

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN XUÂN BÁCH

Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử gen kháng Cephalosporin của vi khuẩn E. coli sản sinh men Beta-lactamase phân lập từ người chăn nuôi và lợn tại Thái Bình và Sóc Sơn

2016

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành đến **TS. Đặng Thị Thanh Sơn** đã tận tình, hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong suốt quá trình hoàn thành khóa luận này.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam, toàn thể cán bộ Phòng Công nghệ tế bào động vật, Trung tâm giám định ADN, Phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi trong cả quá trình học tập, thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ Bộ môn Vệ sinh Thú y- Viện Thú y đã cung cấp mẫu cho nghiên cứu. Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo, các cán bộ của cơ sở đào tạo sau Đại học Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đã tận tâm truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt khóa học.

Luận văn này là một phần kết quả của đề tài có mã số 106-YS thuộc Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED). Tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài.

Cuối cùng tôi xin chân thành cảm ơn sự động viên khích lệ của gia đình, bạn bè và các đồng nghiệp trong suốt thời gian thực hiện khóa luận này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2016
Học viên

Trần Xuân Bách

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa được sử dụng công bố trong bất kỳ tài liệu nào.

Tôi xin cam đoan mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận văn này đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày tháng năm 2016

Học viên

Trần Xuân Bách

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. Vi khuẩn <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	4
1.1.1. Sức đề kháng của vi khuẩn <i>E. coli</i>	6
1.1.2. Đặc tính gây bệnh của vi khuẩn <i>E. coli</i>	6
1.1.3. Đặc điểm di truyền của vi khuẩn <i>E. coli</i>	7
1.2. Hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn <i>E. coli</i>	7
1.2.1. Hiểu biết về thuốc kháng sinh	7
1.2.2. Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn	12
1.2.3. Enzyme beta-lactamase.....	16
1.3. Một số nghiên về tính kháng thuốc của vi khuẩn trong và ngoài nước.....	20
1.3.1. Một số nghiên cứu trên thế giới.....	20
1.3.2. Một số nghiên cứu trong nước.....	22
CHƯƠNG II: NỘI DUNG, VẬT LIỆU, VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1. Nội dung nghiên cứu.....	24
2.2. Vật liệu nghiên cứu	24
2.1.2. Hóa chất sử dụng	25
2.1.3. Thiết bị sử dụng	25
2.1.4. Phần mềm tin sinh học.....	26
2.2. Phương pháp nghiên cứu	27
2.2.1. Tách chiết ADN tổng số của vi khuẩn <i>E. coli</i>	27
2.2.2. Nhân đoạn gen kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> bằng phản ứng PCR	28
2.2.3. Phương pháp điện di kiểm tra kết quả	33
2.2.4. Phương pháp giải trình tự theo phương pháp F. Sanger.....	33
2.2.5. Phương pháp phân tích trình tự nucleotide.....	34
CHƯƠNG III – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	36

3.1. Kết quả phát hiện gen kháng kháng sinh nhóm cephalosporin của các chủng <i>E. coli</i> kháng cefotaxime phân lập từ Thái Bình và Sóc Sơn	36
3.2. Đặc điểm sinh học phân tử của một số gen kháng kháng sinh	40
3.2.1. Giải trình tự các gen kháng kháng sinh thu được	40
3.2.2. Đặc điểm sinh học phân tử gen CTX -M.....	43
3.2.3. Đặc điểm sinh học phân tử gen TEM	49
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	54

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended Spectrum beta-lactamase
ADN	Deoxyribonucleic acid
ARNt	ARN de transport
NST	Nhiễm sắc thể
PCR	Polymerase Chain Reaction
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
UV	Ultraviolet
Bla	Beta-lactamase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDS	Coding DNA sequence
cs	Cộng sự

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Một số kháng sinh thuộc nhóm Cephalosporin	12
Bảng 2.1. Số lượng chủng <i>E. coli</i> nghiên cứu.....	24
Bảng 2.2. Các thiết bị sử dụng cho nghiên cứu	26
Bảng 2.3. Phần mềm sử dụng.....	27
Bảng 2.4. Các cặp gen môi để phát hiện các gen kháng kháng sinh TEM, SHV and CTX-M (Hasman <i>et al.</i> 2005)	32
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt phản ứng PCR	32
Bảng 3.1. Tỷ lệ phát hiện gen CTX-M và gen TEM ở các chủng <i>E. coli</i> kháng cefotaxime.....	37
Bảng 3.2. Nguồn gốc các chủng <i>E. coli</i> được giải trình tự gen kháng kháng sinh	41
Bảng 3.3. Bảng kí hiệu gen CTX-M	43
Bảng 3.4. Vị trí đột biến nucleotit gen CTX-M.....	44
Bảng 3.5. Vị trí đột biến axit amin.....	46
Bảng 3.6. Nhóm các gen có trình tự nucleotit giống nhau	48
Bảng 3.7. Bảng kí hiệu gen TEM.....	49

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình mô tả vi khuẩn <i>E. coli</i>	5
Hình 1.2. Cấu trúc của vòng beta-lactam.....	10
Hình 1.3. Cấu trúc chung của cephalosporin	11
Hình 1.4. Sự lan truyền gen kháng thuốc bằng hình thức thông qua các R-plasmid (ảnh nguồn internet)	15
Hình 1.5. Đề kháng thu được do nhận được gen nằm trên Integron.....	16
Hình 1.6. Vị trí tác động của enzyme beta-lactamase	20
Hình 2.1. Vi khuẩn <i>E. coli</i> trên môi trường thạch.....	25
Hình 2.2. Sơ đồ nguyên lý phản ứng PCR.....	29
Hình 2.3. Các bước của một chu kì PCR	31
Hình 2.4. Nguyên lý giải trình tự ADN theo phương pháp Sanger	33
Hình 2.5. Kiểm tra chất lượng tín hiệu dựa trên dữ liệu trình tự	34
Hình 2.6. Kiểm tra chất lượng giải mã trình tự bằng phương pháp phổ thông.....	35
Hình 3.1. Kết quả phát hiện gen TEM của một số chủng <i>E. coli</i> bằng phản ứng PCR.....	36
Hình 3.2. Kết quả phát hiện gen CTX-M của một số chủng <i>E. coli</i> bằng phản ứng PCR	36
Hình 3.3. Tỷ lệ chủng <i>E. coli</i> ở người mang gen kháng kháng sinh	38
Hình 3.4. Tỷ lệ chủng <i>E. coli</i> ở lợn mang gen kháng kháng sinh.....	38
Hình 3.5. Kết quả phát hiện gen SHV của một số chủng <i>E. coli</i> bằng phản ứng PCR	40
Hình 3.6. Hình ảnh quá trình xử lý trình tự nucleotit của gen CTX-M.....	42
Hình 3.7. So sánh mức độ tương đồng của các gen CTX-M với các gen trên ngân hàng gen thế giới	42
Hình 3.8. So sánh trình tự nucleotit gen CTX-M.....	44
Hình 3.9. So sánh trình tự nucleotit gen TEM	50

MỞ ĐẦU

Việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi chưa được quản lý chặt chẽ (về liều lượng kháng sinh, cách pha trộn, và dùng kháng sinh theo thói quen) sẽ dẫn đến hiện tượng tồn dư kháng sinh trong thực phẩm và các sản phẩm từ chăn nuôi gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người [52]. Nguy hiểm hơn cả là tạo ra các chủng vi khuẩn có khả năng kháng kháng sinh. Vấn đề vi khuẩn kháng thuốc trong những năm gần đây trở thành vấn đề toàn cầu khi ngành chăn nuôi, và đặc biệt là khi chăn nuôi lợn đang phát triển mạnh mẽ. Với đặc điểm thời tiết nóng ẩm mưa nhiều ở nước ta, dịch bệnh ở đàn lợn nuôi thường xuyên xảy ra. Một trong những biện pháp chính để phòng trị bệnh xảy ra trong chăn nuôi lợn là sử dụng thuốc kháng sinh, không chỉ riêng ở Việt Nam mà ở nhiều nước trên thế giới [26]

Vi khuẩn kháng kháng sinh luôn là vấn đề quan tâm của các nước trên thế giới, đặc biệt là các nước đang phát triển. Theo Son và cs (2011), vi khuẩn kháng lại kháng sinh đang tiếp tục gây nên những tổn thất nặng nề về kinh tế trong chăn nuôi và gây nguy hiểm đến tính mạng của người bệnh và vật nuôi [48]. Vi khuẩn và gen kháng thuốc của vi khuẩn có thể nhanh chóng lan truyền ra môi trường, kể cả trong bệnh viện, cộng đồng và trong chăn nuôi. Trong khi tốc độ đề kháng kháng sinh ngày càng gia tăng thì việc nghiên cứu tìm ra các loại kháng sinh mới để điều trị thì gặp khó khăn. Như vậy trong cuộc chạy đua dành ưu thế thì vi khuẩn đang vươn lên dẫn trước. Khoảng cách giữa khả năng vi khuẩn biến đổi để trở thành chủng kháng kháng sinh và khả năng con người kiểm soát được vi khuẩn đang được nới rộng. Vì vậy, nếu chúng ta không có biện pháp làm giảm tốc độ kháng thuốc kịp thời thì sẽ dẫn đến hậu quả không có thuốc kháng sinh để điều trị.

Kháng sinh nhóm beta-lactam được biết đến sớm nhất trong lịch sử kháng sinh và có vai trò đặc biệt trong điều trị nhiễm khuẩn. Hiện nay nhóm beta-lactam có số lượng kháng sinh lớn nhất, chiếm ba phần tư tổng số lượng

kháng sinh đang lưu hành. Trong những năm gần đây, các kháng sinh Cephalosporin được sử dụng rộng rãi trong điều trị lâm sàng nói chung và trong điều trị thú y nói riêng. Do được sử dụng rộng rãi nên tỷ lệ vi khuẩn đề kháng các kháng sinh này là rất cao, nhất là ở các vi khuẩn Gram âm. Hiện nay đã xuất hiện nhiều chủng vi khuẩn Gram âm sinh men beta-lactamase và beta-lactamase phổ rộng (ESBL: Extended Spectrum beta-lactamase) đề kháng các kháng sinh nhóm beta-lactam, bao gồm các kháng sinh phổ rộng như Cephalosporin. Sinh ESBL vẫn là nguyên nhân chủ yếu gây gia tăng đề kháng kháng sinh nhóm beta-lactam ở những vi khuẩn Gram âm như: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* đặc biệt là *Escherichia coli*. Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu phát hiện sự tương đồng kiểu hình và kiểu gen của các chủng *E. coli* sản sinh enzyme beta-lactamase được phân lập từ bệnh phẩm bệnh nhân, sản phẩm chăn nuôi, và môi trường.

Vi khuẩn *E. coli* dễ dàng được phát hiện trong chất thải chăn nuôi (Son *et al.*, 2011) [47]. Đây là vi khuẩn chính gây bệnh đường tiêu hóa ở lợn và người. Việc quản lý chất thải trong ngành chăn nuôi chưa được thực hiện một cách triệt để nên một lượng lớn chất thải lợn được xả thẳng ra môi trường. Đặc biệt đối với các hộ chăn nuôi nhỏ lẻ thì việc sử dụng đồ bảo hộ, các công cụ hỗ trợ việc ngăn chặn vi khuẩn từ vật nuôi sang người trực tiếp chăn nuôi gần như chưa có. Đây là nguy cơ làm cho các vi khuẩn, trong đó có các vi khuẩn kháng kháng sinh có trong chất thải chăn nuôi lây nhiễm sang người. Đây phải chăng là những nguyên nhân cơ bản làm tăng khả năng kháng kháng sinh của *E. coli* ở đàn lợn và làm lây nhiễm *E. coli* kháng thuốc cho người chăn nuôi lợn (do thường xuyên tiếp xúc với chất thải chăn nuôi).

Để làm sáng tỏ hiện tượng lây truyền gen kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli* từ vật nuôi sang người, tôi thực hiện đề tài khoa học "***Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử gen kháng Cephalosporin của vi khuẩn E. coli sản***