

ĐẶC ĐIỂM ĐA KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN HỌ *ENTEROBACTERIACEAE* PHÂN LẬP TỪ CÁ CHÉP CẢNH (*ORNAMENTAL CARP* – KOI FISH)

Phạm Thị Hải Hà¹, Trần Lâm Ngọc², Nguyễn Thành Luân³

TÓM TẮT

Nuôi cá cảnh hiện đang được tập trung phát triển nhanh tại thành phố Hồ Chí Minh. Tuy nhiên, việc sử dụng rộng rãi thuốc kháng sinh để phòng và điều trị bệnh động vật thủy sản nói chung và bệnh cá cảnh nói riêng đã dẫn đến sự xuất hiện các loài vi khuẩn kháng nhiều loại kháng sinh. Trong nghiên cứu này, các loài vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* phân lập từ cá chép cảnh (*Ornamental carp* - koi fish) có dấu hiệu mắc bệnh được đánh giá đặc điểm đa kháng kháng sinh và dự đoán vị trí gen kháng (ARGs) thông qua thử nghiệm xử lý loại bỏ plasmid (plasmid curing). Dựa vào kết quả giải trình tự 16s rRNA, các chủng vi khuẩn có kiểu hình β -hemolysis (5/27) được định danh lần lượt là *Vibrio cholerae* (B2), *Citrobacter freundii* (B4), *Klebsiella aerogenes* (M6), *Escherichia coli* (M7) và *Klebsiella pneumonia* (M8). Chỉ số đa kháng (MAR) với 15 nhóm và 30 loại kháng sinh khảo sát của các chủng vi khuẩn là 0,2 - 0,3. Quan trọng hơn, 6 loại kháng sinh đang sử dụng tại trang trại gồm ampicillin, erythromycin, ciprofloxacin, doxycycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, và tetracycline đều bị kháng ít nhất bởi một chủng vi khuẩn. Đặc biệt sau khi xử lý plasmid, các chủng vi khuẩn tiếp tục thể hiện khả năng kháng với các kháng sinh được sử dụng tại trại cá, và 3/5 chủng vi khuẩn phân lập thể hiện khả năng giảm kháng kháng sinh. Tóm lại, vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* phân lập được từ cá chép cảnh có thể mang cơ chế kháng kháng sinh qua nhiễm sắc thể và thông qua trung gian plasmid. Các nghiên cứu tiếp theo cần xác định các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến khả năng di chuyển của các plasmid và các ARGs vào bộ gen, cũng như giữa các loài trong cùng hệ sinh thái để có những hiểu biết quan trọng về xu hướng kháng kháng sinh của các mầm bệnh.

Từ khóa: cá chép cảnh, *Enterobacteriaceae*, kháng sinh đồ, xử lý plasmid.

Characteristics of multi-antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from *Ornamental carp* (koi fish)

Pham Thi Hai Ha, Tran Lam Ngoc, Nguyen Thanh Luan

SUMMARY

Ornamental fish culture is rapidly expanding in Ho Chi Minh City. However, the increased use of antibiotics to prevent and cure aquatic animal disease, in general and ornamental fish disease, in particular recently has resulted in the emergence of bacteria resisting to multi-antibiotics. In this study, the *Enterobacteriaceae* isolated from the diseased *Ornamental carp* (koi fish) were assessed for multi-antibiotic resistance characteristics and guessing the position of resistant genes (ARGs) by using a plasmid curing test. Based on 16s rRNA sequencing data, the bacterial isolates with the β -hemolysis phenotype (5/27) were identified, such as: *Vibrio cholerae* (B2), *Citrobacter freundii* (B4), *Klebsiella aerogenes* (M6), *Escherichia coli* (M7), and *Klebsiella pneumonia* (M8). The indicator of multi-resistance (MAR) of bacterial strains with 15 groups and 30 investigated antibiotics was 0.2 - 0.3. Especially, six antibiotics used in the farm including ampicillin, erythromycin, ciprofloxacin, doxycycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, and tetracycline were resisted by at least one bacterial strain. After plasmid curing, the bacterial strains continue showing multi- resistance ability with antibiotics used in the fish farm, and three out of five

¹. Viện Kỹ thuật công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Tp. HCM

². Viện Đào tạo sau đại học HUTECH, Đại học Công nghệ Tp. HCM

³. Phòng Khoa học công nghệ và Hợp tác quốc tế, Đại học Công nghệ Tp. Hồ Chí Minh

isolates exhibited the reduction of antibiotic resistance. Our findings revealed that *Enterobacteriaceae* isolated from the *Ornamental carp* may carry antibiotic resistance mechanism through chromosomes and plasmids. Further study is needed to examine the environmental factors affecting to the moving ability of plasmids and ARGs into genome, as well as among the species in the same ecosystem in order to have the important understandings on antibiotic resistance trend of the pathogens.

Keywords: *Ornamental carp*, *Enterobacteriaceae*, antibiogram, plasmid curing.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nhiều chủng loại cá cảnh được ưa chuộng hiện nay, cá chép koi (*Cyprinus carpio* koi) được xem là dòng cá chép cảnh khá phổ biến tại Việt Nam, không chỉ là cá cảnh, sau khi chọn lọc, chép koi con còn được dùng như thức ăn cho các loài cá khác nên còn được gọi là chép mồi. Tuy nhiên, đã có báo cáo về nhiễm trùng mạn tính do vi khuẩn và khả năng kháng kháng sinh liên quan ở các loài cá cảnh như cá chép koi và cá vàng (Hatha và cs., 2012). Các yếu tố di truyền di động (MGE) như plasmid và transposon được tích hợp với các integrons hoặc gen cassettes là một trong những thành phần trung gian quan trọng trong việc lan truyền đặc tính kháng thuốc kháng sinh (Preena P.G., 2020). Do đó, mầm bệnh chứa MGE có vai trò như một ổ chứa tiềm năng gây nên sự đề kháng kháng sinh và nên được đánh giá thường xuyên trong các hệ thống nuôi trồng thủy sản (Verner-Jeffreys, 2009).

Các vị trí của ARG, cho dù nằm ở plasmid hay nhiễm sắc thể, trong các chủng vi khuẩn có thể được phát hiện thông qua thử nghiệm xử lý plasmid (Letchumanan và cs., 2015). Hồ sơ plasmid và kháng sinh đồ của các họ *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. và *Aeromonas* sp. ở cá chép koi đã được lập (Lũ và cs., 2016). Tuy nhiên, các nghiên cứu về xử lý plasmid của các nhóm vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* liên quan đến cá chép koi vẫn chưa được nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* có kiểu hình ly giải hồng cầu β phân lập từ cá chép koi được kiểm tra các đặc điểm về kháng sinh đồ trước và sau khi xử lý plasmid để tìm hiểu phương thức kháng thuốc kháng sinh cũng như phát triển các chiến lược

kiểm soát bệnh thủy sản và khả năng truyền nhiễm sang các loài sinh vật khác.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm và thời gian thí nghiệm

Trong nghiên cứu này, các bước phân lập, nuôi cấy, thử nghiệm độ nhạy kháng sinh và độc lực của các chủng vi khuẩn được thực hiện tại phòng thí nghiệm Thú y, Viện Khoa học ứng dụng HUTECH, Trường Đại học Công nghệ Tp.HCM từ tháng 1/2021 đến tháng 4/2022.

2.2. Đối tượng thí nghiệm

Trong thí nghiệm đánh giá vi khuẩn đa kháng phân lập từ cá chép Koi Việt Nam (*C. carpio* koi) (n = 5) có dấu hiệu lơ dờ, gần chết được thu từ trang trại cá giống Châu Tổng, quận 12, TP.HCM vào tháng 2 năm 2021; các mẫu gan, thận, lách và mang của mẫu cá và các mẫu nước (Nước đầu vào, nước thải và nước hồ nuôi) được thu nhận vô trùng và cấy lên đĩa môi trường Brain-Heart infusion agar (BHIA, Himedia, India), và MacConkey agar (Himedia, India). Đĩa cấy được ủ 24 giờ ở 28°C.

2.3. Phân lập và định danh vi khuẩn

Vi khuẩn phát triển trên môi trường thạch BHIA và MacConkey được làm thuần và kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản như: nhuộm gram, tính di động, oxidase, catalase, khả năng tan huyết. Ngoài ra, thử nghiệm thủy phân gelatin và phosphatase cũng được tiến hành. Vi khuẩn được định danh dựa vào trình tự gen 16S rRNA phân tích tại phòng thí nghiệm công ty KTEST, Bình Chánh. Các vi khuẩn được bảo quản trong môi trường TSA + 15% glycerol, -80°C. Các vi khuẩn được tăng sinh trên TSA 24 giờ, 28°C trước khi sử dụng cho thử nghiệm sau.

2.4. Đánh giá khả năng đa kháng

Thử nghiệm độ nhạy với kháng sinh được thực hiện trên môi trường thạch Muller-Hinton Agar (HiMedia, Ấn Độ) theo phương pháp khuếch tán đĩa kháng sinh của Kirby-Bauer với các khoanh giấy kháng sinh được mua từ công ty Nam Khoa Biotek. Trên đĩa thạch trải đều vi khuẩn (10^8 CFU/ml, theo hướng dẫn của CLSI 2006), đặt các khoanh giấy kháng sinh lên và ấn nhẹ (Tối đa 6 khoanh trong 1 đĩa). Các loại kháng sinh khảo sát trong nghiên cứu này bao gồm amoxicillin, ampicillin, piperacillin/tazobactam, cephalexin, cefuroxime, cefoxitin, cefotaxime/clavulanic acid, cefoperazone, ceftriaxone, cefepime, imipenem, meropenem, amikacin, tobramycin, streptomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, nalidixic acid, tetracycline, doxycycline, nitrofurantoin, trimethoprim/sulfamethoxazol, azithromycin, erythromycin, vancomycin, chloramphenicol, polymyxin B và colistin. Sau đó, các đĩa thạch được ủ 24 giờ ở 28°C và đường kính vòng kháng được đo, đánh giá theo các tiêu chí của CLSI (2012).

2.5. Thử nghiệm loại bỏ plasmid

Các mẫu được nuôi cấy riêng lẻ trên môi trường dinh dưỡng được bổ sung các khoảng ethidium bromide (EB) khác nhau (0,2–2 mg/

mL) và được đặt trong tủ ẩm lắc qua đêm ở nhiệt độ phòng (Letchumanan và cs., 2015). Nồng độ nuôi cấy cao nhất vẫn cho phép vi khuẩn phát triển trên đĩa thạch dinh dưỡng sẽ được dùng trong nghiên cứu (J.T. Trevors, 1985). Để xác minh những thay đổi trong biểu đồ kháng sinh đồ sau khi xử lý EB, các thử nghiệm tính nhạy cảm với kháng sinh được lặp lại đối với các chủng kháng. Chỉ số MAR của các chủng kháng thuốc được tính toán lại.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm vi khuẩn phân lập từ các mẫu cá chép cảnh

Dựa trên đặc điểm ngoại hình và khuẩn lạc, 27 phân lập được tách ra và nuôi cấy để phục vụ các kiểm tra sâu hơn. Các thử nghiệm về kiểu hình cho thấy hầu hết các chủng phân lập được đều là vi khuẩn gram âm (18/27). Các phân lập thu nhận từ nguồn nước nuôi có chứa các cầu khuẩn gram âm về cơ bản có hình thái giống với các phân lập vi khuẩn thu nhận từ các cơ quan cá và có thể là nguyên nhân dẫn đến mức độ cao của các loài vi khuẩn gram âm nhiễm trong các cơ quan của cá. Các chủng có khả năng ly giải hồng cầu thuộc họ *Enterobacteriaceae* bao gồm B2, B4, M6, M7 và M8 (β -hemolysis) (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm lý, hóa của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá cảnh (*C. carpio koi*)

STT	Mã số phân lập	Gram	Nguồn gốc	pH			NaCl (%)			MIL			Hemolysis
				2	4	10	2	4	8	M	L	I	
1	B2	Trực (–)	Gan	–	–	+	+	+	–	+	–	+	β
2	B4	Song cầu (–)	Thận	–	–	+	+	+	–	+	–	+	β
3	M6	Cầu (–)	Mang	–	–	+	+	+	–	–	+	+	β
4	M7	Cầu (–)	Nước hồ	–	–	+	+	+	–	–	–	+	β
5	M8	Cầu (–)	Nước hồ	–	–	+	+	+	–	–	–	+	B

Ghi chú: MIL: môi trường nuôi cấy xác định tính di động (motility), sinh indole và lysine

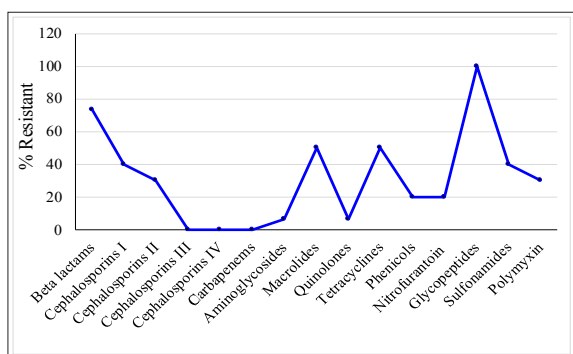
Kết quả giải trình tự 16S rRNA cho thấy phân lập B2 tương đồng với *Vibrio cholerae* (99,92%), B4 tương đồng với *Citrobacter freundii* (99,45%), M6 tương đồng với

Klebsiella aerogenes (99,76%), M8 tương đồng với *Klebsiella pneumoniae* (99,67%), và đặc biệt M7 có sự tương đồng (99,13%) với *Escherichia* sp., *Shigella boydii*, *Shigella*

flexneri và cả *Escherichia fergusonii* khi so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank. Mỗi quan hệ phát sinh loài giữa các vi khuẩn phân lập từ cá chép cảnh cho thấy chúng có thể đóng vai trò trung gian gây bệnh và phát tán gen kháng kháng sinh và gen độc lực giữa các loài thủy sản. Dữ liệu trình tự đăng ký trên NCBI với mã số OM943781 – OM943784, OM943787.

3.2. Kết quả kháng sinh đồ

Trong nghiên cứu này, 30 loại kháng sinh được chọn để đánh giá khả năng kháng kháng sinh của 5 phân lập vi khuẩn (đã được định danh) theo phương pháp Kirby-Bauer (Bauer và cs., 1966). Ngoài ra, để hiểu rõ hơn khả năng lan truyền và phát tán các gen kháng kháng sinh (ARG), các phân lập vi khuẩn được xử lý loại bỏ plasmid bằng phương pháp của Letchumanan và cs. (2015).



Hình 1. Biểu đồ thể hiện tỷ lệ kháng kháng sinh của 5 phân lập vi khuẩn với 15 họ kháng sinh trong nghiên cứu này

Theo ghi nhận tại thời điểm lấy mẫu, ampicillin, erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline, sulfamethoxazole/ trimethoprim, và doxycycline là những loại kháng sinh được sử dụng để điều trị khi có cá bệnh và chết xảy ra ở trại cá. Do đó, việc lập hồ sơ kháng sinh đồ được thực hiện bằng cách sử dụng tối đa lượng kháng sinh để có thể đề xuất (lựa chọn) thuốc kháng sinh thích hợp cho người nông dân/quản lý trại. Trong số 15 lớp kháng sinh được thử nghiệm, các chủng phân lập từ cá chép cảnh thể hiện khả năng kháng tối đa là 12

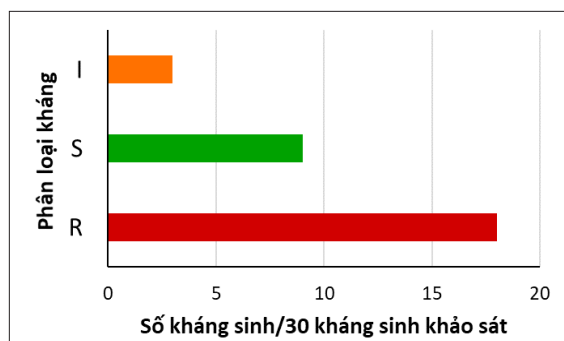
lớp. Hơn 73% và 100% các phân lập vi khuẩn từ cá chép cảnh được quan sát thấy có khả năng kháng lại kháng sinh khảo sát (cefalexin và cephalothin) thuộc nhóm β -lactam và glycopeptide (hình 1). Kết quả này cho thấy tỷ lệ kháng cao hơn so với nghiên cứu của Preena và cs. (2020) khi hầu hết các kháng sinh thuộc nhóm β -lactam và glycopeptides (vancomycin) được nhận thấy là không có hiệu quả đối với 57% các phân lập trên cá vàng. Tương tự, kháng sinh nhóm tetracyclines và macrolides cũng không có hiệu quả đối với hơn 50% các phân lập từ cá chép cảnh trong nghiên cứu này. Cephalosporins thế hệ I và sulfonamides cho kết quả kháng 40% các phân lập, điều này khác biệt với báo cáo của Preena và cs. (2020) về cephalosporin thế hệ I không hiệu quả đối với các dòng phân lập từ cá koi, nhưng tương đồng với tỷ lệ kháng sulphonamide (trimethoprim) và glycopeptide (bacitracin) đối với 45% các phân lập từ cá chép koi.

Trong khi đó, cephalosporin thế hệ thứ III và thứ IV cho thấy khả năng kháng hầu hết với các phân lập vi khuẩn từ cá chép cảnh. Kết quả này giống với nghiên cứu trước đây (Preena và cs., 2020) khi các kháng sinh như cefixime, cefotaxime và cefipime, doripenem (carbapenem), kanamycin (aminoglycoside), ciprofloxacin và norfloxacin (quinolon) có hiệu quả trong điều trị cả hai bệnh nhiễm trùng ở cá vàng và cá koi. Bên cạnh đó, phenicolis và nitrofurantoin có thể có hiệu quả 80% đối với tất cả các phân lập và kháng sinh lớp khác (cefotaxime, ceftriaxone) kháng lại 70% các phân lập từ cá chép cảnh. Nhìn chung, các phân lập đều thể hiện sự nhạy đối với các kháng sinh cephalosporin thế hệ III trở đi.

3.2. Kết quả chỉ số đa kháng - MAR

Tỷ lệ phần trăm các phân lập kháng kháng sinh (AMR) theo phương pháp của Viện tiêu chuẩn xét nghiệm lâm sàng (CLSI, 2012) được phân tích và trình bày trong hình 2. Kết quả cho thấy các phân lập thể hiện đặc điểm nhạy kháng sinh (S) 56,67 - 70%; kháng trung gian (I) 3,33

- 10% và kháng (R) 23 - 30% trong tổng số 30 loại kháng sinh khảo sát. 18/30 kháng sinh khảo sát có thể bị vi khuẩn phân lập từ cá chép cảnh kháng, 9/30 kháng sinh có hiệu quả tiêu diệt/ức chế các phân lập vi khuẩn, và 3/30 kháng sinh thể hiện khả năng kháng trung gian. Quan trọng hơn, kết quả phân tích kháng sinh đồ cho thấy các chủng đều thuộc chủng đa kháng (kháng 2 loại kháng sinh trở lên), các phân lập vi khuẩn thể hiện đề kháng với ít nhất là 6 loại kháng sinh và cao nhất là 10 loại kháng sinh. Cụ thể, từ biểu đồ thể hiện tỷ lệ kháng ở hình 2, *C. freundii* B4 và *K. pneumoniae* M8 chiếm tỷ lệ kháng cao (>30%). Tỷ lệ các phân lập vi khuẩn khảo sát kháng kháng sinh đang được sử dụng phổ biến tại trại cá là 100% đối với ampicillin, 60% đối với erythromycin và tetracycline, 40% đối với doxycycline và sulfamethoxazole/trimethoprim. Kết quả này cho thấy, có ít nhất 2 loài vi khuẩn kháng lại 6 loại kháng sinh đang được sử dụng ở trang trại. Chỉ số đa kháng MAR của các phân lập nằm ở khoảng 0,2 đến 0,3.



Hình 2. Tỷ lệ kháng đối với 30 loại kháng sinh của 5 chủng phân lập

Osundiya và cs. (2013) đã báo cáo tầm quan trọng của chỉ số MAR > 0,2 trong việc lan truyền tình trạng kháng kháng sinh thông qua việc sử dụng quá mức kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản. Chỉ số MAR của họ được tìm thấy là 0,2 và MIC cao hơn đã được nhận thấy trong các phân lập từ cá chép cảnh trong nghiên cứu này. Đặc biệt, *C. freundii* phân lập từ cá chép có chỉ số MAR là 0,33 (bảng 2), cao hơn kết quả của *C. freundii* tìm thấy trên cá vàng ít kháng thuốc nhất bằng cách

hiển thị chỉ số MAR là 0,08 trong nghiên cứu của Preena và cs. (2020), cho thấy xu hướng kháng kháng sinh đang gia tăng ở nhóm vi khuẩn đường ruột, gây thiệt hại cho cá cảnh và ảnh hưởng sức khỏe cộng đồng. Kết quả này cho thấy rằng công nghiệp nuôi trồng cá cảnh ở Việt Nam cần được quan tâm kiểm soát nhiều hơn vì chứng thực với nghiên cứu của Kathleen và cs. (2016) đã báo cáo các vi khuẩn kháng kháng sinh đa dạng như *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Edwardsiella*, *Aeromonas* và *Enterobacter* từ trang trại nuôi trồng thủy sản của Malaysia và tác động của chúng đối với sức khỏe con người. Các báo cáo về AMR ở cá cảnh làm tăng nguy cơ chuyển các gen kháng từ vi khuẩn sang môi trường thủy sinh và không thủy sinh, do đó cũng làm tăng khả năng lây nhiễm từ động vật sang người (Cizek và cs., 2010). Điều này buộc người nông dân phải hết sức lưu ý trong việc xử lý cá cảnh. Do đó, chúng tôi cho rằng nhà chức trách ở Việt Nam nên đưa ra các chương trình giám sát cần thiết để giảm bớt những lo ngại về sức khỏe cộng đồng như đề xuất trong kết quả cuộc khảo sát gần đây (Weir và cs., 2012).

Nhiều báo cáo về nhiễm trùng mạn tính do vi khuẩn và khả năng kháng kháng sinh liên quan đã được nhận thấy ở các loài cá cảnh như cá chép koi và cá vàng (John và Hatha, 2012). Sử dụng kháng sinh không có quy trình và không được kiểm soát trong nuôi trồng thủy sản dẫn đến việc chọn lọc nhanh chóng các vi khuẩn kháng kháng sinh và do đó làm lan rộng tình trạng kháng kháng sinh trong toàn bộ hệ sinh thái thủy sinh (Cizek và cs., 2010). Các tác nhân gây bệnh cho cá được chứng minh là có các cơ chế kháng khác nhau đối với các loại kháng sinh khác nhau, chẳng hạn như những kháng sinh ảnh hưởng đến tổng hợp protein như tetracycline và erythromycin và những loại khác ngăn chặn sự tổng hợp vách tế bào như nhóm β -lactam (Gao và cs., 2012). Bên cạnh đó, sự xuất hiện của kháng thuốc đối với các cephalosporin thế hệ mới đặt ra những thách thức lớn trong việc

điều trị bệnh nhiễm trùng cho cá (Preena và cs., 2020). Tỷ lệ kháng kháng sinh trong mầm bệnh cá và môi trường nuôi trồng thủy sản cần

được theo dõi thường xuyên để có biện pháp hữu hiệu nhằm ngăn ngừa kịp thời các bệnh do vi khuẩn gây ra.

Bảng 2. Kết quả thay đổi hoạt động kháng kháng sinh và chỉ số đa kháng (MAR) của các phân lập vi khuẩn trước và sau khi xử lý loại bỏ plasmid**

Phân lập	Trước xử lý plasmid	Sau xử lý plasmid
<i>V. cholerae</i> B2	Kháng cefoxitin. Kháng trung gian với tobramycin, erythromycin* Nhạy streptomycin, ciprofloxacin* MAR: 0,20	Nhạy cefoxitin. Nhạy tobramycin, erythromycin* Kháng trung bình streptomycin, ciprofloxacin* MAR: 0,167
<i>C. freundii</i> B4	Kháng ampicillin, cefoxitin. Nhạy tobramycin, colistin. Kháng trung bình với erythromycin*, ciprofloxacin*, nitrofurantoin. MAR: 0,33	Kháng trung bình với ampicillin, cefoxitin. Kháng trung bình tobramycin, và kháng colistin. Kháng erythromycin*, ciprofloxacin*, nitrofurantoin. MAR: 0,4
<i>K. aerogenes</i> M6	Kháng trung bình với cefuroxime, nitrofurantoin. Kháng azithromycin. MAR: 0,267	Nhạy cefuroxime, nitrofurantoin. Nhạy azithromycin. MAR: 0,20
<i>E. coli</i> M7	Kháng trung bình với cefuroxime. Nhạy streptomycin, colistin. Kháng erythromycin*. MAR: 0,233	Nhạy cefuroxime. Kháng trung bình với streptomycin, kháng colistin. Kháng trung bình với erythromycin* MAR: 0,233
<i>K. pneumoniae</i> M8	Kháng trung bình với cefoperazone. Kháng azithromycin, colistin. MAR: 0,30	Nhạy cefoperazone. Nhạy azithromycin, colistin. MAR: 0,20

Ghi chú: * các kháng sinh được dùng tại trại cá, ** dựa trên tổng số 30 loại kháng sinh.

3.3. Chỉ số MAR của các phân lập sau khi xử lý loại bỏ plasmid

Đa kháng kháng sinh qua trung gian plasmid là một trong những vấn đề cấp bách trong điều trị các bệnh truyền nhiễm. Việc sử dụng các hóa chất xử lý plasmid có thể là một cách khả thi để loại bỏ plasmid và giảm sự lan rộng của tình trạng kháng kháng sinh được mã hóa bởi plasmid kháng kháng sinh (R-plasmid) (Molnar và cs., 2003). Plasmid curing xảy ra tự nhiên thông qua quá trình phân chia tế bào hoặc bằng cách xử lý tế bào bằng bất kỳ tác nhân vật lý hoặc hóa học (Elias và cs., 2013). Sự ức chế chuyển

giao qua quá trình tiếp hợp của R-plasmid có thể được sử dụng để ngăn chặn sự lây lan của chúng trong môi trường. Sự ức chế sao chép plasmid xảy ra trong nhiều giai đoạn khác nhau và được thể hiện rõ qua mô hình “rolling circle” (sao chép, phân vùng, và chuyển giao tiếp hợp). Đây cũng có thể là cơ sở lý thuyết để loại bỏ độc lực của vi khuẩn trong trường hợp gây bệnh qua trung gian plasmid và kháng kháng sinh (Brüssow và cs., 2004). Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy ngoài phân lập *E. coli* M7, các chủng phân lập đều có sự thay đổi chỉ số MAR sau khi xử lý plasmid và $MAR > 0,2$. Cụ thể, 3/5 phân lập biểu hiện sự giảm chỉ số MAR bao

gồm *V. cholerae* B2, *K. aerogenes* M6, và *K. pneumoniae* M8, trong khi đó *C. freundii* B4 có xu hướng tăng chỉ số MAR (0,4).

Chỉ số có MAR > 0,2 sau khi xử lý loại bỏ plasmid cho thấy rằng các phân lập vi khuẩn từ cá chép cảnh biểu hiện các cơ chế kháng kháng sinh thông qua hoạt động biểu hiện của các ARG qua trung gian plasmid, đơn lẻ và/hoặc kết hợp với nhiều yếu tố quyết định tính kháng kháng sinh qua trung gian nhiễm sắc thể. Điều này cho thấy các vi khuẩn trong môi trường cá cảnh đã tiếp nhận các cơ chế đề kháng khác nhau để chống lại tác dụng của kháng sinh, đặc biệt là sự chuyển gen theo chiều ngang tạo điều kiện thuận lợi cho việc chuyển giao và trao đổi vật chất di truyền giữa các tế bào vi khuẩn. Việc thu nhận các gen mới được chuyển có thể có những tác động có hại đối với tế bào nhận do nhiều lý do khác nhau, từ kết quả của việc tích hợp DNA ngoại lai vào bộ gen đến sự biểu hiện và chức năng thích hợp của sản phẩm protein trong tế bào. Có thể giảm thiểu khả năng phá vỡ cấu trúc nhiễm sắc thể nếu gen được chuyển giao và biểu hiện từ các yếu tố di truyền ngoài nhiễm sắc thể như plasmid. Tuy nhiên, biểu hiện ARG từ một locus plasmid có thể đi kèm với kết quả sống còn cho tế bào chủ do nhiều lý do khác. Ví dụ, cơ chế kháng dựa vào sự bất hoạt của kháng sinh có thể yêu cầu mức sử dụng năng lượng (ATP) thấp hơn của tế bào so với các hệ thống bơm dòng chảy (Turner và cs., 2014).

Hiệu quả của các phương pháp xử lý plasmid phụ thuộc vào bản chất của vật chủ vi khuẩn và/hoặc plasmid (Ghosh và cs., 2000). Việc loại bỏ plasmid đối với *E. coli*, *Vibrio*, *A. hydrophila* và các vi khuẩn thủy sản khác đã được báo cáo trong nghiên cứu trước đây (Letchumanan và cs., 2015; Majumdar và cs., 2007). Sự mất plasmid trong các tế bào *E. coli* được xử lý bằng EB dẫn đến sự biến mất của các thành phần màng ngoài và đồng thời làm thay đổi độ dày

của lớp peptidoglycan (Rosas và cs., 1983). Một phương pháp nhanh chóng, đơn giản và hiệu quả để chữa một loạt các plasmid kháng kháng sinh *Escherichia coli* đã được mô tả trước đây (Thomas và Kay, 1984), và phương pháp này liên quan đến việc xử lý bằng acridine orange, tiếp theo là tăng nồng độ kháng sinh dưới mức gây chết và chọn lọc bằng penicillin. Các điều kiện ức chế vi khuẩn như vậy dẫn đến hiệu quả xử lý hơn 98% trong tất cả các trường hợp được thử nghiệm (Chin và cs., 2005).

Trong nghiên cứu này, khả năng kháng kháng sinh đối với phần lớn các kháng sinh ở các phân lập vi khuẩn thay đổi không đáng kể sau khi xử lý bằng plasmid, ngoại trừ *V. cholerae* B2. Chỉ số MAR của *C. freundii* B4 đã được thay đổi từ 0,33 thành 0,40 và *E. coli* M7 giữ nguyên là 0,233. Quan trọng hơn, các phân lập sau khi xử lý plasmid vẫn tiếp tục thể hiện khả năng kháng với các kháng sinh được sử dụng phổ biến tại trại cá, điều này cho thấy sự tồn tại cơ chế kháng kháng sinh qua nhiễm sắc thể. Bên cạnh đó, 3/5 phân lập thể hiện khả năng kháng kháng sinh giảm sau khi xử lý plasmid, cho thấy khả năng phát tán ARG thông qua trung gian plasmid của các vi khuẩn từ cá chép cảnh. Ví dụ, một trong những tác nhân lây nhiễm đáng kể ở cá (Faja và cs., 2019) là các vi khuẩn thuộc giống *Vibrio* nổi tiếng với khả năng tăng cường thu nhận và trao đổi ARG, và đặc biệt xuất hiện các loài *Vibrio* thủy sản, như *V. cholerae*, tiềm ẩn nguy cơ gây bệnh cho người, cũng như *E. coli* (Letchumanan và cs., 2015). Kết quả tìm thấy trong nghiên cứu này tạo ra nhận thức về việc giám sát thường xuyên AMR trong hệ thống nuôi trồng cá cảnh để khắc phục mối đe dọa.

Dựa trên quan điểm về vi khuẩn, việc tập hợp các gen kháng thuốc trên plasmid tạo điều kiện thuận lợi cho việc đề kháng đồng thời và đáng kể đối với nhiều loại kháng sinh. Tuy nhiên, trong điều kiện tiến hóa gặp cản trở “nghịch lý plasmid” phản ánh

giả định rằng hiệu quả sao chép và duy trì plasmid được xác định chính xác trên vật chủ chỉ được bù đắp trong những điều kiện mà plasmid mang lại lợi thế chọn lọc một cách rõ ràng, chẳng hạn như khi có kháng sinh (MacLean và San Millan, 2015). Trong những điều kiện như vậy, plasmid được xem như một chất cộng sinh; trong trường hợp không có chúng, plasmid là một loại ký sinh trùng. Do đó, sẽ có lợi cho các gen kháng thuốc di chuyển đến nhiễm sắc thể. Nghiên cứu thử nghiệm gần đây về mối quan hệ giữa plasmid-vật chủ, Harrison và cs. (2015) cho biết hệ số tiến hóa plasmid-tế bào chủ và các đột biến bù trừ có thể làm giảm hiệu quả duy trì plasmid và tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiếp tục vận chuyển các gen kháng và vật liệu di truyền khác trên các plasmid vector. Những phát hiện này cũng có ý nghĩa đối với sự di chuyển của các plasmid vào vật chủ mới (Porse và cs., 2016); do đó hiệu quả di chuyển của các gen kháng kháng sinh trong bộ gen, trong các loài và trong quần xã vi sinh vật nói chung có thể cung cấp những hiểu biết quan trọng về xu hướng kháng thuốc của các mầm bệnh.

Gần đây, Preena và cs. (2020) đã lần đầu tiên chứng minh hồ sơ kháng nhiều loại kháng sinh do plasmid của các chủng vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* liên quan đến cá vàng thông qua các nghiên cứu loại bỏ plasmid. Bằng cách sử dụng plasmid curing, nghiên cứu cho thấy áp lực kháng sinh có thể đóng một vai trò chính trong việc chọn lọc các vi khuẩn lây lan kháng kháng sinh thông qua nhiễm sắc thể trong trang trại cá cảnh. Trên thực tế, ứng dụng plasmid curing có thể cung cấp tiềm năng trong điều trị các vi khuẩn đa kháng như Bharathan và cs. (2019) đã thử nghiệm trên cá ngựa vằn bị nhiễm bệnh với hiệu suất xử lý là 17% đối với xử lý hạt nano + meropenem – PtNPs và cho thấy nó gây ra sự phân cắt DNA plasmid thông qua hoạt động ức chế gyrase. Do đó, ứng dụng quá trình xử lý plasmid *in vivo* ở cá bằng công nghệ xử lý

nano có thể làm kích thích vi khuẩn đa kháng trở nên nhạy cảm với các chất kháng khuẩn chọn lọc *in vivo*.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả phân lập các vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* gây bệnh trên cá chép cảnh trong nghiên cứu này cho thấy hầu hết các loài có liên quan đến nhiễm trùng ở người. Sau khi loại bỏ plasmid, kết quả kháng sinh đồ có sự giảm về khả năng kháng ở một số kháng sinh. Điều đó cho thấy hiệu quả của phương pháp và gián tiếp chỉ ra sự lây lan cao của AMR qua trung gian plasmid trong môi trường thủy sản.

Theo hiểu biết của chúng tôi, các nghiên cứu tập trung vào mối quan hệ tương tác giữa hệ vi sinh vật đường ruột, bệnh ở cá và các tác nhân môi trường gây ra vẫn chưa có nhiều báo cáo. Vì vậy nghiên cứu này cung cấp các thông tin hữu ích nhằm hỗ trợ thực hiện các biện pháp quản lý hiệu quả để hạn chế sự lây lan của AMR trong nuôi trồng thủy sản.

Lời cảm ơn: Quỹ nghiên cứu đề tài Khoa học và Công nghệ cấp cơ sở trường đại học Nguyễn Tất Thành tài trợ cho nghiên cứu này với mã số 2022.01.109/HĐ-KHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45(4), 493–496.
2. Brüssow, H. H., Canchaya, C., and Hardt, W. D., 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 560–602.
3. Cardoso PHM & Balian SC, 2016. Lymphocystis virus em peixes ornamentais importados para o Brasil, *Rev Educ Contin CRMV-SP.* 14(1), 6-11.
4. Chin SC, Abdullah N, Siang TW and Wan HY., 2005. Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from the

- gastrointestinal tract of chicken. *The Journal of Microbiology*. 43(3), 251-256.
5. Cízek A., Dolejšká, M., Sochorová, R., Strachotová, K., Piacková, V., Veselý, T., 2010. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* koi) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Vet Microbiol*. 142, 435-439.
 6. Elias, H. M., Qader, M. K., and Salih, W. M., 2013. Determination of plasmid DNA role in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Inter. J. Microb. Immunol. Res.* 1, 80–86.
 7. Elsherief, M. F., Mousa, M. M., El-Galil, H. A., and El-Bahy, E. F., 2014. Enterobacteriaceae Associated with Farm Fish and Retailed Ones. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*. 42(1).
 8. Faja, O. M., Sharad, A. A., Younis, K. M., Alwan, M. G., Mohammed, B. J., Ahmad, A., 2019. Isolation, detection of virulence genes, antibiotic resistance genes, plasmid profile, and molecular typing among *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Malaysian seawater from recreational beaches and fish. *Veterinary World*, 12(7), 1140–1149.
 9. Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., and Xu, L., 2012. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistant genes in aquaculture environment. *Water Res.* 46, 2355–2364.
 10. Ghosh, S., Mahapatra, N.R., Ramamurthy, T. and Banerjee, P.C., 2000. Plasmid curing from an acidophilic bacterium of the genus *Acidocella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 271-274.
 11. Harrison, E., Guymer, D., Spiers, A.J., Paterson, S., Brockhurst, M.A., 2015. Parallel compensatory evolution stabilizes plasmids across the parasitism-mutualism continuum. *Curr Biol*. 25, 2034 –2039.
 12. Hatha, A. A. M., & Nifty, J., 2012. Prevalence, distribution and drug resistance of motile aeromonads in freshwater ornamental fishes. *Indian J. Fish.*, 59(2), 161-164.
 13. Ingerslev, H.-C., Strube, M. L., von Gersdorff Jørgensen, L., Dalsgaard, I., Boye, M., & Madsen, L., 2014. Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*. 40, 624–633.
 14. Trevors, J.T., 1985. Plasmid curing in bacteria. *Elsevier*. 32, 149-157.
 15. John, N., and Hatha, A.A.M., 2012. Prevalence, distribution and drug resistance of motile aeromonads in freshwater ornamental fishes. *Indian J Fish.* 59, 161-164.
 16. Kathleen, M.M., Samuel, L., Felecia, C., Reagan, E.L., Kasing, A., Lesley, M., and Toh, S.C., 2016. Antibiotic resistance of diverse bacteria from aquaculture in Borneo. *Int J Microbiol*. 1-9.
 17. Letchumanan V C. K. G., Lee L.H., 2015. An insight of traditional plasmid curing in *Vibrio* species. *Front Microbiol*. 6, 735.
 18. Lü A.J. H. X. C., Li L., Sun J.F., Song Y.J., Pei C., Zhang C., Kong X.H., 2016. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Aeromonas* media isolated from diseased Koi carp. (*Cyprinus carpio* koi). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 15 (2), 760-774.
 19. MacLean, R.C., San Millan, A., 2015. Microbial evolution: towards resolving the plasmid paradox. *Curr Biol* 25, 764 –767.
 20. Majumdar, T., Ghosh, D., Datta, S., Sahoo, C., Pal, J., Mazumder, S., 2007. An attenuated plasmid-cured strain of *Aeromonas hydrophila* elicits protective immunity in *Clarias batrachus* L. *Fish & Shellfish Immunology*. 23(1), 222-230.

21. Molnar A., Amaral L., Molnar J., 2003. Antiplasmid effect of promethazine in mixed bacterial cultures. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22 217–222.
22. Osundiya, O.O., Oladele, R.O., and Oduyebo, O.O., 2013. Multiple Antibiotic Resistance (MAR) Indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital. *Afr J Clin Exper Microbiol.* 14(3), 164-168.
23. Park, J., Zhang, Y., Buboltz, A.M., Zhang, X., Schuster, S.C., Ahuja, U., Harvill, E.T. 2012. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC genomics.* 13(1), 1-17.
24. Porse, A., Schønning, K., Munck, C., Sommer, M.O., 2016. Survival and evolution of a large multidrug resistance plasmid in new clinical bacterial hosts. *Mol Biol Evol.* 33:2860–2873.
25. Preena, P. G., Dharmaratnam, A., Raj, N. S., Raja, S. A., Nair, R. R., & Swaminathan, T. R., 2020. Antibiotic-resistant Enterobacteriaceae from diseased freshwater goldfish. *Archives of Microbiology*, 203(1), 219-231.
26. Rosas, S.B., Calzolari, A., Torre, J.L., Ghittoni, N.E., Vasquez, C. 1983. Involvement of a plasmid in *Escherichia coli* envelope alterations. *Journal of Bacteriology.* 155(1): 402-406.
27. Schroeder, M., Brooks, B.D., Brooks, A.E., 2017. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes.* 8, 39.
28. Singh, A., Karimi, S., Vidakovic, A., Dicksved, J., Langeland, M., Ferreira, J.A., Taherzadeh, M.J, Kiessling, A. & Lundh, T., 2021. Dietary filamentous fungi and duration of feeding modulates gut microbial composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front. Mar. Sci.* 8, 728569.
29. Thomas, J.M. & Kay, W.W., 1984. A simple and rapid method for the elimination of R plasmids from enteric bacteria. *Current Microbiology.* 11(3), 155-157.
30. Turner, P.E., Williams, E.S.C.P., Okeke, C., Cooper, V.S., Duffy, S., Wertz, J.E., 2014. Antibiotic resistance correlates with transmission in plasmid evolution. *Evolution.* 68, 3368-3380.
31. Verner-Jeffreys, D. W., Welch, T. J., Schwarz, T., Pond, M. J., Woodward, M. J., Haig, S. J., & Baker-Austin, C., 2009. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PloS ONE*, 4(12), e8388.
32. Weir, M., Rajic, A., Dutil, L., Cernicchiaro, N., Uhland, F.C., Mercier, B., Tusevljak, N., 2012. Zoonotic bacteria, antimicrobial use and antimicrobial resistance in ornamental fish: a systematic review of the existing research and survey of aquaculture-allied professionals. *Epidemiol Infect.* 140, 192–206.

Ngày nhận 15-5-2022

Ngày phản biện 17-7-2022

Ngày đăng 1-11-2022