

ĐẶC ĐIỂM KHÁNG KHÁNG SINH CỦA ENTEROCOCCUS FAECALIS KHÁNG FLUOROQUINOLONE PHÂN LẬP TỪ NGƯỜI, ĐỘNG VẬT VÀ THỰC PHẨM

Hoàng Thị An Hà^{1,2}, Nguyễn Vũ Trung³, Nguyễn Hà Thanh⁴, Phạm Duy Thái⁴
Nguyễn Thị Lan Phương⁴, Trần Thị Mai Hưng⁴ và Trần Huy Hoàng⁴✉

¹Trường Đại học Y khoa Vinh

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương

Enterococcus faecalis là tác nhân gây nhiễm trùng cơ hội phổ biến ở bệnh viện và cộng đồng. Sự sẵn có của nó trong nhiều môi trường khác nhau và khả năng đề kháng với nhiều loại kháng sinh đã làm cho vai trò của *E. faecalis* ngày càng quan trọng hơn. Fluoroquinolone là nhóm kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng, đặc biệt là trên bệnh nhân nhiễm trùng đường tiết niệu mà *E. faecalis* là tác nhân vi khuẩn gram dương gây bệnh thường gặp. Sự tiêu thụ fluoroquinolone trong bệnh viện, trong chăn nuôi đã tạo ra áp lực chọn lọc cho sự đề kháng, theo thực phẩm và sinh vật trung gian, ví dụ như ruồi hoàn toàn có thể được lan truyền. 466 chủng *E. faecalis* từ các mẫu phân người, phân gà, ruồi và thực phẩm chợ được phân lập. Tỷ lệ kháng ciprofloxacin 19,5%, kháng levofloxacin 17,6%. Thử nghiệm tính nhạy cảm của các chủng kháng fluoroquinolone với các kháng sinh khác cho thấy tỷ lệ kháng cao với macrolide, phenicol, tetracylin (> 90%), kháng aminoglycosid mức độ cao (27,5% - 53,9%) và kháng linezolid (63,7%). Nhạy cảm tốt với penicillin và ampicillin. Gen liên quan sự đề kháng là *gyrA* (có mặt trong 14,4% chủng kháng ciprofloxacin, 18,5% chủng kháng levofloxacin), *emeA*, *ermA*, *ermB*, *cat*, *fexA*, *tetM*, *tetL* và *tetK*. 100% chủng kháng linezolid mang *optrA*, không tìm thấy *poxtA*. Các gen *aac(6)-Ie/aph(2)-Ia*, *aph(3)-IIIa*, *ant(6)-Ia* xuất hiện trong các chủng kháng aminoglycosid mức độ cao. *emeA*, gen quy định cơ chế kháng bơm đẩy có mặt rộng rãi trên các chủng *E. faecalis* phân lập được nhưng không có mối liên hệ có ý nghĩa thống kê đối với mức độ kháng fluoroquinolone.

Từ khóa: *E. faecalis*, fluoroquinolone, kháng kháng sinh.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Enterococcus faecalis vi khuẩn Gram dương, sinh acid lactic và được tìm thấy ở nhiều môi trường đất, nước, thực phẩm và động vật.¹ Ở người, nó là một thành viên của hệ thống tiêu hóa, tuy nhiên cũng như *E. coli*, *E. faecalis* đã trở thành một tác nhân gây nhiễm trùng cơ hội quan trọng trong bệnh viện và

trong cộng đồng. Với nhiều yếu tố độc lực giúp cho sự bám dính, xâm nhập, lẩn tránh sự đáp ứng miễn dịch..., *E. faecalis* nổi lên với vai trò là nguyên nhân của viêm nội tâm mạc, nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn vết thương và đặc biệt là nhiễm khuẩn đường tiết niệu.²⁻⁴ Điều trị các nhiễm trùng do loài vi khuẩn này gây ra có thể gặp khó khăn vì về bản chất, nó đã có khả năng đề kháng với một số kháng sinh như cephalosporin, clindamycin, và đề kháng mức độ thấp với aminoglycosid. Cùng với đó, sự thu nhận các gen đề kháng thông qua các yếu tố di truyền động như plasmid, transposone, hoặc

Tác giả liên hệ: Trần Huy Hoàng

Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương

Email: thh@nihe.org.com

Ngày nhận: 25/10/2022

Ngày được chấp nhận: 26/11/2022

do đột biến dưới áp lực chọn lọc của kháng sinh đã làm cho tình trạng đề kháng của chúng trở nên phức tạp hơn.

Fluoroquinolone là một trong những nhóm kháng sinh quan trọng được lựa chọn phổ biến để điều trị nhiễm trùng do nhiều loại vi khuẩn gây ra, trong đó có các vi khuẩn Gram dương gây nhiễm khuẩn tiết niệu mà nổi bật là *E. faecalis*.⁴ Tuy nhiên, sự đề kháng nhóm kháng sinh này trên *Enterococcus* nói chung và *E. faecalis* nói riêng đã có xu hướng gia tăng.^{5,6} Cơ chế kháng fluoroquinolone ở *E. faecalis* được biết đến với sự đột biến các gen *gyrA*, *gyrB*, *parC* làm thay đổi cấu trúc điểm gắn kháng sinh (DNA gyrase và topoisomerase IV). Bên cạnh đó, sự có mặt của các kênh bơm đẩy như EmeA, EfrAB làm giảm nồng độ kháng sinh trong tế bào đã góp phần vào khả năng đề kháng fluoroquinolone của loại vi khuẩn này.^{7,8}

Việc sử dụng fluoroquinolone và các kháng sinh khác trên người và động vật đã gây nên áp lực chọn lọc các chủng *E. faecalis* đề kháng bởi sự có mặt thường xuyên của chúng tại đường tiêu hóa. Sự lây nhiễm vào thực phẩm, vào các trung gian truyền bệnh như ruồi đã gây ra mối đe dọa to lớn đối với sức khỏe cộng đồng. Thông qua chuỗi thức ăn, các chủng đề kháng có thể lan truyền từ động vật sang người, giữa người với người và lan vào môi trường bệnh viện. Cùng với khả năng gây bệnh đã làm cho vai trò của *E. faecalis* trong cộng đồng đối với sức khỏe con người càng trở nên quan trọng hơn. Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có sự quan tâm đúng mức về mối nguy hiểm này cũng như chưa có nhiều nghiên cứu đề cập đến. Chính vì vậy, để chứng minh sự hiện hữu của *E. faecalis* kháng fluoroquinolone và kháng sinh khác trong cộng đồng, nghiên cứu “Đặc điểm kháng kháng sinh của *Enterococcus faecalis* kháng fluoroquinolone phân lập từ người, động vật và thực phẩm” được thực hiện với 2 mục tiêu:

1. Xác định tỷ lệ *E. faecalis* kháng fluoroquinolone phân lập từ người, động vật và thực phẩm.

2. Xác định mức độ nhạy cảm của *E. faecalis* kháng fluoroquinolone đối với các loại kháng sinh khác và các gen liên quan đến sự đề kháng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

466 chủng *E. faecalis* được phân lập, trong đó 82 chủng từ mẫu phân người khỏe mạnh, 121 chủng từ mẫu phân gà, 183 chủng từ mẫu ruồi của các trang trại chăn nuôi tại xã Yên Nam, Duy Tiên, Hà Nam và từ mẫu thực phẩm (thịt, rau) thu thập ở chợ lân cận (80 chủng).

Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Từ tháng 7/2021 - tháng 6/2022 tại Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

2. Phương pháp

- Mô tả cắt ngang, phân tích phòng thí nghiệm.
- Các mẫu sau khi vận chuyển lạnh về phòng thí nghiệm kháng kháng sinh - Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương sẽ được cấy trên môi trường chọn lọc Chromagar dành cho enterococci, ủ 37°C/ 5 - 10% CO₂, 24 - 48h, khuẩn lạc màu hồng điển hình định danh bằng kỹ thuật MALDI-TOF.
- Xác định kiểu hình kháng fluoroquinolone bằng kỹ thuật pha loãng kháng sinh xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: Minimal inhibitory concentration) trên môi trường đặc với 2 kháng sinh ciprofloxacin, levofloxacin. Các chủng kháng sẽ được thử nghiệm thêm mức độ nhạy cảm với các kháng sinh penicillin, ampicillin, vancomycin, linezolid, tetracyclin, minocyclin, erythromycin, chloramphenicol bằng kỹ thuật MIC trên thạch Muller-Hinton, kháng aminoglycosid ở mức độ cao (HLAR) trên thạch BHI chứa 500 µg/ml gentamycin, 2000 µg/ml streptomycin. Chủng chuẩn *E.*

faecalis ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 được sử dụng để kiểm tra chất lượng. Kết quả được biện luận theo CLSI 2021.⁹

- Xác định kiểu gen liên quan kháng Fluoroquinolone: *gyrA* và *emeA* được tiến hành trên tất cả các chủng phân lập được, kiểu gen đề kháng với kháng sinh khác được thực hiện trên các chủng đề kháng với kháng sinh đó bằng kỹ thuật PCR phát hiện các gen *otrpA*, *poxtA* (kháng linezolid), *ermA*, *ermB*, *ermC* (kháng macrolid), *tet L*, *tet M*, *tet K*, *tet O*, *tet S* (kháng tetracyclin), *cat*, *fexA* (kháng phenicol), *aac-(6)Ie/aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* và *aph(2'')-Id* (kháng aminoglycosid mức độ cao). Tế bào vi khuẩn từ môi trường BHI được rửa 3 lần trong dung dịch đệm TE, sau đó chiết tách DNA bằng

dung dịch TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8), ủ 95°C/10 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút, hút nước nổi dùng cho PCR.

- Các mẫu cho khuếch đại các gen liên quan đến sự đề kháng và chứng dương được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Kháng kháng sinh, khoa Vi khuẩn, Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương (Bảng 1). Thành phần của mỗi phản ứng PCR bao gồm: 12,5µL 2X Go Taq Green Master Mix (Promega), 0,2µL mỗi ngược và mỗi xuôi mỗi loại (10µM), 1µL ADN khuôn (1 - 10 ng/µL) và nước Nuclease free vừa đủ 25µL. Phản ứng được thực hiện trên máy luân nhiệt Thermo-cycler (Applied Biosystems, Veriti). Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên agrose 1,5% và nhuộm bằng Red safe.

Bảng 1. Trình tự các primer phát hiện các gen kháng kháng sinh

Kháng kháng sinh	Gen đề kháng	Prime (5' - 3')	Kích thước (bp)	Ta	Tài liệu tham khảo
Fluoro-quinolone	<i>gyrA</i>	GAYTATGCWATGTCAGTTATTGT GGAATRTTRGAYGTCATACCAAC (*)	286	45	10
Bom đẩy (đá kháng)	<i>emeA</i>	GTGACAGCCTTTGTGGCAGAT TAGTCCGTTGATGGTTCCTTG	687	57	11
Linezolid	<i>otrpA</i>	AGGTGGTCAGCGAACTAA ATCAACTGTTCCCATTC	1395	48	12
	<i>poxtA</i>	AAAGCTACCCATAAAATATC TCATCAAGCTGTTCGAGTTC	533	50	13
Macrolide	<i>ermA</i>	GAGTCGGTGGGTGGATTCTA GAACGCGATATTCACGGTT	464	57	Nghiên cứu này
	<i>ermB</i>	CATTTAACGACGAACTGGC GGAACATCTGTGGTATGGCG	405	52	10
	<i>ermC</i>	CAAACCCGTATTCCACGATT ATCTTTGAAATCGGCTCAGG	295	48	10

Kháng kháng sinh	Gen đề kháng	Prime (5' - 3')	Kích thước (bp)	Ta	Tài liệu tham khảo
<i>Tetracyclin</i>	<i>tetM</i>	GTAAATAGTGTTCCTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	576	45	10
	<i>tetL</i>	F: GTTGCGCGCTATATTCCAAA R: TTAAGCAAACCTCATTCCAGC	778	54	10
	<i>tetS</i>	F: TGGAACGCCAGAGAGGTATT R: ACATAGACAAGCCGTTGACC	660	55	10
	<i>tetK</i>	F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	718	55	10
	<i>tetO</i>	F: GATGGCATAACAGGCACAGAC R: CAATATCACCAGAGCAGGCT	614	55	10
<i>Phenicol</i>	<i>cat</i>	TGGAAACTTGGGATAGAAAAGAA AACCATCACATACCGCATGA	563	55	Nghiên cứu này
	<i>fexA</i>	GTA CTTGTAGGTGCAATTACGGCTGA CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC	1272	48	14
<i>Kháng aminoglyco- sid mức độ cao</i>	<i>aac(6')/le/ aph(2')/la</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369	55	15
	<i>aph(2'')- lb</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCCTT	867	55	15
	<i>aph(2'')- lc</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	55	15
	<i>aph(2'')- ld</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	55	15
	<i>aph(3')- llla</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	55	15
	<i>ant(6')-la</i>	ACTGGCTTAATCAATTTGGG GCCTTTCCGCCACCTCACCG	597	55	15

(*) Y, C or T; R, A or G; W, A or T

3. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập bằng Excel 2016, sau đó được xử lý và phân tích bằng SPSS 20.0

4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được Hội đồng đạo đức Trường Đại học Y Hà Nội phê duyệt theo quyết định số NCS05/ĐHYHN-HĐĐĐ ngày 29 tháng 3 năm 2019.

III. KẾT QUẢ

1. Tỷ lệ *E. faecalis* kháng fluoroquinolone

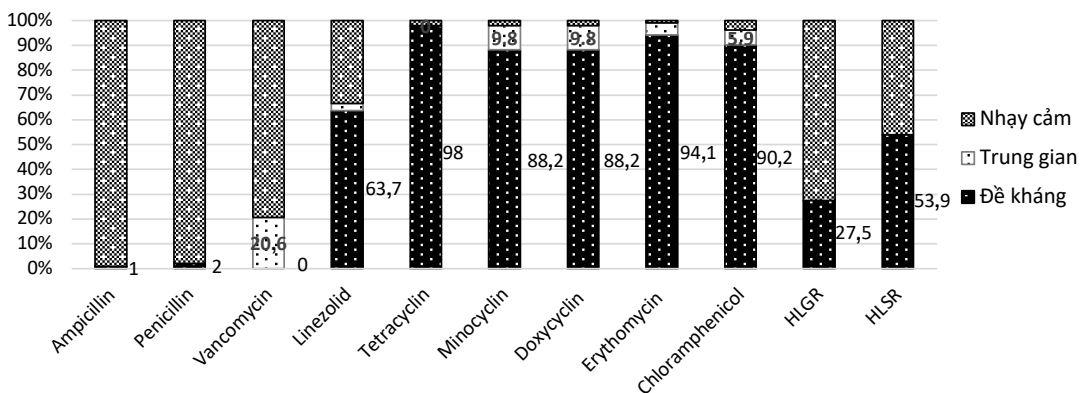
Thử nghiệm mức độ nhạy cảm với ciprofloxacin và levofloxacin trên 466 chủng *E. faecalis*, tỷ lệ kháng thu được như sau:

Bảng 2. Mức độ nhạy cảm với các kháng sinh nhóm fluoroquinolone của các chủng *E. faecalis*

Kháng sinh	Mức độ	Số lượng Tỷ lệ	Phân người (n = 82)	Phân gà (n = 121)	Ruồi (n = 183)	Thực phẩm (n = 80)	Tổng (n = 466)
Ciprofloxacin	R	n	2	28	44	17	91
		%	2,4	23,1	24	21,3	19,5
	I	n	13	28	101	49	191
		%	15,9	23,1	55,2	61,3	41,0
	S	n	67	65	38	14	184
		%	81,7	53,7	20,8	17,5	39,5
Levofloxacin	R	n	2	21	44	15	82
		%	2,4	17,4	24	18,8	17,6
	I	n	0	5	81	2	88
		%	0	4,1	44,3	2,5	18,9
	S	n	80	95	58	63	296
		%	97,6	78,5	31,7	78,8	63,5

Tỷ lệ kháng ciprofloxacin của *E. faecalis* là 19,5%, kháng levofloxacin là 17,6%. Có 20 chủng chỉ kháng ciprofloxacin, 11 chủng chỉ kháng levofloxacin và 71 chủng kháng cả với 2 loại kháng sinh này. Như vậy, tỷ lệ phân lập được *E. faecalis* kháng fluoroquinolone trong nghiên cứu này là 21,9% (102/466). Ruồi là nhóm vật chủ mang quần thể *E. faecalis* kháng fluoroquinolone cao nhất.

2. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. faecalis* kháng fluoroquinolone



Biểu đồ 1. Mức độ nhạy cảm của *E. faecalis* kháng fluoroquinolone với các loại kháng sinh (HLGR: kháng gentamycin mức độ cao, HLSR: kháng streptomycin mức độ cao)

Biểu đồ 1 cho thấy, các chủng *E. faecalis* ngoài khả năng kháng fluoroquinolone còn có khả năng đề kháng cao với kháng sinh nhóm tetracyclin (88,2 - 98%), kháng macrolide (erythromycin 94,1%), kháng phenicol (chloramphenicol 90,2%). Đáng chú trong nghiên cứu này, tỷ lệ kháng linezolid lên tới

63,7%, không xuất hiện kháng vancomycin nhưng tỷ lệ kháng trung gian với kháng sinh này là 20,6%. 27,5% kháng mức độ cao với gentamycin, 53,9% với streptomycin. Tuy nhiên, các kháng sinh nhóm blactam như ampicillin, penicillin có tỷ lệ kháng rất thấp (chỉ 1 - 2%).

Bảng 3. Tỷ lệ các gen liên quan đến kháng kháng sinh của các chủng *E. faecalis* đề kháng

Kháng sinh	Số chủng thử nghiệm	Gen đề kháng	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
<i>Flouroquinolone</i>	464	<i>gyrA</i>	46	9,9
<i>Bơm đẩy</i>	464	<i>emeA</i>	422	90,9
<i>Linezolid</i>	65	<i>otrpA</i>	65	100
		<i>poxTA</i>	0	0
<i>Macrolide</i>	96	<i>ermA</i>	53	55,2
		<i>ermB</i>	82	85,4
		<i>ermC</i>	0	0
		<i>tetM</i>	86	86,0
<i>Tetracyclin</i>	100	<i>tetL</i>	62	62,0
		<i>tetS</i>	13	13,0
		<i>tetK</i>	21	21,0
		<i>tetO</i>	0	0
<i>Phenicol</i>	92	<i>cat</i>	61	66,3
		<i>fexA</i>	72	78,3
<i>Kháng aminoglycosid mức độ cao</i>	56	<i>aac(6')-Ie/aph(2')-Ia</i>	1	1,8
		<i>aph(2'')-Ib</i>	0	0
		<i>aph(2'')-Ic</i>	0	0
		<i>aph(2'')-Id</i>	0	0
		<i>aph(3')-IIIa</i>	55	96,5
		<i>ant(6')-Ia</i>	38	66,7

GyrA có mặt trong tổng số 46 chủng *E. faecalis*, chiếm tỷ lệ 9,9%. *emeA* là gen bơm đẩy phổ biến trong nghiên cứu này. *otrpA* xuất

hiện trên 100% chủng kháng linezolid, 85,4% chủng kháng macrolide mang *ermB*, 55,2% mang *ermA*. *Cat* và *fexA* được tìm thấy ở 66,3%

và 78,3% chủng kháng chloramphenicol. Tỷ lệ các gen liên quan kháng aminoglycosid mức độ

cao lần lượt là 96,7%, 66,7% và 1,8% đối với *aph(3')-IIIa*, *ant(6')-Ia*, *acc(6')-Ie/aph(2')-Ia*.

Bảng 4. Tỷ lệ gen *gyrA* và *emeA* trên các chủng *E. faecalis*

Gen		Ciprofloxacin						p	Levofloxacin						p
		Kháng		Trung gian		Nhạy cảm			Kháng		Trung gian		Nhạy cảm		
		n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	
<i>gyrA</i>	Có	13	28,3	33	71,7	0	0	0,00	15	32,6	16	34,8	15	32,6	0,00
	Không	77	18,4	157	37,6	184	44,0		66	15,8	71	17,0	281	67,2	
<i>emeA</i>	Có	81	19,2	171	40,5	170	40,3	0,68	73	17,3	75	17,8	274	64,9	0,78
	Không	9	21,4	19	45,2	14	33,3		8	19,0	12	28,6	22	52,4	

Tỷ lệ mang gen *gyrA* trong các chủng kháng ciprofloxacin là 14,4%, kháng levofloxacin là 18,5%. Có mối liên hệ có nghĩa thống kê của sự có mặt gen *gyrA* đối với sự đề kháng 2 loại kháng sinh này ($p = 0,00$). 341 chủng mang gen *emeA* nhưng cho kiểu hình nhạy cảm với ciprofloxacin, 349 chủng mang gen này nhạy levofloxacin. Bảng 4 cho thấy liên quan giữa sự có mặt của *emeA* và mức độ đề kháng ciprofloxacin, levofloxacin không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

IV. BÀN LUẬN

Từ những năm đầu thập kỷ 70, enterococci, trong đó chủ yếu là *E. faecalis* đã được coi là một tác nhân gây nhiễm trùng bệnh viện và đa kháng kháng sinh, đặc biệt là một số kháng sinh quan trọng trên lâm sàng như vancomycin, linezolid và fluoroquinolone. Fluoroquinolones là kháng sinh được Tổ chức Y tế Thế giới phân loại "cực kỳ quan trọng trong y học" do tác dụng của chúng trong việc điều trị nhiễm trùng gây ra bởi nhiều nguyên nhân khác nhau, bao gồm cả vi khuẩn gram dương, gram âm và vi khuẩn kỵ khí.¹⁶ Tuy nhiên, tỷ lệ kháng nhóm này có xu hướng gia tăng, không chỉ trong bệnh viện mà còn cả cộng đồng do mức độ tiêu thụ kháng

sinh.^{17,18} *E. faecalis* có mặt tại đường tiêu hóa và sự tiếp xúc với kháng sinh có thể là nhân tố kích thích sự đề kháng. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, tỷ lệ kháng ciprofloxacin là 19,1%, levofloxacin 17,6%, thường gặp nhất ở ruồi (24%), ở thực phẩm (18,8 - 21,3%) và thấp nhất ở phân người (2,4%). Tỷ lệ này có sự tương đồng với nghiên cứu của Kim M.C và Kim Y.B với các chủng phân lập từ thực phẩm nhưng thấp hơn ở các mẫu phân người.^{6,19} Tỷ lệ kháng ở gà thấp hơn so với nghiên cứu của Hung C.K và so với các nghiên cứu lâm sàng, kháng kháng sinh nhóm fluoroquinolone ở *E. faecalis* trong cộng đồng nhìn chung chưa cao.⁷ Nghiên cứu của Quế Anh Trâm trên các bệnh nhân nhiễm khuẩn tiết niệu, tỷ lệ kháng là 74,5%, của Esfahani là 97,5%.^{4,8} Tuy nhiên, điều đáng lo ngại, tất cả các chủng đều là chủng đa kháng kháng sinh. Tỷ lệ kháng cao gặp ở nhóm tetracyclin, macrolid và phenicol (> 90%), kháng aminoglycosid mức độ cao (27,5% - 53,9%), được phân lập chủ yếu ở ruồi và thực phẩm, lây truyền qua chuỗi thức ăn cảnh báo mối đe dọa to lớn đối với sức khỏe con người. Sự đề kháng này đồng thuận với nhiều nghiên cứu khác.^{20,21} Đáng chú ý, tỷ lệ kháng linezolid, một "lựa chọn cuối" đối với các vi khuẩn Gram

dương kháng vancomycin lên tới 63,7%, tỷ lệ giảm nhạy cảm với vancomycin lên tới 20,6%. Có thể thấy, mức độ đề kháng này ở cộng đồng cần được báo động, bởi nếu có sự lây lan vào bệnh viện và thu nhận các gen đề kháng với các loại kháng sinh mà hiện nó còn nhạy cảm như gen TEM quy định kháng beta-lactame (ampicillin và penicillin) thì sự đề kháng càng trở nên phức tạp và vai trò của nó với sức khỏe con người đáng lo ngại hơn.

Phân tích kiểu gen liên quan đến kháng kháng sinh của các chủng đề kháng, kết quả hầu hết phù hợp với kiểu hình. Kháng aminoglycoside trong enterococci chủ yếu là do sản xuất các enzym biến đổi aminoglycoside. Hiện nay, hơn 30 enzym biến đổi aminoglycoside đã được xác định, trong đó có chức năng sinh học là những enzym được quy định bởi các gen *aac(6')-Ia/aph(2'')-Ie*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia* và *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Id*. Sự xuất hiện các gen này trên các chủng kháng aminoglycosid mức độ cao lần lượt là 1,8%, 96,5%, 66,7% và 0% cho cả 3 gen *aph(2'')*-, cho thấy *aph(3')-IIIa* là gen phổ biến nhất. Trong nghiên cứu này, sự kháng tetracycline được quy định bởi các gen *tetM*, *tetL*, *tetK* và *tetS*, làm thay đổi điểm gắn trên ribosome, mã hóa các kênh bơm đẩy, trong đó *tetM* hoặc *tetL* hoặc phối hợp cả 2 gen này là kiểu gen kháng thường gặp. *tetM* phổ biến hơn các tet khác. Đối với macrolide, hai cơ chế được coi là chủ yếu gây kháng ở *E. faecalis* bao gồm sự thay đổi vị trí gắn qua trung gian gen *erm* và bơm đẩy nhờ gen *mef*. 75,4% chủng *E. faecalis* kháng macolide trong nghiên cứu này mang *ermB*, hơn một nửa do *ermA*, không xuất hiện *ermC*. Có 52/53 chủng mang *ermA* đồng thời mang gen *ermB*. Dữ liệu giải trình tự toàn bộ gen một số chủng kháng macrolide (kết quả không đề cập ở nghiên cứu này) mà chúng tôi đã thực hiện cho thấy *ermA* nằm chủ yếu trên plasmid, *ermB* có thể nằm ở nhiễm sắc

thể hoặc plasmid, vừa có thể lan truyền dọc, vừa có thể lan truyền ngang giải thích sự phổ biến và đồng nhiễm của các gen này. Nghiên cứu của Demigul, các chủng kháng macrolide lại chủ yếu do gen *ermC* và *ermB*.¹⁰ Sự đề kháng phenicol được ghi nhận bởi sự có mặt của 2 gen *cat* và *fexA*, trong đó 46/92 chủng kháng mang đồng thời cả 2 gen. *Cat* mã hóa protein có tác dụng acetyl hóa enzym peptidyl transferase, làm thay đổi điểm gắn của kháng sinh. Các biến thể *cat* chủ yếu là *catA-7*, liên kết với plasmid pRE25 thuộc họ Inc18, được phổ biến rộng rãi trong thực phẩm và động vật trang trại, chủ yếu là gia cầm và *catA-8*, còn gọi là *catpC223*, liên kết với plasmid pC223 được phát hiện ban đầu ở *S. aureus*, tuy nhiên hiện nay chủ yếu ở *E. faecalis* từ lợn. Gen này xuất hiện song song với các gen *tetM* và *tetL* bên trong transposon Tn6245. Dấu vết của transposon này đã được quan sát thấy trong các plasmid mang *fexA* và *optrA* cho thấy nguy cơ tiềm ẩn về sự đa kháng.²²

Linezolid là một chất kim khuẩn có hoạt tính rộng đối với vi khuẩn gram dương. Các cơ chế kháng linezolid được biết đến bởi sự đột biến trong gen mã hóa rRNA 23S ribosome, sự có mặt của các gen *otrA*, *poxtA* và *cfp*. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, các chủng kháng linezolid đều mang gen *otrA*, không có chủng mang gen *poxtA*. Nghiên cứu trên các chủng *E. faecalis* có nguồn gốc từ lợn, đất đai, dụng cụ và người trong các trang trại chăn nuôi, gen kháng oxazolidinone và phenicol *poxtA*, *optrA* và *fexA* được phát hiện ở *E. faecalis* với tỷ lệ tương ứng là 100%, 85,7% và 67,9%. Tỷ lệ các gen này ở *E. faecium* lần lượt là 100%, 60% và 80%. Nồng độ ức chế tối thiểu của linezolid trong các chủng nghiên cứu nằm trong khoảng từ 2 - 12 mg/L, trong khi kết quả của chúng tôi dao động từ 4 - 16 mg/L.²³ Dữ liệu giải trình tự toàn bộ gen chỉ ra rằng *fexA* nằm gần phía trên *optrA* trong

plasmid AD582 giải thích kiểu hình đề kháng đồng thời cả linezolid và phenicol. Có thể việc sử dụng phenicol trên động vật đã gây nên áp lực thu nhận *fexA*, do đó nhận được *optrA*, lý giải tỷ lệ cao *E. faecalis* kháng linezolid. Kháng vancomycin không được phát hiện trong nghiên cứu, tuy nhiên, đối chiếu với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi, trong số 102 chủng *E. faecalis* kháng fluoroquinolone, có 5 chủng mang gen *vanC₁/van C₂* với MIC vancomycin từ 8 – 16 mg/L, quy định tính kháng trung gian với loại kháng sinh này. Có thể, sự hiện diện của một lượng D-Ala-D-Ala cao hơn so với D-Ala-D-Ser giải thích cho mức độ kháng chưa cao của các chủng mang *vanC*.

GyrA được phát hiện trong 46 chủng *E. faecalis* sử dụng trong nghiên cứu. Phân bố của *gyrA* gặp ở 13 chủng kháng (28,3%), 33 chủng nhạy cảm hoặc kháng trung gian với ciprofloxacin. Dữ liệu này đối với levofloxacin là 32,6% và 67,4%. Sự có mặt của *gyrA* nhưng không biểu hiện tính kháng đã được đề cập đến.¹⁰ Phân tích mối liên quan giữa *gyrA* và khả năng đề kháng cho thấy, *gyrA* có mối liên hệ có ý nghĩa thống kê đối với sự đề kháng 2 kháng sinh thử nghiệm. Các nghiên cứu về kháng fluoroquinolone mức độ cao chứng minh, đột biến của *gyrA* Ser83Phe và *parC* Ser80Leu hoặc Ser83Arg/Ile, Glu87Lys/Gly ở *gyrA*, Ser80Ile ở *parC*... là các nhân tố quy định tính kháng.^{7,24} Như vậy, có thể các chủng mang gen *gyrA* nhưng không kháng quinolone trong nghiên cứu này của chúng tôi có thể không mang các đột biến này, cần những phân tích sâu hơn để làm sáng tỏ. Gen *emeA*, một gen bơm đẩy kháng sinh tương tự như *norA* ở *S. aureus*, liên quan đến sự đa kháng của các loài *E. faecalis*. *EmeA* có mặt ở 90,9% các chủng *E. faecalis* nói chung, 19,2% phân bố ở các chủng kháng ciprofloxacin, 17,3% ở các chủng kháng levofloxacin. Vai trò của *emeA* đối với sự

đề kháng fluoroquinolone đã được chứng minh. Trên các chủng kháng nhưng không mang đột biến ở *gyrA* và *parC*, mức độ biểu hiện của gen này cao hơn so với các chủng kháng và mang gen đột biến. Khi *emeA* bị ức chế, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của ciprofloxacin giảm đi 16 lần ở các chủng biểu hiện mức độ cao và 2 đến 4 ở các chủng biểu hiện ở mức độ thấp.⁷ Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Jia W trên các chủng *E. faecalis* phân lập từ lâm sàng.¹¹ Tuy nhiên, trong nghiên cứu này của chúng tôi, *emeA* phân bố rộng rãi trên các chủng *E. faecalis* phân lập được và do đó, không có mối liên quan có ý nghĩa thống kê đối với khả năng đề kháng fluoroquinolone, tương tự một nghiên cứu về các chủng *E. faecalis* kháng fluoroquinolone phân lập được từ bệnh nhân nhiễm khuẩn tiết niệu.⁸ Có lẽ, mức độ biểu hiện của gen *emeA* đối với sự đề kháng fluoroquinolone còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác.

V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ *E. faecalis* kháng fluoroquinolone phân lập trong cộng đồng thấp hơn so với các nghiên cứu lâm sàng, tuy nhiên, chúng đều là vi khuẩn đa kháng kháng sinh với sự có mặt đa dạng của các gen đề kháng. Trong các chủng đề kháng fluoroquinolone, kháng linezolid chiếm tỷ lệ cao và đáng báo động. Gen *gyrA* liên quan đến sự đề kháng ciprofloxacin và levofloxacin. *EmeA* phổ biến trong các chủng phân lập được giải thích sự đa kháng của *E. faecalis* trong cộng đồng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này nhận được tài trợ kinh phí của đề tài “Phân tích quần thể gen kháng kháng sinh và mối liên quan đến tỷ lệ vi khuẩn mang gen NDM và MCR-1 kháng kháng sinh từ các ổ chứa ở cộng đồng tại tỉnh Hà Nam, Việt Nam” (Mã số 108.02-2017.320) của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED)

và sự hỗ trợ của tập thể khoa Vi khuẩn viện Vệ sinh dịch tễ trung ương. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Diane S. Daniel SML, Han M. Gan et al. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. *Journal of Infection and Public Health*. 2017; 10: 617-623.
2. Gaglio R, NC, CM. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2016; 236 (2016): 107-114.
3. Hamideh Askari LF, Hamid Reza Pordeli et al. Frequency Distribution of Fluoroquinolones-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates from Patients with Prostatitis in Golestan Province, Iran. *Medical Laboratory Journal*. 2019; 13(4): 29-33.
4. Tram QA, và cs. Nghiên cứu đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn Gam dương gây nhiễm khuẩn tiết niệu tại Bệnh viện Hữu nghị đa khoa Nghệ An. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2022; Số 1: 257-261.
5. Oyamada Y, H. Ito, M. Inoue, Yamagishi. aJ. Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 1395-1401.
6. Kim MC, and G. J. Woo. Characterization of antimicrobial resistance and quinolone resistance factors in high-level ciprofloxacin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates obtained from fresh produce and fecal samples of patients. *J Sci Food Agric*. 2016; 97: 2858-2864.
7. HC Kuo, CC Chous, CD Chang, al e. Characterization of Quinolone-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates from Healthy Chickens and Pigs in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2009; 17(6): 443-450.
8. Esfahani S, Ahmadrajabi R, al HMe. Co-Incidence of Type II Topoisomerase Mutations and Efflux Expression in High Fluoroquinolone Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Urinary Tract Infection. *Infection and Drug Resistance*. 2020; 13: 553-559.
9. CLSI. M100-ED31:2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition. 2021; 31.
10. Demirgöl F, Tuncer Y. Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry-Fermented Sausage. *Korean J Food Sci Anim Resou*. 2017; 37(5): 670-681.
11. Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species: A Hospital-Based Study in China. *International journal of environmental research and public health*. 2014; 11(3): 3424-3442.
12. Wang Y LY, Cai J, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin.. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(8): 2182-2190.
13. Jennifer K. Bender, Carola Fleige, Ingo Klare, Werner G. Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes *cf*, *optrA* and *poxTA* in enterococci of clinical origin. *Journal of Microbiological Methods*. 2019; 160: 101-103.
14. Corinna Kehrenberg, Schwarz S. Florfenicol-Chloramphenicol Exporter Gene *fexA* Is Part of the Novel Transposon Tn558. *ASM Journals/Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 813-815.
15. Fakhri Haghi, Vahid Lohrasbi, Zeighami

H. High incidence of virulence determinants, aminoglycoside and vancomycin resistance in enterococci isolated from hospitalized patients in Northwest Iran. *BMC Infectious Diseases*. 2019; 19: 744.

16. WHO. 19th WHO model list of essential medicines (April 2015). 2015; WHO, Geneva.

17. Jochen Schulz, Nicole Kemper, Hartung J, al e. Analysis of fluoroquinolones in dusts from intensive livestock farming and the co-occurrence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 2019; 9: 5117.

18. Jiyeun Kate Kim, Ki Yup Nam, In Young Chung, et al. Emerging *Enterococcus* isolates in postoperative endophthalmitis by selection pressure of fluoroquinolones: An 11-year multicenter and experimental study. *Emerging Microbes & Infections* 2020; 9(1): 1892-1899.

19. KIM YB, SEO HJ, SEO KW, et al. Characteristics of High-Level Ciprofloxacin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Retail Chicken Meat in Korea. *Journal of Food Protection*. 2018; 81(8): 157-1363.

20. Tanih GN. Genotypic and Phenotypic

characterization of enterococci from cow dung and environmental water sources in three selected dairy farms in Amathole District. *University of Fort Hare, South Africa*. 2016;

21. N. Ünal ŞA, and M. Yildirim. Antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from broiler cloacal samples. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 2017; 41(2): 199-203.

22. He T SY, Schwarz S, et al. Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. . *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71: 1466-1473.

23. Young-Hee Jung, Min-Hyeok Cha, Gun-Jo Woo, Chi. Y-M. Characterization of oxazolidinone and phenicol resistance genes in non-clinical enterococcal isolates from Korea. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2021; 24: 363-368.

24. sSu R, Peng Y, Wang Z, Wu HYaQ. Identification of two novel type II topoisomerase mutations in *Enterococcus spp.* isolated from a hospital in China. *Arch Biol Sci*. 2021; 73(3): 407-414.

Summary

CHARACTERISTICS OF FLUOROQUINOLONE RESISTANT *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLATES OBTAINED FROM HUMANS, ANIMALS AND FOOD

Enterococcus faecalis is a common opportunistic pathogen in hospitals and the community. Due to its prevalence in variety of environments and resistance to many antibiotics, *E. faecalis* is an important bacterium to study. Fluoroquinolone is a group of antibiotics that is widely used in clinical practice, especially for treating urinary tract infections caused by gram-positive *E. faecalis*. The use of fluoroquinolones in hospitals and in livestock has increased the likelihood of resistant colonies which can be transmitted. This study assessed the characteristics of antibiotic resistance of *E. faecalis* in 466 strains of *E. faecalis* isolated from human, chicken, flies and food. The rate of resistance to ciprofloxacin was 19.5% and to levofloxacin was 17.6%. The susceptibility test of fluoroquinolone-resistant strains to other antibiotics showed high rates of resistance to macrolides, phenicol, tetracycline (> 90%), high level aminoglycoside (27.5% - 53.9%) and linezolid (63.7%). Resistance to penicillin and ampicillin were rare. Genes associated with antibiotic resistance were *gyrA* (present in 14.4% of ciprofloxacin-resistant strains and 18.5% of levofloxacin-resistant strains), *emeA*, *ermA*, *ermB*, *cat*, *fexA*, *tetM*, *tetL* and *tetK*. All linezolid-resistant strains carried *optrA* but *poxtA* is absent. High-level aminoglycoside-resistant strains identified contained *aac(6')*-*le/aph(2'')*-*Ia*, *aph(3')*-*IIIa*, *ant(6')*-*Ia*. The gene responsible for the exfflux pumps, *emeA*, was widely present in *E. faecalis* strains but did not have a statistically significant association with the level of fluoroquinolone resistance.

Keywords: *E. faecalis*, fluoroquinolone, antibiotic resistance.