

Đặc tính kháng kháng sinh ở *Campylobacter* spp. phân lập từ heo, gà và vịt tại tỉnh Đồng Tháp

- Nguyễn Văn Minh Hoàng
- Cao Thu Thủy
- Trần Tịnh Hiền
- James Ian Campbell
- Stephen Baker

Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford

- Phan Thị Phượng Trang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 15 tháng 08 năm 2015, nhận đăng ngày 28 tháng 03 năm 2016)

TÓM TẮT

Để tìm hiểu nguyên nhân gây kháng kháng sinh ở *Campylobacter* spp. chúng tôi tiến hành khảo sát 75 chủng vi khuẩn được phân lập từ phân heo, gà và vịt ở Đồng Tháp. Kết quả cho thấy có 89,3 % chủng có đột biến điểm trên gene mã hóa DNA gyrase (*gyrA*) là C257T và T227G, có 32 % chủng có đột biến gene mã hóa bơm đẩy thuốc *CmeABC* (*cmeR*) của hệ thống bơm đẩy thuốc. Trong đó có 29,3 % chủng *Campylobacter* spp. có mang đột biến trên cả 2 gene *gyrA* và *cmeR* biểu hiện kháng fluoroquinolone (FQ). Kết quả nghiên cứu còn cho thấy toàn bộ đột biến T227G trên gene *gyrA* chỉ xuất hiện trên chủng

Từ khóa: *Campylobacter*, kháng kháng sinh, fluoroquinolone, erythromycine, đột biến, tỉnh Đồng Tháp

Campylobacter coli được phân lập từ các mẫu heo, gà và vịt mà không xuất hiện trên *Campylobacter jejuni*, đây là kiểu đột biến mới phát hiện ở Việt Nam. Ngoài khả năng kháng FQ của các chủng *Campylobacter* spp. phân lập còn có khả năng kháng erythromycine (Ery), cả 10 chủng kháng Ery với MIC > 128 đều có đột biến ở vị trí A2075G trên vùng gene 23S-rRNA, trong đó có 1 chủng mang cả 2 đột biến ở vị trí A2075G và A2074C và 2 chủng mang cả 2 đột biến ở vị trí A2075G và A2076C. Kiểu đột biến trên cả 3 chủng *C. coli* này ở tỉnh Đồng Tháp có kiểu đột biến kháng Ery mới chưa từng xuất hiện ở nơi khác.

MỞ ĐẦU

Kháng sinh đang được sử dụng rất rộng rãi trong chăn nuôi gia súc cũng như gia cầm với nhiều mục đích như kích thích sự tăng trưởng, phòng bệnh, điều trị bệnh [3, 12]. Việc sử dụng kháng sinh rộng rãi và lâu dài dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn [5, 9].

Campylobacter spp. là một trong những tác nhân vi khuẩn hàng đầu gây bệnh tiêu chảy trên thế giới. *Campylobacter* spp. còn là tác nhân phổ biến gây bệnh viêm ruột kết có nguồn gốc từ vật nuôi. Bên cạnh tình hình nhiễm *Campylobacter* ngày càng gia tăng ở cả các nước phát triển và đang phát triển thì tỉ

lệ các chủng kháng thuốc cũng không ngừng tăng lên, đặc biệt là với fluoroquinolone (FQ) dựa vào gene *gyrA* mã hóa enzyme gyrase cũng như gene *cmeR* mã hóa bơm đẩy thuốc *CmeABC*, họ kháng sinh này thường được dùng để điều trị tiêu chảy do nhiễm *Campylobacter* spp. [9, 11, 12]. Bên cạnh việc kháng FQ, *Campylobacter* spp. còn kháng cả Ery, là kháng sinh thuộc nhóm Macrolide (nhóm kháng sinh tốt nhất dùng để điều trị nhiễm *Campylobacter* spp.) [11]. Ở Việt Nam, hầu hết các nghiên cứu về *Campylobacter* spp. đều dừng lại ở việc mô tả sự lưu

hành cũng như tình hình kháng kháng sinh ở *Campylobacter* spp. phân lập từ gia súc, gia cầm.

Đồng Tháp là một trong những địa phương có mô hình chăn nuôi trang trại phát triển mạnh thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Trong đó, gia súc, gia cầm mang vi khuẩn *Campylobacter* spp. gây bệnh cho động vật cũng như con người là đối tượng được người chăn nuôi đối phó bằng kháng sinh rất nhiều. Việc sử dụng kháng sinh thường mang tính tự phát, không theo chỉ dẫn của chuyên gia hoặc cơ quan chức năng. Điều này có thể dẫn đến sự kháng kháng sinh và điều trị bệnh không hiệu quả.

Với mục đích tìm ra các biến đổi di truyền liên quan đến khả năng kháng kháng sinh FQ và Ery ở *Campylobacter* spp. trong chăn nuôi gia súc và gia cầm, cũng như thu thập dữ liệu ở cấp độ phân tử kháng kháng sinh ở vi khuẩn này, nghiên cứu nhằm tiến hành khảo sát và phân tích tính kháng thuốc ở 75 chủng vi khuẩn *Campylobacter* spp. phân lập từ phân heo, gà, vịt ở các trang trại trên địa bàn tỉnh Đồng Tháp.

VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Chọn 75 chủng *Campylobacter* spp. đã được nuôi cấy và phân lập từ heo, gà, vịt (25 chủng cho mỗi loại) có kết quả kháng FQ trong tổng số 343 chủng *Campylobacter* spp. phân lập từ các trang trại nuôi heo, gà, vịt trên địa bàn tỉnh Đồng Tháp [2]. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của Ery, chọn ra các chủng *Campylobacter* spp. kháng Ery có MIC >256 [2].

Tiến hành phân loại loài *C. jejuni* và *C. coli* thông qua việc xác định vùng gene đặc trưng cho từng loài bằng kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) với các cặp mồi chuyên biệt được thiết kế trên Bảng 1. Để phân loại loài *C. jejuni* chúng tôi khuếch đại gene mục tiêu với mồi chuyên biệt *Jejuni-hipO F/ Jejuni-hipO R* dựa trên trình tự của gene *hipO* mã hóa cho Hippuricase [8] và phân loại loài *C. coli* dựa trên trình tự gene *asp* mã hóa cho Aspartokinase với cặp mồi chuyên biệt là *Coli-asp F/ Coli-asp R* [7].

Bảng 1. Các trình tự mồi sử dụng cho phản ứng PCR và giải trình tự gene

Tên mồi	Gene mục tiêu (bp)	Trình tự mồi	Tài liệu tham khảo
Jejuni-hipO F Jejuni-hipO R	hipO (344 bp)	5'-GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT-3' 5'-GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA-3'	[8]
Coli-asp F Coli-asp R	asp (500 bp)	5'-GGTATGATTCTACAAAGCGAG-3' 5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'	[7]
gyrA F gyrA R	gyrA (250 bp)	5' GCTATGCAAAATGATGAGGC 3' 5' TCAGTATAACGCATCGCAGC 3'	[10]
cmeR F cmeR R	cmeR (170 bp)	5' CTAAATGGAATCAATAGCTCC 3' 5' GCACAACACCTAAAGCTAAAA 3'	[6]
rrnB F rrnB R	rrnB (485 bp)	5'- TTAGCTAATGTTGCCCGTACCG -3' 5' AGTAAAGGTCCACGGGGTCTGG -3'	[1]

Xác định trình tự vùng kháng FQ của gene *gyrA* với cặp mồi *gyrA F/ gyrA R* cũng như gene mã hóa bơm đẩy thuốc CmeABC với cặp mồi *cmeR F/cmeR R* (Bảng 1), sản phẩm PCR được giải trình tự bằng máy Applied Biosystem cho và phân tích các đột biến gene dẫn đến hiện tượng kháng FQ.

Phân tích kết quả giải trình tự bằng phần mềm Sequencing analysis tương ứng. Đột biến ở vùng kháng FQ trên gene *gyrA* được phân tích bằng phần mềm Vector NTI Suit 7 và so sánh với trình tự tham khảo là gene *gyrA* của *C. jejuni* với mã số đăng nhập trên NCBI là L04566 [3, 5, 11]. Tương tự, phân tích

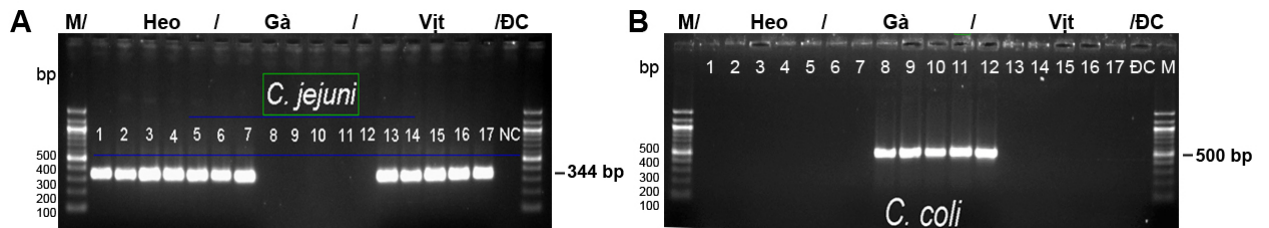
đoạn trình tự (5'-TGTAATAAATATTACA-3') thuộc promoter của bom CmeABC bằng cách so sánh vùng trình tự này với trình tự tham khảo là trình tự gene *cmeR* của *C. jejuni* 81-176 với mã số đăng nhập trên NCBI là AF466820 [4, 6] nhằm phát hiện các đột biến.

Nhân bản vùng operon *rrnB* bằng phản ứng PCR với cặp mồi *rrnB F/rrnB R*, giải trình tự vùng gene trên vùng gene 23S-rRNA này nhằm xác định trình tự gene tại vị trí 2074, 2075 và 2076 [3, 5, 11] để tìm hiểu đột biến gene dẫn đến hiện tượng kháng Ery.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Tần suất xuất hiện các chủng *Campylobacter* spp. ở heo, gà và vịt

Kết quả phân loại *C. coli* và *C. jejuni* bằng kỹ thuật PCR (Hình 1) được tổng kết trên Bảng 2. Kết quả phân loại cho thấy, tần suất phân lập được *C. coli* từ heo cao hơn *C. coli* ở gà và vịt với tỉ lệ tương ứng là 22/25, 9/25 và 8/25. Trái ngược với *C. coli*, *C. jejuni* phân lập từ gà và vịt cao hơn *C. jejuni* từ heo với kết quả tương ứng là 16/25, 17/25 so với 3/25. Như vậy, số lượng chủng *C. coli* phân lập được ở heo gấp 7 lần số lượng chủng *C. jejuni*. Số lượng chủng *C. jejuni* phân lập được ở gà và vịt gấp đôi số lượng chủng *C. coli*. Điều này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu về tính kháng kháng sinh ở các chủng *Campylobacter* spp. phân lập từ người, động vật và thực phẩm ở Ý vào năm 1997-1998 [12]. Theo đó có 81 % chủng *C. jejuni* được phân lập ở gà công nghiệp và 100% chủng *C. coli* được phân lập ở heo.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhằm phân biệt *C. jejuni* và *C. coli* bằng kỹ thuật PCR. (A) Nhận diện *C. jejuni* bằng gene đặc trưng *hipO* (344 bp); (B) Nhận diện *C. coli* bằng gene đặc trưng *asp* (500 bp); (M) thang DNA 100 bp; (1-17) các chủng *Campylobacter* spp. phân lập từ heo, gà, vịt ở tỉnh Đồng Tháp; (-) chứng âm (nước cất)

Bảng 2. Kết quả phân biệt *C. jejuni* và *C. coli* phân lập từ heo, gà, vịt bằng phương pháp PCR

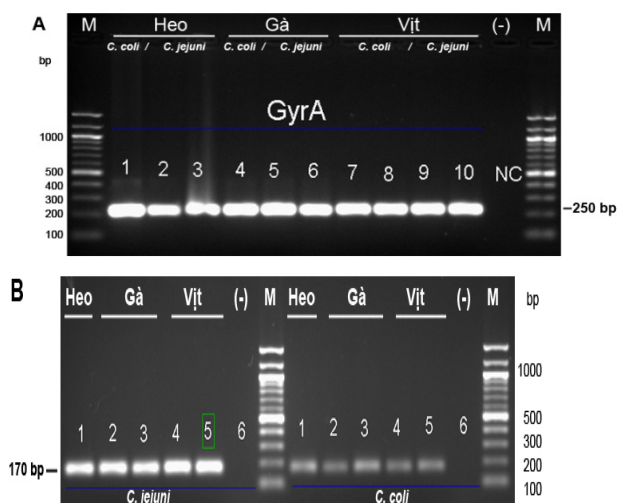
Loại mẫu	Tổng số chủng <i>Campylobacter</i> spp. phân lập bằng nuôi cấy	Phân biệt bằng PCR	
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Heo	25	03	22
Gà	25	16	09
Vịt	25	17	08
Tổng số	75	36	39

Như vậy, kết quả phân loại cho thấy, mặc dù cùng một địa phương có vùng địa lý giống nhau nhưng tỷ lệ xuất hiện của *Campylobacter* spp. trên heo, gà, vịt là khác nhau. Kể cả tỷ lệ hiện diện giữa *C. coli* và *C. jejuni* cũng khác nhau trên các mẫu phân tích.

Phân tích vùng gene *gyrA* và gene *cmeR* dẫn đến hiện tượng kháng FQ ở *Campylobacter* spp.

Toàn bộ các chủng *Campylobacter* spp. kháng FQ khảo sát đều mang gene *gyrA* và gene *cmeR*

(Hình 2). Kết quả phân tích trình tự gene *gyrA* và *cmeR* cho thấy, đa số các chủng *Campylobacter* spp. khảo sát (67/75 chủng) có mang đột biến trên gene *gyrA* ở codon 86. Bên cạnh đó, có 24/75 chủng có mang đột biến trên gene *cmeR* mã hóa cho bơm đẩy thuốc CmeABC (Hình 3). Trong đó, có 29,3% (22/75) chủng *Campylobacter* spp. có đột biến trên cả 2 gene *gyrA* và *cmeR*. Đặc biệt là ở vịt có hơn 50 % (13/25) số chủng mang cả 2 đột biến (Bảng 3).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện gene *gyrA* và gene *cmeR* ở *Campylobacter* spp. (A) phát hiện gene *gyrA*, 250 bp; (B) phát hiện gene *cmeR*, 170 bp. (M) Thang DNA 100 bp; (Heo) chủng *Campylobacter* spp. phân lập từ heo ở tỉnh Đồng Tháp; (Gà) *Campylobacter* spp. phân lập từ gà ở tỉnh Đồng Tháp; (Vịt) chủng *Campylobacter* spp. phân lập từ vịt ở tỉnh Đồng Tháp; (-) chứng âm (nước cất)

Bảng 3. Kết quả phân tích *Campylobacter* spp. kháng FQ

Loại mẫu	Đột biến <i>gyrA</i>	Đột biến <i>cmeR</i>	Đột biến <i>gyrA</i> và <i>cmeR</i>
Heo (n=25)	22	02	02
Gà (n=25)	23	07	07
Vịt (n=25)	22	15	13
Tổng số	67	24	22

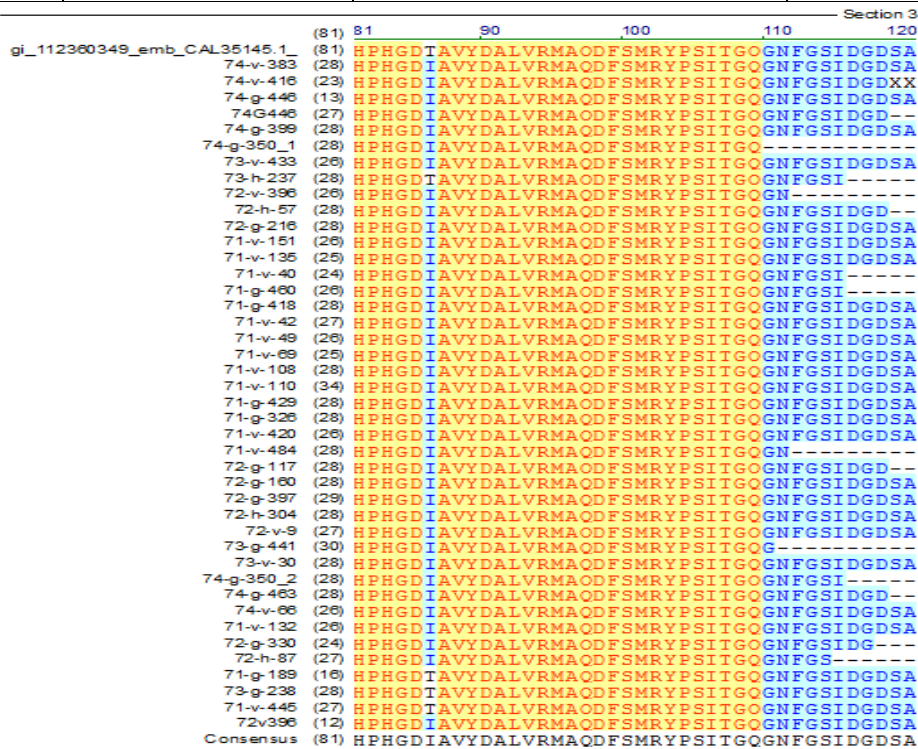
Phân tích các đột biến trên *C. jejuni* ở vùng gene *gyrA* và gene *cmeR* (format)

Kết quả khảo sát cho thấy trong 36 chủng *C. jejuni* kháng FQ từ heo, gà và vịt có 32 chủng mang đột biến trên gene *gyrA* ở codon 86 với kiểu đột biến điểm là C257T làm thay đổi threonine thành isoleucine trên cấu trúc protein. Thêm vào đó, có 18

chủng có đột biến gene *cmeR* mã hóa cho hệ thống bơm đẩy thuốc CmeABC. Trong đó, đột biến hệ thống bơm đẩy thuốc ở *C. jejuni* phân lập từ gà, vịt khá đa dạng. Trường hợp *C. jejuni* mang cả 2 đột biến trên chiếm tỷ lệ khá cao, gần 50 % (Hình 3, Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả phân tích *C. jejuni* kháng FQ

Đối tượng (n=36)	Đột biến <i>gyrA</i>	Đột biến <i>cmeR</i> (TGTAATAAATATTACA)	Đột biến <i>gyrA</i> và <i>cmeR</i>
Heo, (n = 3)	C257T(T-> I), (n=3)	T <u>C</u> GTAATAAATATTACA (n=1)	n=1
Gà, (n = 16)	C257T(T-> I), (n=13)	T <u>A</u> TAAATAAAAATTACA (n=2) TGTAATAAAA <u>A</u> ATTACA (n=1) TGTAATAAAA <u>A</u> ATTA-A (n=1) TGTAATAAAA <u>A</u> ATTAT <u>A</u> (n=1)	n=4
Vịt, (n = 17)	C257T(T-> I), (n=16)	TGTAATAAAA <u>A</u> ATTACA (n=11) TGTAATAAA <u>G</u> ATTACA (n=1) TGTA-TAA <u>G</u> ATATTACA (n=1)	n=12

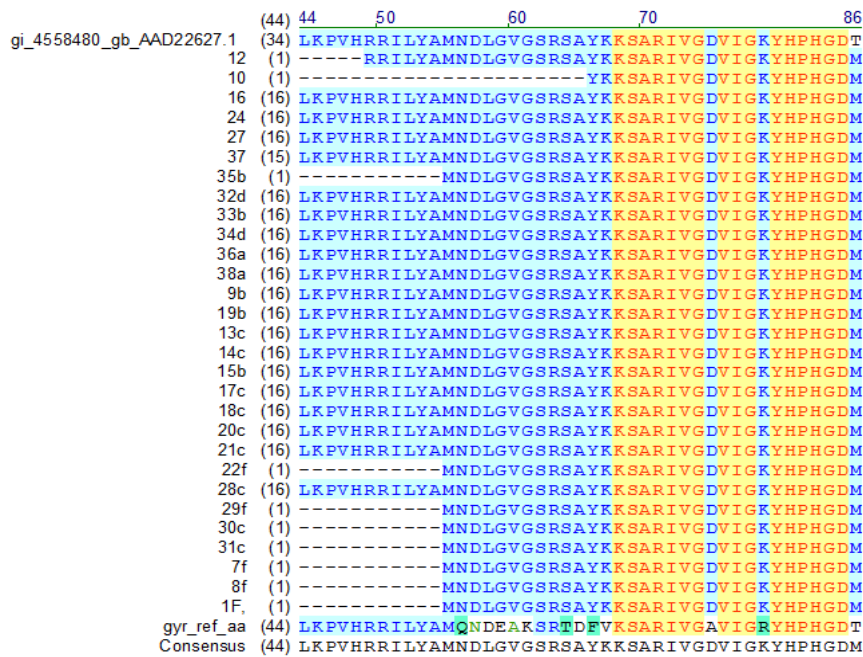


Hình 3. Kết quả phân tích trình tự acid amin enzyme *gyrA* của các chủng *C. coli*. Có sự thay đổi ở vị trí codon 86 (Threonin 86 Methionin); hàng đầu tiên là trình tự từ *C. coli* lấy từ genbank AAD22627, hàng cuối cùng là trình tự *C. jejuni* lấy từ genbank AL111168.1.

Phân tích các đột biến trên *C. coli* ở vùng gene *gyrA* và gene *cmeR*

Kết quả khảo sát trên Hình 4 cho thấy chỉ có 2/39 chủng có đột biến *gyrA* ở codon 86 với kiểu đột biến điểm là C257T làm thay đổi threonine thành isoleucine, nhưng có đến 33/39 chủng có đột biến điểm là T227G làm thay đổi threonine thành methionine. Ngoài ra, có 2/39 chủng có đột biến gene mã hóa CmeABC ở hệ thống bơm đẩy thuốc, và chủng này có mang cả 2 đột biến ở gene *gyrA* và

gene *cmeR* (Bảng 5). Như vậy, so với *C. jejuni*, *C. coli* còn có thêm đột biến T227G. Hiện tượng đột biến làm thay đổi threonine thành methionine khá phổ biến trên *C. coli* phân lập từ cả heo, gà, vịt. Đây là kết quả nghiên cứu hoàn toàn mới so với các đột biến đã được biết từ trước đến nay [11]. Nghiên cứu này cho thấy đột biến T227G hiện chỉ mới lan truyền trong nội tại các chủng *C. coli* mà chưa thấy xuất hiện trên các chủng *C. jejuni* khảo sát.



Hình 4. Kết quả phân tích trình tự trên gene *rrnB* của các chủng *C. coli*. Có mang đột biến điểm trên gene *rrnB* tại vị trí A2075G, A2074C và A2075C ở 73H10 (MIC ≥ 256 µg/mL). Các giá trị MIC <256 µg/mL không bị đột biến. Hàng đầu tiên là trình tự *C. coli* lấy từ Genbank AAD22627, hàng cuối cùng là trình tự *C. jejuni* lấy từ Genbank AL111168.1

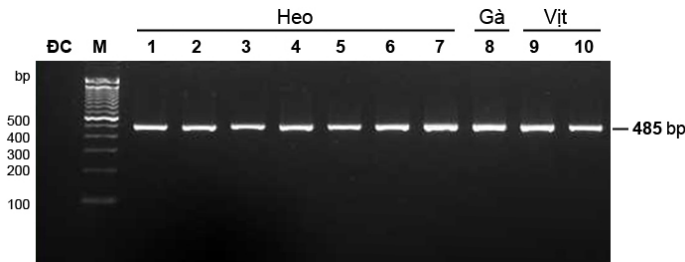
Bảng 5. Kết quả phân tích *C. coli* kháng FQ

Đối tượng n=39	Đột biến <i>gyrA</i>	Đột biến <i>cmeR</i> TGTAATAAATATTACA	Đột biến <i>gyrA</i> và <i>cmeR</i>
Heo n=22	C257T, (T-> I), (n=1) T227G(T-> M), (n=19)	TGTAATAAAAATTACA (n=1)	n=1
Gà n=9	C257T, (T-> I), (n=1) T227G(T-> M), (n=8)	(n=0)	n=0
Vịt n = 8	T227G(T-> M), (n=6)	TGTAATAAAAATTACA (n=1)	n=1

Phân tích đột biến kháng Ery ở *Campylobacter* spp.

Theo kết quả của một số tác giả khác cho thấy, giá trị MIC Ery ≥ 256 (các chủng có tính kháng cao) khi phân tích trình tự vùng gene *rrnB* thấy có đột biến tại vị trí A2075G. Ngược lại nếu giá trị MIC Ery < 256 (các chủng có tính kháng thấp) thì có khả năng mang đột biến tại vị trí A2074C hoặc không mang đột biến [5,11]. Do đó, trong nghiên cứu này, dựa vào kết

quả MIC của Ery, chọn được 10 chủng có MIC Ery ≥ 256 để xác định đột biến kháng sinh Ery thông qua sự hiện diện của gene *rrnB* và phân tích đột biến trên gene 23S-rRNA. Kết quả sàng lọc cho thấy, tất cả các chủng có MIC Ery ≥ 256 đều mang gene *rrnB* và thuộc các chủng *C. coli* (Hình 5).



Hình 5. Kết quả nhân bản gene *rrnB* trên các chủng *Campylobacter* spp. có MIC Ery ≥ 256 bằng kỹ thuật PCR. (M) Thang DNA 100 bp; (Heo) chủng *Campylobacter* spp. phân lập từ heo ở tỉnh Đồng Tháp; (Gà) *Campylobacter* spp. phân lập từ gà ở tỉnh Đồng Tháp; (Vịt) chủng *Campylobacter* spp. phân lập từ vịt ở tỉnh Đồng Tháp; (ĐC) chứng âm (nước cất)

	(2001)	2001	2010	2020	2030	2040
gi_470474593_ref_NR_076226.1 (1999)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
71g102(MIC>256) (364)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
73g238(MIC=0.064) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
73h10(MIC>256) (326)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
73H164(MIC>256) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
72H202(MIC>256) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
71H67(MIC>256) (233)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
71H112(MIC>256) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
72h304(mic=48) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
74G331(MIC>256) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
73v201(mic>256) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
71v328(mic>256) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
71H120(MIC>256) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
72g117(MIC=0.5) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
74v66(MIC=0.19) (325)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
71H111(MIC>256) (208)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
Consensus (2001)		ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA	ATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGA
		Section 52				
	(2041)	2041	2050	2060	2070	2080
gi_470474593_ref_NR_076226.1 (2039)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
71g102(MIC>256) (404)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
73g238(MIC=0.064) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
73h10(MIC>256) (366)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
73H164(MIC>256) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
72H202(MIC>256) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
71H67(MIC>256) (273)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
71H112(MIC>256) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
72h304(mic=48) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
74G331(MIC>256) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
73v201(mic>256) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
71v328(mic>256) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
71H120(MIC>256) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
72g117(MIC=0.5) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
74v66(MIC=0.19) (365)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
71H111(MIC>256) (248)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA
Consensus (2041)		GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA	GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAA

Hình 6. Kết quả phân tích trình tự trên gene 23S-rRNA của 10 chủng *C. coli* có mang gene *rrnB* và mang đột biến (MIC Ery ≥ 256 ; các giá trị MIC Ery < 256 không bị đột biến)

Bảng 6. Kết quả phân tích *Campylobacter* spp. kháng Ery.

Đối tượng	Nu 2074	Nu 2075	Nu 2076	Nu 2074 và 2075	Nu 2075 và 2076
Heo n = 7	A2074C (n=1)	A2075C (n=1) A2075G (n=6)	A2076C (n=1)	n=1	n=1
Gà n = 1		A2075G (n=1)	A2076C (n=1)		n=1
Vịt n = 2		A2075G (n=2)			
Tổng số	01	10	02	01	01

Từ kết quả phân tích trình tự gene 23S-rRNA kháng Ery với MIC >256 của các chủng *C. coli* trên Hình 6 cho thấy, có 7 chủng *C. coli* kháng Ery mang đột biến tại vị trí A2075G giống như các kết quả đã công bố trước đây [11]. Có 3 chủng *C. coli* kháng Ery mang 2 đột biến mới bao gồm 3 kiểu sau: A2074C & A2075C ở heo, A2075G & A2076C ở heo và A2075G & A2076C ở gà (Bảng 6). Như vậy, từ 10 chủng phân tích có các chủng mang đột biến điểm ở vị trí A2074C và A2075G như đã xuất hiện ở nhiều nơi trên thế giới [11]. Tuy nhiên, có 3 chủng đặc biệt mang các đột biến tại 2 vị trí 2074 và 2075 hoặc 2075 và 2076 là kiểu đột biến mới chưa từng xuất hiện ở nơi khác.

KẾT LUẬN

Kết quả của khảo sát này cho thấy tình trạng kháng FQ và Ery của *Campylobacter* spp. phân lập từ phân heo, gà, vịt ở tỉnh Đồng Tháp là khá cao. Các biến đổi gene dẫn đến đề kháng kháng sinh diễn ra rất phức tạp, đã có xuất hiện các đột biến mới có thể gây khó khăn trong quá trình điều trị bệnh nhiễm *Campylobacter* spp. trên gia súc, gia cầm. Đặc biệt cần hạn chế tối đa việc sử dụng FQ trong điều trị và chăn nuôi nhằm hạn chế việc lan truyền gene đột biến gây kháng mạnh với kháng sinh theo chiều ngang. Thông tin này có thể giúp cho cơ quan thú y có biện pháp phòng chống việc lây lan tính kháng kháng sinh ở vi khuẩn cho đàn gia súc, gia cầm.

Antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. strains isolated from faecal samples of pigs chickens and ducks at Dong Thap province

- **Nguyen Van Minh Hoang**
- **Cao Thu Thuy**
- **Tran Tinh Hien**
- **James Ian Campbell**
- **Stephen Baker**
Oxford University Clinical Research Unit
- **Phan Thi Phuong Trang**
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

This study was designed to identify the genetic basis that results in the development of antibiotic resistance in Campylobacter spp. We carried out a molecular examination of 75 strains looking for resistance factors. These strains were isolated from faecal samples of pigs, chickens and ducks at Dong Thap province. There were 89.3 % strains which showed mutations on DNA gyrase-gyrA gene at the position 86 (C257T and T227G). There were also a further 32 % strains that showed mutations on gene cmeR encoding the efflux CmeABC pump system. This study has also shown that 29.3 % of Campylobacter spp. have mutations in fluoroquinolone (FQ) resistance on both genes gyrA and cmeR. In comparison with Campylobacter jejuni

with the mutation C257T (Thr-86-Ile), Campylobacter coli has another mutation at T227G (Thr-86-Met). This mutation, encoding FQ resistance, is common in both swine and poultry but has not yet been identified in Viet Nam. As well as FQ resistance, resistance to erythromycin (Ery) has been detected in C. coli, in 10 strains erythromycin resistance, with a mutation at position A2075G. There was 1 strain which carried two mutations A2075G and A2074C at 23S-rRNA gene, and 2 mutant strains with a double mutation at A2075G and A2076C. In summary, there were three strains of C. coli with double mutations encoding Ery resistance at Dong Thap and this resistance characteristic has not been identified elsewhere.

Key words: *Campylobacter, antibiotic resistance, fluoroquinolone, erythromycin, mutation, Dong Thap province*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R. Alonso, E. Mateo, E. Churrua, I. Martinez, C. Girbau, A. Fernández-Astorga MAMA-PCR assay for the detection of point mutations associated with high-level erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 99e103 (2005).
- [2]. M.J. Carrique et al. An epidemiological investigation of *Campylobacter* in pig and poultry farms in the Mekong delta of Vietnam, *Infect Epidemiol.* doi:10.1017/S0950268813002410 (2013).
- [3]. M.J. Fraqueza et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. strains isolated from

- different poultry production systems at slaughterhouse level, *Poult Sci*, 93, 6, 1578-86. doi: 10.3382/ps.2013-03729 (2014).
- [4]. B. Jeon, W. Muraoka, O. Sahin, Q. Zhang, Role of Cj1211 in natural transformation and transfer of antibiotic resistance determinants in *Campylobacter jejuni*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 8, 2699–2708 (2008).
- [5]. J. Hong et al., Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. from chicken meat, pork, and beef in Korea, from 2001 to 2006, *Journal of Food Protection*, 70, 4, 2007, 860-866 (2007).
- [6]. J. Lin, L.O. Michel, Q. Zhang, CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*, *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2124-31 (2002).
- [7]. Linton, D., A. J. Lawson, R. J. Owen, J. Stanley PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, *J Clin Microbiol*, 35, 2568-72 (1997).
- [8]. S. Persson, K.E. Olsen, Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples, *J Med Microbiol*, 54, 1043-7 (2005).
- [9]. M. Usui, Y. Sakemi, I. Uchida, Y. Tamura, Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone resistant *Campylobacter* spp. *Vet Microbiol*. 170 (3-4):438-41. doi: 10.1016/j.vetmic. 2014.01.036. Epub (2014).
- [10]. Y. Wang, W.M. Huang, D.E. Taylor, Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* gyrA gene and characterization of quinolone resistance mutations, *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 457-63 (1993).
- [11]. K. Wiczorek, J. Osek, Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, Article ID 340605, 12 (2013).
- [12]. Y. Sáenz et al., Antibiotic Resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997–1998, *Antimicrob Agents and Chemother*, 2000, 44, 2267-271 (1999).