111	Hòa Ngãi	Phân người	HS160
192	H111	Hòa Ngãi	Phân người	HS161
193	H111	Hòa Ngãi	Phân người	HS162
194	H111	Hòa Ngãi	Phân người	HS163
195	H111	Hòa Ngãi	Nước mưa	W111
196	H111	Hòa Ngãi	Nước giếng	W112
197	H114	Quang Trung	Phân động vật	AS15
198	H114	Quang Trung	Phân động vật	AS16
199	H114	Quang Trung	Rau	F20
200	H114	Quang Trung	Thịt	F21
201	H114	Quang Trung	Phân người	HS39
202	H114	Quang Trung	Phân người	HS40
203	H114	Quang Trung	Phân người	HS51
204	H114	Quang Trung	Phân người	HS52
205	H114	Quang Trung	Nước mưa	W28
206	H114	Quang Trung	Nước giếng	W29
207	H117	Quang Trung	Phân động vật	AS27
208	H117	Quang Trung	Phân động vật	AS30
209	H117	Quang Trung	Rau	F22
210	H117	Quang Trung	Thịt	F23

211	H117	Quang Trung	Phân người	HS22
212	H117	Quang Trung	Phân người	HS23
213	H117	Quang Trung	Phân người	HS24
214	H117	Quang Trung	Nước mưa	W30
215	H117	Quang Trung	Nước giếng	W31
216	H119	Quang Trung	Phân động vật	AS14
217	H119	Quang Trung	Rau	F25
218	H119	Quang Trung	Thịt	F26
219	H119	Quang Trung	Phân người	HS35
220	H119	Quang Trung	Phân người	HS36
221	H119	Quang Trung	Phân người	HS37
222	H119	Quang Trung	Phân người	HS38
223	H119	Quang Trung	Nước mưa	W15
224	H119	Quang Trung	Nước giếng	W16
225	H127	Quang Trung	Phân động vật	AS17
226	H127	Quang Trung	Phân động vật	AS18
227	H127	Quang Trung	Rau	F27
228	H127	Quang Trung	Thịt	F28
229	H127	Quang Trung	Phân người	HS41
230	H127	Quang Trung	Phân người	HS53
231	H127	Quang Trung	Nước giếng	W22
232	H127	Quang Trung	Nước mưa	W23
233	H130	Quang Trung	Phân động vật	AS31
234	H130	Quang Trung	Phân động vật	AS32
235	H130	Quang Trung	Thịt	F30
236	H130	Quang Trung	Rau	F31
237	H130	Quang Trung	Phân người	HS47
238	H130	Quang Trung	Phân người	HS48
239	H130	Quang Trung	Phân người	HS54
240	H130	Quang Trung	Nước giếng	W20
241	H130	Quang Trung	Nước mưa	W21
242	H130	Quang Trung	Nước giếng	W97
243	H131	Quang Trung	Phân động vật	AS28
244	H131	Quang Trung	Phân động vật	AS29
245	H131	Quang Trung	Rau	F15
246	H131	Quang Trung	Thịt	F29
247	H131	Quang Trung	Phân người	HS45
248	H131	Quang Trung	Phân người	HS46
249	H131	Quang Trung	Phân người	HS50
250	H131	Quang Trung	Nước mưa	W19
251	H136	Quang Trung	Phân động vật	AS25
252	H136	Quang Trung	Phân động vật	AS26
253	H136	Quang Trung	Rau	F16

254	H136	Quang Trung	Thịt	F17
255	H136	Quang Trung	Phân người	HS25
256	H136	Quang Trung	Phân người	HS26
257	H136	Quang Trung	Phân người	HS27
258	H136	Quang Trung	Phân người	HS28
259	H136	Quang Trung	Nước mưa	W26
260	H136	Quang Trung	Nước giếng	W27
261	H137	Quang Trung	Phân động vật	AS23
262	H137	Quang Trung	Phân động vật	AS24
263	H137	Quang Trung	Rau	F13
264	H137	Quang Trung	Thịt	F14
265	H137	Quang Trung	Phân người	HS29
266	H137	Quang Trung	Phân người	HS30
267	H137	Quang Trung	Phân người	HS31
268	H137	Quang Trung	Phân người	HS32
269	H137	Quang Trung	Nước mưa	W32
270	H137	Quang Trung	Nước giếng	W33
271	H138	Quang Trung	Phân động vật	AS21
272	H138	Quang Trung	Phân động vật	AS22
273	H138	Quang Trung	Rau	F18
274	H138	Quang Trung	Thịt	F19
275	H138	Quang Trung	Phân người	HS33
276	H138	Quang Trung	Phân người	HS34
277	H138	Quang Trung	Nước mưa	W24
278	H138	Quang Trung	Nước giếng	W25
279	H142	Quang Trung	Phân động vật	AS19
280	H142	Quang Trung	Phân động vật	AS20
281	H142	Quang Trung	Thịt	F24
282	H142	Quang Trung	Phân người	HS42
283	H142	Quang Trung	Phân người	HS43
284	H142	Quang Trung	Phân người	HS44
285	H142	Quang Trung	Phân người	HS49
286	H142	Quang Trung	Nước mưa	W17
287	H144	Dương Xá	Phân động vật	AS65
288	H144	Dương Xá	Rau	F68
289	H144	Dương Xá	Phân người	HS106
290	H144	Dương Xá	Phân người	HS107
291	H144	Dương Xá	Phân người	HS108
292	H144	Dương Xá	Nước mưa	W77
293	H144	Dương Xá	Nước giếng	W78
294	H145	Dương Xá	Phân động vật	AS12
295	H145	Dương Xá	Phân động vật	AS13
296	H145	Dương Xá	Rau	F66



297	H145	Dương Xá	Thịt	F67
298	H145	Dương Xá	Phân người	HS124
299	H145	Dương Xá	Phân người	HS125
300	H145	Dương Xá	Phân người	HS200
301	H145	Dương Xá	Nước mưa	W81
302	H145	Dương Xá	Nước giếng	W82
303	H145	Dương Xá	Nước tưới	W83
304	H146	Dương Xá	Phân động vật	AS61
305	H146	Dương Xá	Phân động vật	AS62
306	H146	Dương Xá	Rau	F64
307	H146	Dương Xá	Thịt	F65
308	H146	Dương Xá	Phân người	HS103
309	H146	Dương Xá	Phân người	HS104
310	H146	Dương Xá	Phân người	HS105
311	H146	Dương Xá	Phân người	HS201
312	H146	Dương Xá	Nước mưa	W74
313	H146	Dương Xá	Nước mưa	W75
314	H146	Dương Xá	Nước tưới	W76
315	H147	Dương Xá	Phân động vật	AS66
316	H147	Dương Xá	Rau	F69
317	H147	Dương Xá	Rau	F70
318	H147	Dương Xá	Thịt	F71
319	H147	Dương Xá	Phân người	HS115
320	H147	Dương Xá	Phân người	HS116
321	H147	Dương Xá	Phân người	HS117
322	H147	Dương Xá	Phân người	HS118
323	H147	Dương Xá	Nước mưa	W84
324	H147	Dương Xá	Nước giếng	W85
325	H147	Dương Xá	Nước tưới	W86
326	H150	Dương Xá	Phân động vật	AS67
327	H150	Dương Xá	Phân động vật	AS73
328	H150	Dương Xá	Rau	F72
329	H150	Dương Xá	Thịt	F73
330	H150	Dương Xá	Phân người	HS131
331	H150	Dương Xá	Phân người	HS132
332	H150	Dương Xá	Phân người	HS133
333	H150	Dương Xá	Nước mưa	W79
334	H150	Dương Xá	Nước giếng	W80
335	H151	Dương Xá	Phân động vật	AS55
336	H151	Dương Xá	Phân động vật	AS56
337	H151	Dương Xá	Rau	F56
338	H151	Dương Xá	Thịt	F57
339	H151	Dương Xá	Phân người	HS91

340	H151	Dương Xá	Phân người	HS92
341	H151	Dương Xá	Phân người	HS93
342	H151	Dương Xá	Nước mưa	W59
343	H151	Dương Xá	Nước giếng	W60
344	H151	Dương Xá	Nước tưới	W68
345	H152	Dương Xá	Phân động vật	AS57
346	H152	Dương Xá	Phân động vật	AS58
347	H152	Dương Xá	Rau	F58
348	H152	Dương Xá	Thịt	F59
349	H152	Dương Xá	Phân người	HS94
350	H152	Dương Xá	Phân người	HS95
351	H152	Dương Xá	Phân người	HS96
352	H152	Dương Xá	Phân người	HS97
353	H152	Dương Xá	Nước mưa	W66
354	H152	Dương Xá	Nước giếng	W67
355	H153	Dương Xá	Phân động vật	AS53
356	H153	Dương Xá	Phân động vật	AS54
357	H153	Dương Xá	Rau	F54
358	H153	Dương Xá	Thịt	F55
359	H153	Dương Xá	Phân người	HS88
360	H153	Dương Xá	Phân người	HS89
361	H153	Dương Xá	Phân người	HS90
362	H153	Dương Xá	Nước mưa	W56
363	H153	Dương Xá	Nước giếng	W57
364	H153	Dương Xá	Nước tưới	W58
365	H154	Dương Xá	Phân động vật	AS71
366	H154	Dương Xá	Rau	F82
367	H154	Dương Xá	Thịt	F83
368	H154	Dương Xá	Phân người	HS112
369	H154	Dương Xá	Phân người	HS113
370	H154	Dương Xá	Phân người	HS114
371	H154	Dương Xá	Nước mưa	W93
372	H154	Dương Xá	Nước giếng	W94
373	H155	Dương Xá	Rau	F78
374	H155	Dương Xá	Thịt	F79
375	H155	Dương Xá	Phân người	HS126
376	H155	Dương Xá	Phân người	HS127
377	H155	Dương Xá	Phân người	HS128
378	H155	Dương Xá	Phân người	HS203
379	H155	Dương Xá	Nước mưa	W91
380	H155	Dương Xá	Nước giếng	W92
381	H156	Dương Xá	Phân động vật	AS68
382	H156	Dương Xá	Rau	F74

383	H156	Dương Xá	Thịt	F75
384	H156	Dương Xá	Phân người	HS109
385	H156	Dương Xá	Phân người	HS110
386	H156	Dương Xá	Phân người	HS111
387	H156	Dương Xá	Nước mưa	W87
388	H156	Dương Xá	Nước giếng	W88
389	H168	Dương Xá	Phân động vật	AS60
390	H168	Dương Xá	Rau	F62
391	H168	Dương Xá	Thịt	F63
392	H168	Dương Xá	Phân người	HS100
393	H168	Dương Xá	Phân người	HS101
394	H168	Dương Xá	Phân người	HS102
395	H168	Dương Xá	Nước mưa	W72
396	H168	Dương Xá	Nước giếng	W73
397	H171	Dương Xá	Phân động vật	AS72
398	H171	Dương Xá	Rau	F76
399	H171	Dương Xá	Thịt	F77
400	H171	Dương Xá	Phân người	HS121
401	H171	Dương Xá	Phân người	HS122
402	H171	Dương Xá	Phân người	HS123
403	H171	Dương Xá	Nước mưa	W134
404	H171	Dương Xá	Nước giếng	W135
405	H175	Dương Xá	Phân động vật	AS69
406	H175	Dương Xá	Phân động vật	AS70
407	H175	Dương Xá	Rau	F84
408	H175	Dương Xá	Thịt	F85
409	H175	Dương Xá	Phân người	HS119
410	H175	Dương Xá	Phân người	HS120
411	H175	Dương Xá	Phân người	HS202
412	H175	Dương Xá	Nước mưa	W95
413	H175	Dương Xá	Nước mưa	W96
414	H181	Dương Xá	Phân động vật	AS59
415	H181	Dương Xá	Rau	F60
416	H181	Dương Xá	Thịt	F61
417	H181	Dương Xá	Phân người	HS98
418	H181	Dương Xá	Phân người	HS99
419	H181	Dương Xá	Nước mưa	W69
420	H181	Dương Xá	Nước giếng	W70
421	H181	Dương Xá	Nước tưới	W71
422	H192	Ứng Liêm	Phân động vật	AS41
423	H192	Ứng Liêm	Phân động vật	AS42
424	H192	Ứng Liêm	Thịt	F42
425	H192	Ứng Liêm	Rau	F43

426	H192	Ứng Liêm	Phân người	HS136
427	H192	Ứng Liêm	Phân người	HS3
428	H192	Ứng Liêm	Phân người	HS61
429	H192	Ứng Liêm	Phân người	HS62
430	H192	Ứng Liêm	Phân người	HS63
431	H192	Ứng Liêm	Nước mưa	W44
432	H192	Ứng Liêm	Nước mưa	W45
433	H192	Ứng Liêm	Nước giếng	W46
434	H192	Ứng Liêm	Nước tưới	W47
435	H193	Ứng Liêm	Phân động vật	AS51
436	H193	Ứng Liêm	Phân động vật	AS52
437	H193	Ứng Liêm	Rau	F52
438	H193	Ứng Liêm	Thịt	F53
439	H193	Ứng Liêm	Phân người	HS1
440	H193	Ứng Liêm	Phân người	HS134
441	H193	Ứng Liêm	Phân người	HS135
442	H193	Ứng Liêm	Phân người	HS2
443	H193	Ứng Liêm	Phân người	HS75
444	H193	Ứng Liêm	Phân người	HS76
445	H193	Ứng Liêm	Nước giếng	W63
446	H193	Ứng Liêm	Nước mưa	W64
447	H193	Ứng Liêm	Nước tưới	W65
448	H194	Ứng Liêm	Phân động vật	AS49
449	H194	Ứng Liêm	Phân động vật	AS50
450	H194	Ứng Liêm	Rau	F50
451	H194	Ứng Liêm	Thịt	F51
452	H194	Ứng Liêm	Phân người	HS71
453	H194	Ứng Liêm	Phân người	HS72
454	H194	Ứng Liêm	Phân người	HS73
455	H194	Ứng Liêm	Phân người	HS74
456	H194	Ứng Liêm	Nước giếng	W61
457	H194	Ứng Liêm	Nước mưa	W62
458	H197	Ứng Liêm	Phân động vật	AS35
459	H197	Ứng Liêm	Phân động vật	AS36
460	H197	Ứng Liêm	Rau	F36
461	H197	Ứng Liêm	Thịt	F37
462	H197	Ứng Liêm	Phân người	HS85
463	H197	Ứng Liêm	Phân người	HS86
464	H197	Ứng Liêm	Nước giếng	W38
465	H197	Ứng Liêm	Nước mưa	W39
466	H197	Ứng Liêm	Nước tưới	W40
467	H198	Ứng Liêm	Phân động vật	AS47
468	H198	Ứng Liêm	Phân động vật	AS48

469	H198	Ứng Liêm	Rau	F48
470	H198	Ứng Liêm	Thịt	F49
471	H198	Ứng Liêm	Phân người	HS81
472	H198	Ứng Liêm	Phân người	HS82
473	H198	Ứng Liêm	Phân người	HS83
474	H198	Ứng Liêm	Phân người	HS84
475	H198	Ứng Liêm	Nước mưa	W53
476	H198	Ứng Liêm	Nước giếng	W54
477	H198	Ứng Liêm	Nước tưới	W55
478	H199	Ứng Liêm	Phân động vật	AS39
479	H199	Ứng Liêm	Phân động vật	AS40
480	H199	Ứng Liêm	Thịt	F40
481	H199	Ứng Liêm	Rau	F41
482	H199	Ứng Liêm	Phân người	HS140
483	H199	Ứng Liêm	Phân người	HS251
484	H199	Ứng Liêm	Phân người	HS87
485	H202	Ứng Liêm	Phân động vật	AS45
486	H202	Ứng Liêm	Phân động vật	AS46
487	H202	Ứng Liêm	Rau	F46
488	H202	Ứng Liêm	Thịt	F47
489	H202	Ứng Liêm	Phân người	HS137
490	H202	Ứng Liêm	Phân người	HS138
491	H202	Ứng Liêm	Phân người	HS59
492	H202	Ứng Liêm	Phân người	HS60
493	H202	Ứng Liêm	Nước mưa	W50
494	H202	Ứng Liêm	Nước giếng	W51
495	H202	Ứng Liêm	Nước tưới	W52
496	H204	Ứng Liêm	Rau	F32
497	H204	Ứng Liêm	Thịt	F33
498	H204	Ứng Liêm	Phân người	HS67
499	H204	Ứng Liêm	Phân người	HS68
500	H204	Ứng Liêm	Phân người	HS69
501	H204	Ứng Liêm	Phân người	HS70
502	H204	Ứng Liêm	Nước mưa	W34
503	H204	Ứng Liêm	Nước giếng	W35
504	H205	Dương Xá	Nước mưa	W139
505	H205	Dương Xá	Nước mưa	W18
506	H205	Dương Xá	Nước mưa	W43
507	H212	Ứng Liêm	Phân động vật	AS33
508	H212	Ứng Liêm	Phân động vật	AS34
509	H212	Ứng Liêm	Rau	F34
510	H212	Ứng Liêm	Thịt	F35
511	H212	Ứng Liêm	Phân người	HS77

512	H212	Ứng Liêm	Phân người	HS78
513	H212	Ứng Liêm	Phân người	HS79
514	H212	Ứng Liêm	Phân người	HS80
515	H212	Ứng Liêm	Nước mưa	W36
516	H212	Ứng Liêm	Nước giếng	W37
517	H217	Ứng Liêm	Phân động vật	AS43
518	H217	Ứng Liêm	Phân động vật	AS44
519	H217	Ứng Liêm	Rau	F44
520	H217	Ứng Liêm	Thịt	F45
521	H217	Ứng Liêm	Phân người	HS55
522	H217	Ứng Liêm	Phân người	HS56
523	H217	Ứng Liêm	Phân người	HS57
524	H217	Ứng Liêm	Phân người	HS58
525	H217	Ứng Liêm	Nước mưa	W48
526	H217	Ứng Liêm	Nước giếng	W49
527	H220	Ứng Liêm	Phân động vật	AS37
528	H220	Ứng Liêm	Phân động vật	AS38
529	H220	Ứng Liêm	Rau	F38
530	H220	Ứng Liêm	Thịt	F39
531	H220	Ứng Liêm	Phân người	HS139
532	H220	Ứng Liêm	Phân người	HS4
533	H220	Ứng Liêm	Phân người	HS64
534	H220	Ứng Liêm	Phân người	HS65
535	H220	Ứng Liêm	Phân người	HS66
536	H220	Ứng Liêm	Nước mưa	W41
537	H220	Ứng Liêm	Nước giếng	W42
538	H221	Mậu Chủ	Phân động vật	AS105
539	H221	Mậu Chủ	Thịt	F127
540	H221	Mậu Chủ	Rau	F128
541	H221	Mậu Chủ	Phân người	HS242
542	H221	Mậu Chủ	Phân người	HS243
543	H221	Mậu Chủ	Phân người	HS244
544	H221	Mậu Chủ	Phân người	HS245
545	H221	Mậu Chủ	Nước mưa	W155
546	H221	Mậu Chủ	Nước giếng	W156
547	H228	Mậu Chủ	Phân động vật	AS96
548	H228	Mậu Chủ	Phân động vật	AS97
549	H228	Mậu Chủ	Thịt	F131
550	H228	Mậu Chủ	Thịt	F132
551	H228	Mậu Chủ	Rau	F133
552	H228	Mậu Chủ	Phân người	HS228
553	H228	Mậu Chủ	Phân người	HS229
554	H228	Mậu Chủ	Phân người	HS230

555	H228	Mậu Chủ	Nước giếng	W136
556	H228	Mậu Chủ	Nước mưa	W161
557	H234	Mậu Chủ	Thịt	F134
558	H234	Mậu Chủ	Rau	F135
559	H234	Mậu Chủ	Phân người	HS240
560	H234	Mậu Chủ	Phân người	HS241
561	H234	Mậu Chủ	Nước mưa	W137
562	H234	Mậu Chủ	Nước giếng	W138
563	H236	Mậu Chủ	Phân động vật	AS100
564	H236	Mậu Chủ	Phân động vật	AS99
565	H236	Mậu Chủ	Thịt	F138
566	H236	Mậu Chủ	Rau	F139
567	H236	Mậu Chủ	Phân người	HS233
568	H236	Mậu Chủ	Phân người	HS234
569	H236	Mậu Chủ	Phân người	HS235
570	H236	Mậu Chủ	Phân người	HS236
571	H236	Mậu Chủ	Nước mưa	W141
572	H236	Mậu Chủ	Nước giếng	W142
573	H238	Mậu Chủ	Phân động vật	AS92
574	H238	Mậu Chủ	Thịt	F121
575	H238	Mậu Chủ	Rau	F122
576	H238	Mậu Chủ	Phân người	HS209
577	H238	Mậu Chủ	Phân người	HS210
578	H238	Mậu Chủ	Phân người	HS211
579	H238	Mậu Chủ	Phân người	HS247
580	H238	Mậu Chủ	Nước mưa	W149
581	H238	Mậu Chủ	Nước giếng	W150
582	H248	Mậu Chủ	Phân động vật	AS107
583	H248	Mậu Chủ	Phân động vật	AS94
584	H248	Mậu Chủ	Thịt	F125
585	H248	Mậu Chủ	Rau	F126
586	H248	Mậu Chủ	Phân người	HS216
587	H248	Mậu Chủ	Phân người	HS217
588	H248	Mậu Chủ	Phân người	HS218
589	H248	Mậu Chủ	Phân người	HS219
590	H248	Mậu Chủ	Nước mưa	W153
591	H248	Mậu Chủ	Nước giếng	W154
592	H250	Mậu Chủ	Phân động vật	AS98
593	H250	Mậu Chủ	Thịt	F136
594	H250	Mậu Chủ	Rau	F137
595	H250	Mậu Chủ	Phân người	HS231
596	H250	Mậu Chủ	Phân người	HS232
597	H250	Mậu Chủ	Phân người	HS248

598	H250	Mậu Chủ	Phân người	HS249
599	H250	Mậu Chủ	Nước giếng	W140
600	H252	Mậu Chủ	Phân động vật	AS88
601	H252	Mậu Chủ	Phân động vật	AS89
602	H252	Mậu Chủ	Thịt	F119
603	H252	Mậu Chủ	Rau	F120
604	H252	Mậu Chủ	Phân người	HS206
605	H252	Mậu Chủ	Phân người	HS207
606	H252	Mậu Chủ	Phân người	HS208
607	H252	Mậu Chủ	Phân người	HS246
608	H252	Mậu Chủ	Nước mưa	W147
609	H252	Mậu Chủ	Nước giếng	W148
610	H257	Mậu Chủ	Phân động vật	AS106
611	H257	Mậu Chủ	Thịt	F144
612	H257	Mậu Chủ	Rau	F145
613	H257	Mậu Chủ	Phân người	HS220
614	H257	Mậu Chủ	Phân người	HS221
615	H257	Mậu Chủ	Phân người	HS222
616	H257	Mậu Chủ	Phân người	HS223
617	H257	Mậu Chủ	Nước mưa	W157
618	H257	Mậu Chủ	Nước giếng	W158
619	H259	Mậu Chủ	Phân động vật	AS95
620	H259	Mậu Chủ	Thịt	F129
621	H259	Mậu Chủ	Rau	F130
622	H259	Mậu Chủ	Phân người	HS224
623	H259	Mậu Chủ	Phân người	HS225
624	H259	Mậu Chủ	Phân người	HS226
625	H259	Mậu Chủ	Phân người	HS227
626	H259	Mậu Chủ	Nước mưa	W159
627	H259	Mậu Chủ	Nước giếng	W160
628	H264	Mậu Chủ	Phân động vật	AS90
629	H264	Mậu Chủ	Phân động vật	AS91
630	H264	Mậu Chủ	Phân động vật	AS93
631	H264	Mậu Chủ	Thịt	F123
632	H264	Mậu Chủ	Rau	F124
633	H264	Mậu Chủ	Phân người	HS212
634	H264	Mậu Chủ	Phân người	HS213
635	H264	Mậu Chủ	Phân người	HS214
636	H264	Mậu Chủ	Phân người	HS215
637	H264	Mậu Chủ	Nước mưa	W151
638	H264	Mậu Chủ	Nước giếng	W152
639	H266	Mậu Chủ	Phân động vật	AS103
640	H266	Mậu Chủ	Phân động vật	AS104



641	H266	Mậu Chủ	Thịt	F141
642	H266	Mậu Chủ	Rau	F142
643	H266	Mậu Chủ	Phân người	HS238
644	H266	Mậu Chủ	Phân người	HS239
645	H266	Mậu Chủ	Nước mưa	W145
646	H266	Mậu Chủ	Nước giếng	W146
647	H269	Mậu Chủ	Phân động vật	AS102
648	H269	Mậu Chủ	Thịt	F140
649	H269	Mậu Chủ	Rau	F143
650	H269	Mậu Chủ	Phân người	HS237
651	H269	Mậu Chủ	Phân người	HS250
652	H269	Mậu Chủ	Nước mưa	W143
653	H269	Mậu Chủ	Nước giếng	W144
654	H269	Mậu Chủ	Phân động vật	AS101
655	H273	Thạch Tô	Phân động vật	AS117
656	H273	Thạch Tô	Phân động vật	AS118
657	H273	Thạch Tô	Rau	F149
658	H273	Thạch Tô	Thịt	F151
659	H273	Thạch Tô	Phân người	HS256
660	H273	Thạch Tô	Phân người	HS265
661	H273	Thạch Tô	Nước mưa	W164
662	H273	Thạch Tô	Nước giếng	W165
663	H275	Thạch Tô	Phân động vật	AS113
664	H275	Thạch Tô	Phân động vật	AS114
665	H275	Thạch Tô	Phân động vật	AS122
666	H275	Thạch Tô	Thịt	F157
667	H275	Thạch Tô	Rau	F158
668	H275	Thạch Tô	Phân người	HS252
669	H275	Thạch Tô	Phân người	HS253
670	H275	Thạch Tô	Nước mưa	W162
671	H275	Thạch Tô	Nước giếng	W163
672	H275	Thạch Tô	Nước tưới	W168
673	H276	Thạch Tô	Phân động vật	AS115
674	H276	Thạch Tô	Phân động vật	AS116
675	H276	Thạch Tô	Rau	F147
676	H276	Thạch Tô	Thịt	F150
677	H276	Thạch Tô	Phân người	HS254
678	H276	Thạch Tô	Phân người	HS255
679	H276	Thạch Tô	Phân người	HS264
680	H276	Thạch Tô	Nước mưa	W166
681	H276	Thạch Tô	Nước giếng	W167
682	H284	Dương Xá	Phân động vật	AS63
683	H284	Dương Xá	Phân động vật	AS64

684	H284	Dương Xá	Rau	F80
685	H284	Dương Xá	Thịt	F81
686	H284	Dương Xá	Phân người	HS129
687	H284	Dương Xá	Phân người	HS130
688	H284	Dương Xá	Phân người	HS198
689	H284	Dương Xá	Phân người	HS199
690	H284	Dương Xá	Nước mưa	W89
691	H284	Dương Xá	Nước giếng	W90
692	H306	Thạch Tô	Phân động vật	AS108
693	H306	Thạch Tô	Phân động vật	AS109
694	H306	Thạch Tô	Thịt	F154
695	H306	Thạch Tô	Rau	F155
696	H306	Thạch Tô	Phân người	HS260
697	H306	Thạch Tô	Phân người	HS261
698	H306	Thạch Tô	Nước mưa	W175
699	H306	Thạch Tô	Nước giếng	W176
700	H306	Thạch Tô	Nước tưới	W177
701	H309	Thạch Tô	Phân động vật	AS110
702	H309	Thạch Tô	Rau	F152
703	H309	Thạch Tô	Thịt	F159
704	H309	Thạch Tô	Phân người	HS262
705	H309	Thạch Tô	Phân người	HS263
706	H309	Thạch Tô	Nước mưa	W178
707	H309	Thạch Tô	Nước giếng	W179
708	H314	Thạch Tô	Phân động vật	AS119
709	H314	Thạch Tô	Phân động vật	AS120
710	H314	Thạch Tô	Phân động vật	AS121
711	H314	Thạch Tô	Thịt	F146
712	H314	Thạch Tô	Rau	F153
713	H314	Thạch Tô	Phân người	HS257
714	H314	Thạch Tô	Phân người	HS258
715	H314	Thạch Tô	Phân người	HS259
716	H314	Thạch Tô	Nước mưa	W172
717	H314	Thạch Tô	Nước giếng	W173
718	H314	Thạch Tô	Nước tưới	W174
719	H321	Thạch Tô	Phân động vật	AS111
720	H321	Thạch Tô	Phân động vật	AS112
721	H321	Thạch Tô	Thịt	F148
722	H321	Thạch Tô	Rau	F156
723	H321	Thạch Tô	Nước mưa	W169
724	H321	Thạch Tô	Nước giếng	W170
725	H321	Thạch Tô	Nước tưới	W171