

# Khảo sát sự chuyển gen đề kháng carbapenem từ *Klebsiella pneumoniae* sang *Escherichia coli* J53 bằng con đường tiếp hợp *in vitro*

• **Trần Nhật Phương**

• **Trần Linh Thuớc**

Trường Đại Học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

• **Phạm Hùng Vân**

Trường Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

( Bài nhận ngày 28 tháng 09 năm 2015, nhận đăng ngày 28 tháng 03 năm 2016)

## TÓM TẮT

*Klebsiella pneumoniae* là vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện và là tác nhân mang nhiều gen đề kháng kháng sinh kể cả kháng sinh có phổ rộng nhất hiện nay là carbapenem. Chúng này có khả năng lan truyền các gen đề kháng kháng sinh sang cho *E. coli* và các vi khuẩn đường ruột cùng hay khác loài. Trong nghiên cứu này, khả năng chuyển gen đề kháng kháng sinh của các chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu bệnh phẩm được thực khảo sát bằng phương pháp tiếp hợp trong phòng thí nghiệm, các gen đã tiếp hợp được xác nhận kỹ bằng thuật sinh

**Từ khóa:** *K. pneumoniae*, *E. coli* J53, tiếp hợp, đề kháng carbapenem,  $\beta$ -lactamase

học phân tử (Multiplex PCR và Multiplex Real-time PCR). Kết quả cho thấy các gen mã hóa cho các enzyme đề kháng kháng sinh phổ rộng ESBL hay AmpC  $\beta$ -lactamase và carbapenemase KPC/NDM-1 có khả năng được chuyển sang cho vi khuẩn *E. coli* J53 làm cho vi khuẩn này có kiểu hình và kiểu gen đề kháng với nhiều loại kháng sinh khác nhau. Đây là một vấn đề cần quan tâm tại Việt Nam vì *E. coli* kháng thuốc có thể hiện diện trong đường ruột và là nguồn lây nhiễm dễ dàng trong bệnh viện cũng như ngoài cộng đồng.

## MỞ ĐẦU

*Klebsiella pneumoniae* là nhóm vi khuẩn đứng thứ hai sau *E. coli* trong nhiễm trùng bệnh viện tại Việt Nam cũng như trên thế giới. Sự đề kháng với nhiều loại kháng sinh của chủng này thường do sự hiện diện của plasmid mang gen mã hóa cho enzyme KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) hay NDM-1 (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase 1) đề kháng với các cephalosporin, monobactam và carbapenem [4].

Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng sự lan truyền các gen đề kháng này chủ yếu thông qua plasmid và transposon [8]. Gen KPC được mang bởi transposon Tn4401a trên plasmid IncFII có kích thước 130 kb, trong khi đó, transposon Tn4401b lại mang các plasmid IncN (40 kb), IncL/M (50 - 60 kb) và hai

plasmid chưa rõ có kích thước 20 và 50 kb. Trong số các plasmid mang transposon Tn4401, chỉ các plasmid IncFII là lan truyền được theo cơ chế tiếp hợp [5]. Trong khi đó, gen mã hóa cho NDM-1 hiện diện trên intergron nhóm I mang các gen kháng kháng sinh *arr-2* (kháng rifampicin), *ereC* (erythromycin), *aadA1* (gentamicin), *cmlA7* (chloramphenicol) và *qacEA* (sulphomamide) và có khả năng lan truyền sang cho các vi khuẩn khác [13]. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm khảo sát sự lan truyền gen mã hóa cho các enzyme ESBL, AmpC  $\beta$ -lactamase và carbapenemase từ các chủng *K. pneumoniae* đề kháng carbapenem phân lập trên các bệnh phẩm tại Việt Nam sang cho vi khuẩn *E. coli* J53 trong phòng thí nghiệm.

## VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi khuẩn

Ba chủng *K. pneumoniae* mang gen đề kháng kháng sinh carbapenem *blaKPC* hay *blaNDM-1* phân lập từ các mẫu bệnh phẩm tại Bệnh viện Nguyễn Tri Phương TP. Hồ Chí Minh được sử dụng làm chủng cho nguồn gen. Chủng *E. coli* J53 là chủng *E. coli* K-12 đã được tạo đột biến nhiều lần để tạo thành chủng có *F met pro*, mang gen kháng sodium azide  $Az^r$  [2] được sử dụng để làm chủng nhận các gen đề kháng carbapenem từ các chủng *K. pneumoniae* đã phân lập. Tất cả các chủng đều được nuôi cấy trong môi trường Luria-Bertani (LB) ở 37 °C trong 24 giờ để khảo sát sự lan truyền các gen đề kháng.

### Khảo sát sự lan truyền các gen đề kháng kháng sinh trong phòng thí nghiệm

Khuẩn lạc thuần của các chủng *K. pneumoniae* và *E. coli* J53 được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB lỏng. 1 mL dịch nuôi cấy của mỗi chủng *K. pneumoniae* ( $10^3$  cfu/mL) và 1mL ( $10^3$  cfu/ml) chủng nhận *E. coli* J53 (tỷ lệ 1:1) được cấy chuyển vào 18 mL môi trường LB lỏng, lắc đều và giữ yên trong suốt quá trình nuôi cấy tiếp hợp. 50  $\mu$ L mỗi dịch nuôi cấy tiếp hợp được cấy lên đĩa thạch môi trường chọn lọc LB có bổ sung NaZ ở nồng độ 100  $\mu$ g/mL và ertapenem ở nồng độ 4  $\mu$ g/mL và ủ ở 37 °C trong 24 giờ [12]. Các chủng sau tiếp hợp được định danh bằng bộ kit định danh IDS 14 (Nam Khoa) và được

xác định kiểu gen đề kháng bằng phương pháp sinh học phân tử.

### Xác định độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng tham gia trong quá trình tiếp hợp

Kháng sinh đồ được thực hiện trên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA) và được ủ ở 37 °C trong 16 - 18 giờ. Đường kính vòng ức chế vi khuẩn tạo ra bởi đĩa kháng sinh được đo và biện luận theo tiêu chuẩn của CLSI. Các đĩa kháng sinh imipenem 10  $\mu$ g, meropenem 10  $\mu$ g, ertapenem 10  $\mu$ g, colistin 10  $\mu$ g, doxycycline 30  $\mu$ g, rifampin 5  $\mu$ g, ciprofloxacin 5  $\mu$ g, ampicilline 10  $\mu$ g, amoxicilline/clavulanic acid 20/10  $\mu$ g, ceftriaxon 30  $\mu$ g, cefotaxime 30  $\mu$ g, ceftazidime 30  $\mu$ g, amikacin 30  $\mu$ g và cefoxitin 30  $\mu$ g (Bio-Rad, Nam Khoa) được dùng trong nghiên cứu này. Các chủng đồng thời được kiểm tra MIC với ertapenem, imipenem, và meropenem.

### Xác nhận kiểu gen gây nên hiện tượng đề kháng

Kỹ thuật Multiplex PCR được sử dụng để phát hiện các gen mã hóa cho các enzyme đề kháng kháng sinh phổ rộng, phổ mở rộng ESBL, các gen mã hóa cho  $\beta$ -lactamase nhóm C AmpC  $\beta$ -lactamase. Các gen mã hóa cho enzyme carbapenemase KPC và NDM-1 được phát hiện bằng kỹ thuật multiplex Real-time PCR khuyến cáo bởi CDC. Các môi được sử dụng trong nghiên cứu được thực hiện theo các phương pháp đã được khuyến cáo [10, 14]. Trình tự mỗi sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Trình tự nucleotide của các mồi sử dụng trong phát hiện các gene đề kháng kháng sinh

Số TT	Tên mồi	Trình tự mồi 5' – 3'	Kích thước PCR (bp)	Gen đích	TLTK
1	MOXM-F	GCTGCTCAAGAAGCACAGGAT	520	MOX-1 - 2, CMY-1 - 8	[14]
	MOXM-R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC			
2	CITM-F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	LAT-1 - 4, CMY-2 - 7, BIL-1	[14]
	CITM-R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
3	DHAM-F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	DHA-1, DHA-2	[14]
	DHAM-R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC			
4	ACCM-F	ACCAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	ACC-1	[14]
	ACCM-R	TTGGCCGCAATCATCCCTAGC			
5	EBCM-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	MIR-1, ACT-1	[14]
	EBCM-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT			
6	FOXM-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	FOX-1 đến FOX-5b	[14]
	FOXM-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG			
7	TEM-410F	GGTCGCCGCATACACTATTCTCAGC	372	TEM	nghiên cứu này
	TEM-781R	TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTAC			
8	SHV-287F	CCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCT	231	SHV	nghiên cứu này
	SHV-517R	CCGGAAGCGCCTCATTCA			
9	CTXM1-115F	GAATTAGAGCGGGCAGTCGGA	588	CTX-M-1 group	nghiên cứu này
	CTXM1-702R	CACAACCCAGGAAGCAGGCAGTCCG			
10	CTXM2-39F	GATGGCGACGCTACCCCTGCTATTC	107	CTX-M-2 group	nghiên cứu này
	CTXM2-145R	CAAGCCGACCTCCGAACCTTTCTT			
11	CTXM9-16F	GTGCAACGGATGATGTTGCGGGC	475	CTX-M-9 group	nghiên cứu này
	CTXM9-490R	GAAACGTCTCATCGCCGATCGCCG			
12	CTXM8g25g-533F	GCGACCCGCGGATACCACCACCG	186	CTX-M-8 group	nghiên cứu này
	CTXM8g25g-718R	TGCCGGTTTTATCCCCGACAACCAC			
13	KPC-TQF	GGCCGCCGTGCAATAC	61	KPC	[10,15]
	KPC-TQR	GCCGCCAACTCCTCA			
14	KPC-TQpr	FAM-TGATAACGCCGCCCAATTTGT-BHQ1			
15	NDM1-TQF	GACCGCCAGATCCTCAA	52	NDM-1	[10,15]
	NDM1-TQR	CGCGACCGGCAGGTT			
16	NDM1-TQpr	HEX/JOE/VIC-TGGATCAAGCAGGAGAT-BHQ1			

Phản ứng multiplex PCR được thực hiện trên thể tích 50 µl bao gồm 25 µl multiplex PCR master mix 2X (Nam Khoa), 1 µl mỗi mồi xuôi, ngược của MOXM/CITM/DHAM nồng độ 10pm/ µl; 1 µl mỗi

mồi ACCM/EBCM nồng độ 7,5 pm/ µl; 1 µl mỗi mồi FOXM nồng độ 5 pm/ µl, thêm 12 µl nước tinh sạch và 1 µl DNA vi khuẩn đã tách chiết. Chu kỳ nhiệt bao gồm 95 °C trong 15 phút để kích hoạt hotstart tag

polymerase, 40 chu kỳ ba giai đoạn 94 °C trong 15 giây, 64 °C trong 30 giây và 72 °C trong 1 phút; cuối cùng là một chu kỳ 72 °C trong 5 phút [10, 14]. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose.

Phản ứng multiplex Realtime PCR được thực hiện trong thể tích 50 µl bao gồm 40 µl multiplex realtime PCR master mix 1.25X (Nam Khoa), 1 µl mỗi có nồng độ 10pm/ µl cho mỗi KPC/NDM-1, thêm 0,5 µl các tagman probe có nồng độ 10 pm/ µl; thêm 4 µl nước tinh sạch và 1 µl DNA vi khuẩn đã tách chiết. Chu kỳ nhiệt bao gồm 95 °C trong 15 phút để kích hoạt hotstart tag polymerase, 40 chu kỳ hai giai đoạn 94 °C trong 15 giây, 60 °C trong 30 giây, tín hiệu huỳnh quang được thu nhận tại giai đoạn này [10,15].

## KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

### Độ nhạy kháng sinh của các chủng nghiên cứu

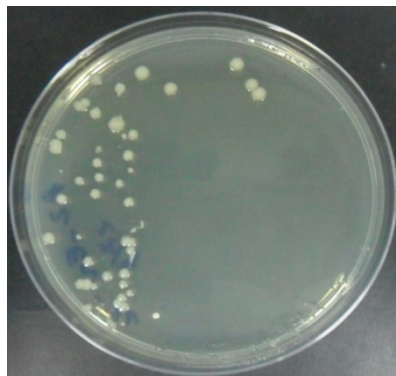
Hai chủng *K. pneumoniae* KP06 và KP18 mang gen mã hóa cho carbapenemase KPC, đề kháng với toàn bộ các kháng sinh  $\beta$ -lactam (ampicilline, các cephalosporin và carbapenem), nhạy cảm với kháng sinh tetracycline. Chủng KP06 đề kháng với aminoglycoside (amikacin), chủng KP18 đề kháng với kháng sinh polypeptide là colistin. Trong khi đó, chủng KP16 mang gen mã hóa cho carbapenemase

NDM-1 đã đề kháng toàn bộ kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu ngoại trừ kháng sinh colistin. Kết quả MIC cho thấy các chủng đề kháng với kháng sinh với nồng độ từ 4 đến 32 µg/ml.

### Sự chuyển gen đề kháng kháng sinh

Khả năng chuyển gen đề kháng kháng sinh của ba chủng nghiên cứu sang cho vi khuẩn nhận là *E. coli* J53 được thực hiện trong phòng thí nghiệm trong môi trường LB. Các chủng tiếp hợp được cấy trên đĩa môi trường chọn lọc có chứa NaZ và ertapenem và cho mã định danh là 61013, kết quả định danh là *E. coli*.

Chủng *E. coli* J53 tiếp hợp với các chủng *K. pneumoniae* KP06, KP16 và KP18 được ký hiệu lần lượt là Eco06, Eco16 và Eco18. Các chủng này mọc và tạo khuẩn lạc trên đĩa môi trường chọn lọc có chứa NaZ và ertapenem, chúng tỏ có mang gen đề kháng NaZ và gen đề kháng carbapenem từ các chủng cho hay nói cách khác, các chủng đã tiếp hợp thành công và *E. coli* J53 đã nhận được gen đề kháng kháng sinh từ chủng cho là các chủng *K. pneumoniae* đề kháng carbapenem. Kết quả đại diện chủng Eco16 mọc trên đĩa thạch chứa NaZ và ertapenem 4 µg/ml được trình bày trên Hình 1.



**Hình 1.** Khuẩn lạc của chủng *E coli* Eco16 sau tiếp hợp trên môi trường chọn lọc có chứa NaZ và ertapenem

**Bảng 1.** Độ nhạy kháng sinh và kết quả biện luận theo CLSI<sup>[1]</sup> của các chủng cho và các chủng đã tiếp hợp IM: imipenem, ME: meropenem, EN: ertapenem, CO: colistin, DX: doxycycline, RF: Rifamicine, CI: ciprofloxacin, AM: Ampicillin, AC: Ampicilline/ Clavulanic acid, CX: ceftriaxone, CT; cefotaxim, CZ: ceftazidim, AK: amikacin, CN: ceftoxitin, R: Kháng, S: Nhạy cảm, I: kháng mức trung gian

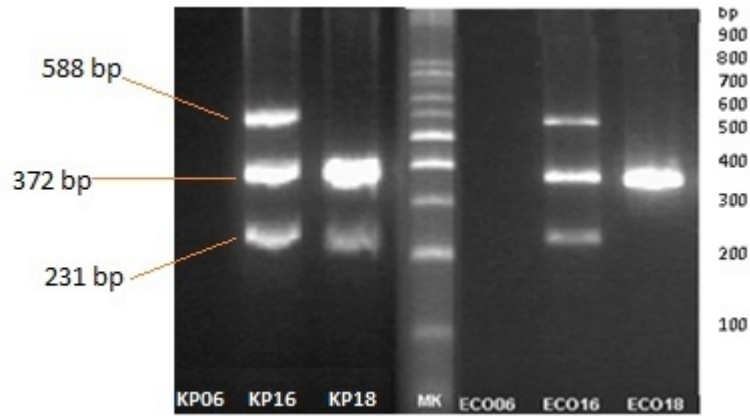
Chủng	Vòng khuếch tán kháng sinh (mm)/ biện luận theo CLSI													
	IM	ME	EN	CO	DX	RF	CI	AM	AC	CT	CZ	AK	CN	CX
KP06	16	15	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>21</b>	0	<b>17</b>	0	0	10	15	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>14</b>
	R	R	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	R	<b>I</b>	R	R	R	R	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
Eco06	20	22	<b>22</b>	<b>15</b>	<b>24</b>	0	<b>26</b>	0	10	17	20	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>20</b>
	I	I	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	R	<b>S</b>	R	R	R	R	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
KP16	14	12	12	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12</b>
	R	R	R	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
Eco16	22	21	15	<b>20</b>	<b>17</b>	<b>&gt;28</b>	<b>16</b>	<b>&gt;28</b>	<b>&gt;28</b>	<b>16</b>	<b>&gt;25</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>&gt;28</b>
	I	I	R	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
KP18	16	13	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	12	16	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>12</b>
	R	R	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	R	R	R	R	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
Eco18	22	20	<b>22</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>17</b>	<b>39</b>	16	9	22	22	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>23</b>
	I	I	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	I	R	I	R	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
EcoJ53	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>

Độ nhạy kháng sinh của các chủng cho và chủng nhận gen đề kháng kháng sinh được trình bày trong Bảng 1. Kết quả kháng sinh đồ từ Bảng 1 cho thấy, hai chủng đã tiếp hợp Eco06 và Eco18 có kiểu hình đề kháng gần như tương đồng với các chủng cho là KP06 và KP18, hai chủng này đề kháng với các kháng sinh thuộc họ  $\beta$ -lactam như ampicillin, Ampicillin/ clavulanic acid, các cephalosporin và có kiểu hình đề kháng trung gian với carbapenem nhưng nhạy cảm với các nhóm kháng sinh khác như colistin (polypeptide), doxycycline (tetracycline), amikacin (aminoglycoside) hay ciprofloxacin (quinolone). Trong khi đó, chủng Eco16 chỉ đề kháng ở mức độ trung gian với carbapenem nhưng hoàn toàn nhạy cảm với các loại kháng sinh  $\beta$ -lactam khác, kết quả này cho thấy cần thiết phải xác định các kiểu gen đề

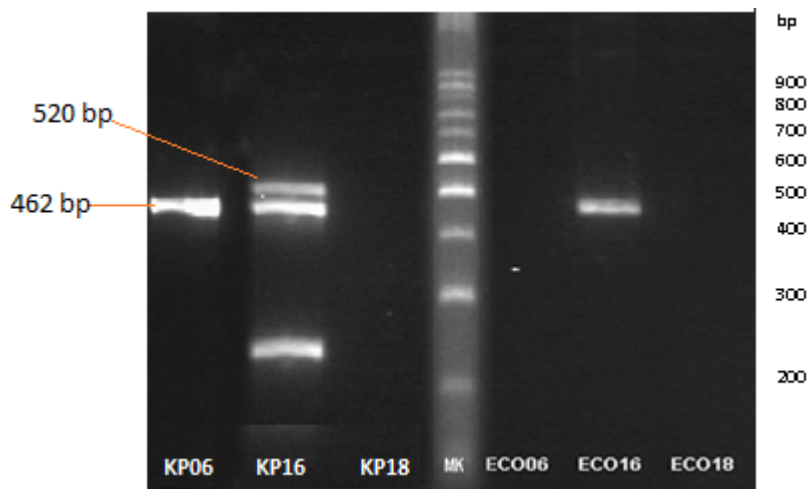
kháng có thể thu nhận được trong quá trình tiếp hợp giữa các chủng.

#### **Kết quả xác định kiểu gen đề kháng các chủng đã tiếp hợp**

Kết quả xác nhận sự hiện diện của gen trên các chủng đã được chuyển gen cho thấy chủng Eco06 có mang kiểu gen tương tự chủng KP06, không phát hiện gen ESBL hay AmpC; Chủng Eco18 chỉ nhận được một gen ESBL là TEM từ chủng KP18; Chủng Eco16 lại nhận được các gen ESBL là SHV (231 bp), TEM (372 bp), CTX-M1 (588 bp) cùng với gen AmpC là CMY (462 bp) từ chủng KP16. Kết quả xác định kiểu gen đề kháng của các chủng đã tiếp hợp được thể hiện trên Hình 2 và Hình 3.



**Hình 2.** Kết quả Multiplex PCR phát hiện các gen ESBL sau tiếp hợp. Chủng cho KP06 & chủng nhận Eco06 không mang gen ESBL; Chủng Eco16 đã nhận được các gen SHV (231 bp), TEM (372 bp), CTX-M1 (588 bp) từ chủng cho KP16 và chủng Eco18 chỉ nhận được một gen ESBL là TEM (372 bp) từ chủng KP18 (18KLP)



**Hình 3.** Kết quả Multiplex PCR phát hiện các gen AmpC sau tiếp hợp. Chỉ có chủng nhận Eco16 đã nhận được các gen AmpC  $\beta$ -lactamase là CMY-2 có kích thước (462 bp) từ chủng cho là KP16; chủng Eco06 và Eco18 không nhận được một gen AmpC  $\beta$ -lactamase nào từ các chủng cho KP06 và KP18

Để xác nhận gen đề kháng carbapenem của các chủng đã tiếp hợp, kỹ thuật Real-time PCR theo đề nghị của CDC được thực hiện, kết quả thấy hai chủng KP06 và KP18 có mang gen đề kháng carbapenem KPC và chủng KP16 mang gen NMD-1. Kết quả tổng

hợp các gen đề kháng kháng sinh nhận được từ các chủng cho sau quá trình tiếp hợp được trình bày trong Bảng 2.

**Bảng 2.** Các gen đề kháng kháng sinh ở các chủng cho và chủng nhận sau tiếp hợp. Chủng cho là các chủng *K. pneumoniae* đề kháng carbapenem ký hiệu là KP và chủng nhận là chủng *E. coli* J53 sau tiếp hợp ký hiệu là Eco

Chủng	Gen đề kháng $\beta$ -lactamase				
	SHV	TEM	CTX-M-1	KPC/NMD-1	AmpC
KP06	-	-	-	KPC	<b>ACT-1</b>
Eco06	-	-	-	KPC	-
KP16	+	+	+	NDM-1	<b>DHA, CMY</b>
Eco16	+	+	+	NDM-1	<b>CMY</b>
KP18	+	+	-	KPC	-
Eco18	-	+	-	KPC	-

Kết quả tiếp hợp và phân tích sự lan truyền gen cho thấy chủng Eco06 chỉ nhận được gen mã hóa cho carbapenemase KPC và có kiểu hình đề kháng trung gian với imipenem (với MIC là 2  $\mu$ g/ml) và meropenem (0,5  $\mu$ g/ml) nhưng đề kháng với hầu hết các kháng sinh  $\beta$ -lactam mà không đề kháng với các kháng sinh thuộc họ Quinolone hay Aminoglycoside như chủng cho KP06. Như vậy, gen mã hóa cho KPC ở chủng này không đồng thời chứa các gen mã hóa cho gen đề kháng hai kháng sinh này. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây trên thế giới là một khi vi khuẩn sở hữu gen đề kháng carbapenem là KPC thì sẽ đề kháng hầu hết các kháng sinh  $\beta$ -lactam khác, kể cả các cephalosporin thế hệ III mà không đề kháng các kháng sinh không phải  $\beta$ -lactam. Trong khi đó, chủng cho KP06 có MIC cao hơn so với chủng Eco06 (lần lượt là 8 và 4  $\mu$ g/ml). Điều này có thể do Chủng KP06 có mang gen AmpC  $\beta$ -lactamase ACT-1 góp phần trong việc gia tăng MIC đối với carbapenem so với chủng nhận [6].

Tương tự, cũng nhận gen KPC và có kiểu hình đề kháng trung gian với imipenem và ertapenem, nhưng chủng Eco18 nhận được thêm gen ESBL là TEM và đề kháng với hai kháng sinh cephalosporin thế hệ III là cefotaxime và ceftazidime, đề kháng luôn cả kháng sinh phối hợp là Amoxiline/ clavulanic acid. TEM  $\beta$ -lactamase là một enzyme được nghiên cứu nhiều nhất trong số các ESBL [9], enzyme này đề kháng với các

penicilline và các cephalosporin thế hệ I, II nhưng có xu hướng phát triển phổ đề kháng khi các kháng sinh mới được sử dụng [7].

Như vậy có thể thấy hai chủng Eco06 và Eco18 sở hữu gen mã hóa cho carbapenemase là KPC chính là nhân tố gây góp phần gây nên hiện tượng đề kháng với các kháng sinh  $\beta$ -lactam và có kiểu hình đề kháng trung gian đối với carbapenem vì theo nghiên cứu của Nordmann và cộng sự gen mã hóa cho KPC thường đề kháng toàn bộ các  $\beta$ -lactam nhưng chỉ làm giảm nhạy cảm mà không gây nên sự đề kháng đối với carbapenem [8].

Ngược lại với hai chủng trên, chủng Eco16 nhận được các gen EBSL là SHV, TEM và CTX-M-1, gen AmpC là CMY và dương tính với kiểu gen NDM-1. Chủng này chỉ có kiểu hình đề kháng trung gian với imipenem và ertapenem nhưng lại nhạy cảm với toàn bộ các kháng sinh khác trong nghiên cứu. Điều này gần như hoàn toàn trái ngược với các công bố khác trên thế giới là khi vi khuẩn mang gen NDM-1 sẽ có khả năng kháng với nhiều  $\beta$ -lactamase phổ rộng bao gồm cả penicilline, cephalosporin và carbapenem [3]. Kết quả này cho thấy cần thiết phải có các nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc các gen lân cận gen NDM-1 trên plasmid mang gen này để làm sáng tỏ vấn đề liên quan đến các yếu tố điều hòa biểu hiện ở chủng đã tiếp hợp và chủng bố mẹ.

*K. pneumoniae* là một vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện thường được phát hiện ở những khoa chăm sóc đặc biệt và có nhiều nghiên cứu cho thấy hơn 50 % số ca nhiễm khuẩn là do lây lan giữa các bệnh nhân. Báo cáo này cho thấy *K. pneumoniae* có khả năng truyền gen đề kháng kháng sinh cho chủng *E. coli* J53, là một vấn đề cần quan tâm trong lâm sàng tại Việt Nam vì đã có nhiều báo cáo trên thế giới cho biết có sự chuyển gen tương tự trên cùng bệnh nhân điều trị [11].

#### KẾT LUẬN

Sự lan truyền gen đề kháng kháng sinh giữa các chủng vi khuẩn cùng hay khác loài theo cơ chế di truyền ngang là một trong những cơ chế làm phát tán rộng rãi các gen đề kháng kháng sinh trong môi trường bệnh viện và ngoài cộng đồng. Đây là cơ chế giúp cho các vi khuẩn thu nhận gen đề kháng một

cách dễ dàng và làm bùng phát các chủng đề kháng kháng sinh trong nhiễm trùng bệnh viện.

Kết quả tiếp hợp các chủng *K. pneumoniae* đề kháng carbapenem sang vi khuẩn *E. coli* J53 cho thấy khả năng lan truyền các gen trong môi trường bệnh viện và cộng đồng là vấn đề cần được quan tâm. Mặc dù các chủng tiếp hợp chỉ đề kháng trung gian với carbapenem nhưng CLSI cũng lưu ý là kết quả vòng ức chế vi khuẩn hay MIC của carbapenem trong giới hạn trung gian là không đảm bảo điều trị thành công vì hiện tại vẫn chưa đủ chứng cứ y học chứng minh cho vấn đề này [4,10]. Sự lan truyền gen đề kháng sinh từ các chủng *K. pneumoniae* đề kháng carbapenem sang cho *E. coli* trong nghiên cứu này là một vấn đề cần quan tâm trong các cơ sở điều trị vì khả năng lan truyền gen kháng thuốc ra cộng đồng là hiện hữu tại Việt Nam.

## *In vitro* transfer of carbapenem resistant genes from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* J53

- **Tran Nhat Phuong**
- **Tran Linh Thuoc**  
University of Science, VNU-HCM.
- **Pham Hung Van**  
Ho Chi Minh City Medical and Pharmaceutical University

#### ABSTRACT

*Nocosomial pathogen Klebsiella pneumoniae is a gram - negative bacterium that carries multiple antimicrobial resistant genes. Conjugative method was used for investigating of gene transfer from clinical carbapenem-resistant K. pneumoniae isolates to a recipient E. coli J53 in vitro. Multiplex PCR & Real-time PCR was used for detection of transferable genes among these strains. Transconjugants showed*

*resistance to multiple antibiotics due to the presence of ESBLs & AmpC  $\beta$ -lactamase as well as carbapenemase encoding genes. This is the great concern in Vietnam because resistant E. coli may become part of the normal gut flora and thereby a notable source of infections among sick and healthy persons in healthcare settings and in the community.*

**Key words:** *K. pneumoniae, E. coli J53, conjugate, resistance,  $\beta$ -lactamase*



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Information Supplement 2014, (2014).
- [2]. H. Yi, Y.J. Cho, D. Yong, J. Chun, Genome sequence of *Escherichia coli* J53, a reference strain for genetic studies, *Journal of Bacteriology*, 194, 14, 3742–3743 (2012).
- [3]. L. Dortet, L. Poirel, P. Nordmann, Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in gram-negative Enterobacteriaceae, *BioMed Research International*, Article ID 249856, 12 (2014).
- [4]. Leavitt, N. Venezia S, I. Chmelnitsky, M.J. Schwaber, Y. Carmeli. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3026–9 (2007).
- [5]. L.N. Andrade, T. Curiao et al., Dissemination of bla KPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3579–3583 (2011).
- [6]. M.D. Reisbig, N.D. Hanson, The ACT-1 plasmid encoded AmpC  $\beta$ -lactamase is inducible-detection in a complex  $\beta$ -lactamase background, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 557–560 (2002).
- [7]. L. Merijn, M. Salverda, J. Arjan G.M. de Visser, M. Barlow, Natural evolution of TEM-1  $\beta$ -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance, *FEMS Microbiol Rev*, 34, 1015–6 (2010).
- [8]. P. Nordmann, G. Cuzon, T. Naas, The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria, *Lancet Infect Dis*. 9: 228–36 (2009).
- [9]. P.A. Bradford, C. Urban, N. Mariano, S.J. Projan, J.J. Rahal, K. Bush, Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 563–569 (1997).
- [10]. P.H. Vân, P.T. Bình. Kháng sinh - Đề kháng kháng sinh, Kỹ thuật kháng sinh đồ, Các vấn đề cơ bản thường gặp, Nhà Xuất Bản Y Học (2013).
- [11]. S.N. Richter, I. Frasson, C. Bergo, S. Parisi, A. Cavallaro, G. Palu, Transfer of KPC-2 carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: First case in Europe, *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 5, 2040–2042 (2011).
- [12]. S. Phornphisutthimas, A. Thamchaipenet, B. Panijpan, Conjugation in *Escherichia coli*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35, 6, 440–445 (2007).
- [13]. D. Yong, M.A. Toleman, C.G. Giske, H.S. Cho, K. Sundman, K. Lee, T. Walsh, Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 12, 5046–5054 (2009).
- [14]. Multiplex PCR for the detection of AmpC- $\beta$ -lactamase, US patent No. US7,521,547B.
- [15]. Multiplex Real-Time PCR Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1), CDC (2010).