

PHÁT HIỆN GEN KHÁNG COLISTIN TRONG MẪU PHÂN GÀ VÀ PHÂN LỢN THU THẬP TẠI THÁI BÌNH TRONG GIAI ĐOẠN 2022-2023 BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX REAL-TIME PCR

Nguyễn Nam Thắng^{1*}, Lê Việt Hà¹,
Phan Ngọc Quang¹, Nguyễn Thị Hoa¹,
Nguyễn Thanh Bình¹, Trần Thị Hòa¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phát hiện gen kháng colistin mcr trong mẫu phân gà và phân lợn thu thập tại Thái Bình từ tháng 10/2022 đến tháng 03/2023.

Phương pháp: DNA tổng số được tách chiết từ 60 mẫu phân gà và phân lợn bằng bộ sinh phẩm QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, sau đó được sử dụng để thực hiện kỹ thuật Multiplex Real-time PCR phát hiện trình tự đặc hiệu của các gen kháng colistin mcr-1, mcr-2, mcr-3 và mcr-4 với bộ sinh phẩm QuantiNova Multiplex PCR Kit.

Kết quả: Tỷ lệ mẫu phân gà, phân lợn mang gen kháng colistin là 45,0% (27/60), trong đó tỷ lệ nhiễm ở mẫu phân gà là 50,0% (15/30) và ở mẫu phân lợn là 40,0% (12/30). Tỷ lệ mẫu phân phát hiện gen mcr-1, mcr-2, mcr-3 và mcr-4 lần lượt là 45,0%, 8,3%, 8,3% và 11,7%. Tỷ lệ mẫu phân vật nuôi nhiễm một, hai, ba và bốn gen kháng colistin lần lượt là 28,3%, 8,3%, 5,0% và 3,3%.

Kết luận: Tình trạng nhiễm vi khuẩn mang gen kháng colistin ở gà và lợn tại Thái Bình khá phổ biến và rất đa dạng về kiểu gen kháng colistin. Do đó, cần thực hiện các biện pháp can thiệp phù hợp nhằm ngăn chặn sự xuất hiện và lây lan của các vi khuẩn kháng colistin từ vật nuôi sang con người.

Từ khóa: gen mcr, kháng colistin, multiplex real-time PCR, phân gà, phân lợn

DETECTION OF COLISTIN-RESISTANT GENES IN CHICKEN AND PIG FECES SAMPLES COLLECTED IN THAI BINH DURING THE PERIOD FROM 2022 TO 2023 USING A MULTIPLEX REAL-TIME PCR ASSAY

ABSTRACT

Objective: To detect the colistin resistance gene mcr in chicken and pig feces samples collected in Thai Binh from October 2022 to March 2023.

1. Trường Đại học Y Dược Thái Bình

* Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Nam Thắng

Email: thangnn@tbmc.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/6/2024

Ngày phản biện: 28/6/2024

Ngày duyệt bài: 30/6/2024

Method: Total DNA was extracted from 60 chicken and pig feces samples using QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, then was used to perform a Multiplex Real-time PCR assay to detect specific sequences of colistin resistance genes mcr-1, mcr-2, mcr-3, and mcr-4 using QuantiNova Multiplex PCR Kit.

Results: The rate of chicken and pig feces samples carrying the colistin resistance gene was 45.0% (27/60), of which the detection rate in chicken feces samples was 50.0% (15/30) and in pig feces samples was 40.0% (12/30). The prevalence of stool samples carrying mcr-1, mcr-2, mcr-3 and mcr-4 genes were 45.0%, 8.3%, 8.3% and 11.7%, respectively. The rates of feces samples carrying one, two, three, and four colistin-resistant genes were 28.3%, 8.3%, 5.0%, and 3.3%, respectively.

Conclusions: Infection with bacteria carrying colistin-resistant genes in chickens and pigs in Thai Binh was quite common and very diverse in the genotype of colistin-resistant genes. Therefore, it is necessary to implement appropriate intervention measures to prevent the emergence and spread of colistin-resistant bacteria from livestock to humans.

Keywords: chicken feces, colistin resistance, mcr gene, multiplex real-time PCR, pig feces

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Colistin là kháng sinh quan trọng trong điều trị đối với trực khuẩn Gram âm kháng đa thuốc, đặc biệt là những trường hợp kháng carbapenem [1]. Tuy nhiên trong những năm gần đây, tình trạng vi khuẩn kháng colistin ngày càng phổ biến do sự xuất hiện của gen mcr (mobile colistin resistance gene) gây kháng colistin ở vi khuẩn. Sau khi biến thể mcr-1 được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2015 [2], đến nay đã có tới 10 biến thể của gen mcr (mcr-1 đến mcr-10) được phát hiện [3], trong đó các biến thể mcr-1, mcr-2, mcr-3 và mcr-4 là những biến thể thường gặp nhất.

Nguyên nhân gây ra hiện tượng vi khuẩn kháng colistin được cho là do tình trạng sử dụng colistin quá rộng rãi trong chăn nuôi gia súc, gia cầm [4, 5].

Nghiên cứu tại Thái Bình năm 2017 cho thấy tình trạng sử dụng colistin trong chăn nuôi gia súc, gia cầm khá phổ biến [4]. Các nghiên cứu sau đó đã phát hiện vi khuẩn *E. coli* mang gen kháng colistin *mcr* trong mẫu phân người khỏe mạnh và phân vật nuôi tại Thái Bình cũng rất cao, tỷ lệ phát hiện ở người là 69,4% [6], ở gà và lợn là 95,8% [7]. Với tỷ lệ nhiễm *E. coli* kháng colistin rất cao trên người khỏe mạnh như vậy, có lẽ đã có sự lây lan vi khuẩn kháng colistin từ vật nuôi sang con người thông qua thức ăn, nước uống.

Để ngăn chặn sự lan truyền của vi khuẩn kháng colistin, nhiều kỹ thuật vi sinh và sinh học phân tử đã được áp dụng để phát hiện kiểu hình hoặc kiểu gen kháng colistin ở vi khuẩn [8]. Các kỹ thuật sinh học phân tử (PCR; multiplex PCR; real-time PCR; WGS) được sử dụng để phát hiện gen *mcr* có các ưu điểm là độ nhạy, độ đặc hiệu cao, thời gian xét nghiệm nhanh, tuy nhiên chi phí xét nghiệm cao và yêu cầu kỹ năng xét nghiệm chuyên sâu. Để giảm chi phí và đơn giản hóa kỹ thuật xét nghiệm, một số tác giả đã phát triển các kỹ thuật sinh học phân tử có thể phát hiện đồng thời nhiều biến thể của gen *mcr* trong cùng một phản ứng. Trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ áp dụng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR phát hiện các gen kháng colistin từ *mcr-1* đến *mcr-4* để xét nghiệm cho các mẫu phân gà và phân lợn thu thập tại Thái Bình trong năm 2022 và 2023 nhằm đánh giá tình trạng nhiễm vi khuẩn kháng colistin ở hai loại vật nuôi phổ biến tại Thái Bình là gà và lợn. Kết quả của nghiên cứu sẽ cung cấp các minh chứng và dữ liệu, giúp cho các cơ quan quản lý nhà nước có những biện pháp phù hợp nhằm ngăn chặn tình trạng vi khuẩn kháng thuốc hiện nay.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 30 mẫu phân gà và 30 mẫu phân lợn được thu thập tại Thái Bình trong giai đoạn từ tháng 10/2022 đến tháng 03/2023. Các mẫu phân được sử dụng để xét nghiệm phát hiện các gen kháng colistin *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* và *mcr-4* bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thiết kế theo phương pháp dịch tễ học mô tả dựa trên cuộc điều tra cắt ngang.

2.3. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu và tách chiết DNA

Các mẫu phân gà và phân lợn được thu thập bằng tăm bông chuyên dụng theo phương pháp ngoáy hậu môn. Các mẫu phân sau khi thu thập được bảo quản lạnh và chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết DNA trong vòng 24 giờ. Đối với mỗi mẫu phân, sử dụng khoảng 200 mg phân để tiến hành tách chiết DNA bằng bộ sinh phẩm QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu DNA sau khi tách chiết được bảo quản ở -30°C cho đến khi tiến hành thực hiện phản ứng Multiplex Real-time PCR.

2.3.2. Phát hiện các gen kháng colistin từ *mcr-1* đến *mcr-4*

Các mẫu DNA tách chiết từ phân gà, phân lợn được sử dụng để thực hiện phản ứng Multiplex Real-time PCR phát hiện các gen *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* và *mcr-4* với bộ sinh phẩm QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen, Đức) theo phương pháp do Nguyễn Nam Thắng và cộng sự đề xuất [9]. Thành phần phản ứng Multiplex Real-time PCR có thể tích 20 µL và bao gồm các thành phần: 5 µL QuantiNova Multiplex PCR Master Mix 4X; 1 µL Primer/probe mix 20X (hỗn hợp gồm 8 µM mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược, 5 µM mỗi loại probe); 12 µL H₂O và 2 µL DNA khuôn. Phản ứng Multiplex Real-time PCR được thực hiện trên hệ thống LightCycler 480 II (Roche). Chương trình nhiệt của phản ứng gồm: 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ gồm: 95°C trong 5 giây và 60°C trong 30 giây. Mỗi lần thực hiện kỹ thuật Multiplex Real-time PCR đều thực hiện đồng thời với mẫu chứng dương cho các gen *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* và mẫu chứng âm kèm theo. Kết quả xét nghiệm được phân tích trên hệ thống LightCycler 480 II bằng phần mềm LC 1.5.2 (Roche). Các mẫu xét nghiệm có số chu kỳ ngưỡng (CT) từ 35 trở xuống được coi là mẫu dương tính.

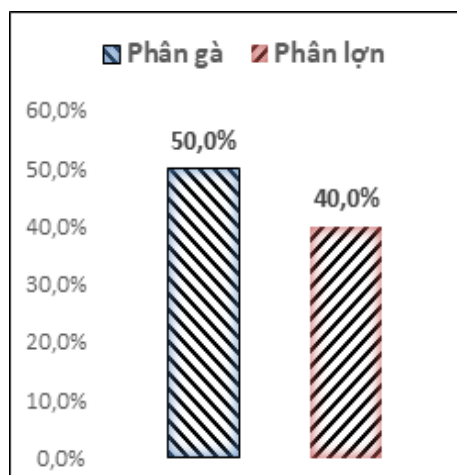
2.4. Xử lý và phân tích số liệu

Số liệu được nhập vào máy tính và quản lý bằng phần mềm Excel. Phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 22.0.

2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

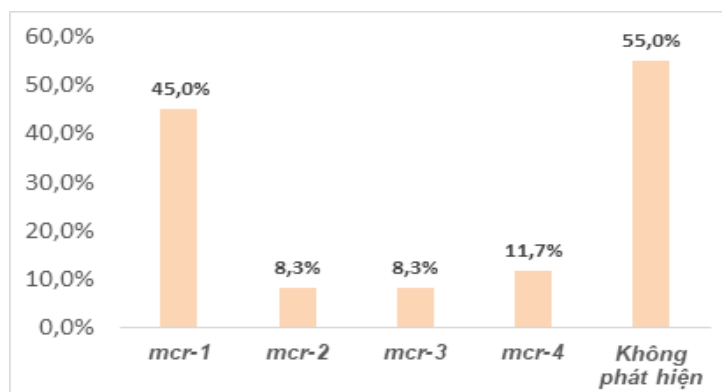
Đề tài đã được phê duyệt theo quyết định số 2320/QĐ-UBND ngày 23/09/2021 của Ủy ban nhân dân tỉnh Thái Bình.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



Biểu đồ 1. Tỷ lệ phát hiện gen kháng colistin mcr ở các mẫu phân gà, phân lợn

Trong số 60 mẫu phân gà và phân lợn được xét nghiệm bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR có 27 mẫu phát hiện gen kháng colistin mcr, chiếm 45,0%. Tỷ lệ phát hiện gen kháng colistin mcr ở mẫu phân gà là 50,0% và ở mẫu phân lợn là 40,0% (Biểu đồ 1).



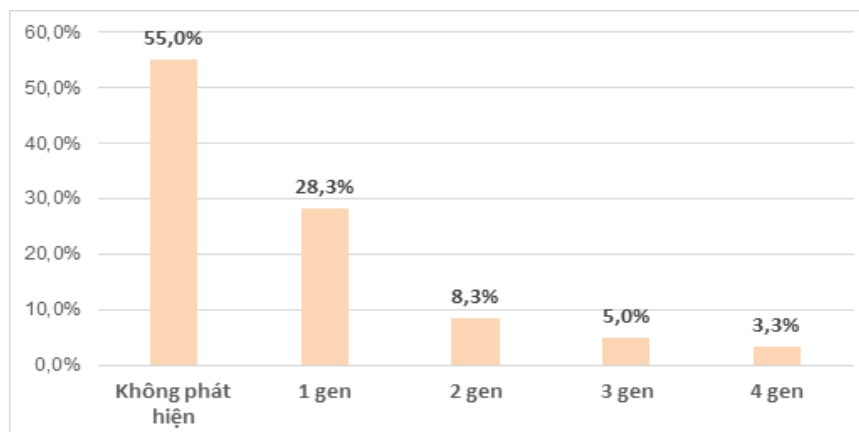
Biểu đồ 2. Tỷ lệ phát hiện các nhóm gen mcr trong mẫu phân gà, phân lợn

Trong số 60 mẫu phân được xét nghiệm thì tỷ lệ phát hiện nhóm gen mcr-1 là 45,0%, nhóm gen mcr-2 và mcr-3 đều là 8,3% và nhóm gen mcr-4 là 11,7% (Biểu đồ 2).

Bảng 1. Kết quả phát hiện gen kháng colistin mcr bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR

Loại mẫu	Phân gà	Phân lợn	Tổng
Gen phát hiện			
mcr-1	11	6	17
mcr-1 & mcr-2	0	1	1
mcr-1 & mcr-3	0	1	1
mcr-1 & mcr-4	1	2	3
mcr-1 & mcr-2 & mcr-3	0	1	1
mcr-1 & mcr-2 & mcr-4	1	0	1
mcr-1 & mcr-3 & mcr-4	1	0	1
mcr-1 & mcr-2 & mcr-3 & mcr-4	1	1	2
Không phát hiện	15	18	33
Tổng	30	30	60

Trong số 27 mẫu phân phát hiện gen kháng colistin mcr thì tất cả 27 mẫu đều mang gen mcr-1, trong đó có 17 mẫu (63,0%) chỉ phát hiện gen mcr-1 nhưng 10 mẫu còn lại (37,0%) mang gen mcr-1 kết hợp với 1, 2 hoặc 3 gen khác (bảng 1).



Biểu đồ 3. Tình trạng đa nhiễm các gen kháng colistin mcr trong mẫu phân gà, phân lợn

Kết quả trong biểu đồ 3 và bảng 1 cho thấy các mẫu phân gà, phân lợn có thể mang từ 1 đến 4 gen mcr khác nhau. Tỷ lệ mẫu phân được phát hiện mang 1 gen mcr là 28,3%, mang 2 gen là 8,3%, mang 3 gen là 5,0% và mang 4 gen là 3,3% (biểu đồ 3).

IV. BÀN LUẬN

Colistin là kháng sinh được lựa chọn cuối cùng để điều trị đối với các trường hợp nhiễm khuẩn do trực khuẩn Gram âm đa thuốc, đặc biệt là những trường hợp kháng với carbapenems [1]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy sự lan truyền các gen kháng colistin liên quan đến các ổ chứa tự nhiên là gia súc, gia cầm và thủy hải sản [3]. Tại Việt Nam, việc chăn nuôi gia súc, gia cầm rất phổ biến ở các vùng nông thôn, do đó nếu không có biện pháp sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi hợp lý thì sẽ làm xuất hiện vi khuẩn kháng kháng sinh do áp lực của chọn lọc tự nhiên. Và nếu quá trình giết mổ, vận chuyển và bảo quản thịt gia súc, gia cầm không được đảm bảo vệ sinh thì vi khuẩn kháng thuốc sẽ lan truyền cho con người. Chính vì vậy, để ngăn chặn sự lan truyền của vi khuẩn kháng colistin cần phải thực hiện các nghiên cứu nhằm theo dõi, giám sát vi khuẩn kháng colistin ở vật nuôi cũng như trong các loại thịt gia súc, gia cầm. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã áp dụng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR [9] để phát hiện các gen kháng colistin từ mcr-1 đến mcr-4 trong các mẫu phân gà và phân lợn thu thập tại Thái Bình trong giai đoạn từ tháng 10/2022 đến tháng 03/2023 nhằm đánh giá sự lưu hành của các gen kháng colistin ở vật nuôi tại Thái Bình.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ mẫu phân vật nuôi mang gen kháng colistin từ mcr-1 đến mcr-4 là 45,0% (27/60), trong đó tỷ lệ nhiễm ở gà là 50,0% (15/30) và ở lợn là 40,0% (12/30) (biểu đồ 1). Tỷ lệ

phát hiện nhóm gen mcr-1 cao nhất (45,0%), tiếp đó là nhóm gen mcr-4 (11,7%); nhóm gen mcr-2 và mcr-3 có cùng tỷ lệ là 8,3% (biểu đồ 2). Đáng lưu ý là tất cả các mẫu được phát hiện có mang gen kháng colistin thì đều có sự hiện diện của gen mcr-1, cho thấy gen mcr-1 là gen xuất hiện phổ biến nhất ở gà và lợn. Nghiên cứu của Kawahara và cộng sự [7] thực hiện tại Vũ Thư, Thái Bình năm 2018 cho thấy hầu hết (95,8%) các mẫu phân gà và phân lợn đều phân lập được vi khuẩn E. coli mang gen kháng colistin mcr-1 (94,4%) hoặc mcr-3 (1,4%). So với nghiên cứu của Kawahara, tỷ lệ mẫu phân gà, phân lợn phát hiện gen kháng colistin trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn khá nhiều (45% so với 95,8%). Trong nghiên cứu của Kawahara hầu hết gen được phát hiện là mcr-1, chỉ có 1 chủng mang gen mcr-3, trong khi trong nghiên cứu của chúng tôi, mặc dù nhóm gen mcr-1 vẫn chiếm ưu thế với 45,0% nhưng lại có sự xuất hiện thêm của các nhóm gen từ mcr-2 đến mcr-4 với tỷ lệ từ 8,3 đến 11,7% (biểu đồ 2). Kết quả này cho thấy sự lưu hành của các gen kháng colistin ở vật nuôi ở Thái Bình năm 2022 - 2023 đã có sự thay đổi, trở nên đa dạng hơn so với năm 2018.

Một số nghiên cứu đã cho thấy tình trạng mang nhiều gen kháng sẽ làm tăng tính kháng kháng sinh. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ mẫu phân xuất hiện 2, 3 hoặc 4 gen kháng colistin chiếm tới 16,6% (10/60 - bảng 1 và biểu đồ 3). Sự xuất hiện đồng thời nhiều gen kháng colistin ở vật nuôi sẽ làm tăng

nguy cơ xuất hiện các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc, trở thành hiểm họa cho cộng đồng. Việc thực hiện các biện pháp can thiệp như: hạn chế sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi, vệ sinh môi trường chăn nuôi, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm trong quá trình giết mổ và kinh doanh thịt gà, thịt lợn... là những biện pháp cần thiết để ngăn chặn sự lây lan của vi khuẩn kháng colistin từ vật nuôi sang con người.

V. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy tình trạng mẫu phân gà, phân lợn thu thập tại Thái Bình nhiễm vi khuẩn mang gen kháng colistin từ *mcr-1* đến *mcr-4* là rất phổ biến với tỷ lệ phát hiện là 45,0% và rất đa dạng về kiểu gen kháng colistin. Do đó, cần thực hiện các biện pháp can thiệp phù hợp nhằm ngăn chặn sự lây lan của vi khuẩn kháng colistin từ vật nuôi sang con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kasiakou SK, Michalopoulos A, Soteriades ES, et al.** Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3136-3146.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al.** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-168.
- Shen Y, Zhang R, Schwarz S, et al.** Farm animals and aquaculture: significant reservoirs of mobile colistin resistance genes. *Environ Microbiol.* 2020;22(7):2469-2484.
- Nakayama T, Jinnai M, Kawahara R, et al.** Frequent use of colistin-based drug treatment to eliminate extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in backyard chicken farms in Thai Binh Province, Vietnam. *Trop Anim Health Prod.* 2017;49(1):31-37.
- Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, et al.** Use of Colistin and Other Critical Antimicrobials on Pig and Chicken Farms in Southern Vietnam and Its Association with Resistance in Commensal *Escherichia coli* Bacteria. *Applied and environmental microbiology.* 2016;82(13):3727–3735.
- Yamamoto Y, Kawahara R, Fujiya Y, et al.** Wide dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* with the mobile resistance gene *mcr* in healthy residents in Vietnam. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2019;74(2):523–524.
- Kawahara R, Fujiya Y, Yamaguchi T, et al.** Most Domestic Livestock Possess Colistin-Resistant Commensal *Escherichia coli* Harboring *mcr* in a Rural Community in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(6):e00594-19.
- Osei Sekyere J.** Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *Microbiologyopen.* 2019;8(4):e00682.