

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Đặng Hải Long

**NGHIÊN CỨU VI KHUẨN KHÁNG KHÁNG SINH VÀ SỰ PHỔ
BIẾN GENE KHÁNG KHÁNG SINH Ở KHU NUÔI CÁ TRA TẠI
CẦN THƠ VÀ ĐỒNG THÁP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – Năm 2024

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Đặng Hải Long

**NGHIÊN CỨU VI KHUẨN KHÁNG KHÁNG SINH VÀ SỰ PHỔ
BIẾN GENE KHÁNG KHÁNG SINH Ở KHU NUÔI CÁ TRÁ TẠI
CẦN THƠ VÀ ĐỒNG THÁP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC
Ngành: SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Nguyễn Quang Huy
2. PGS. TS. Lê Thị Nhi Công

Hà Nội – Năm 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin khẳng định rằng đề tài nghiên cứu trong luận văn này là kết quả của quá trình tự tìm hiểu và nghiên cứu của chính bản thân tôi, dựa trên các tài liệu và số liệu mà tôi tự thu thập và phân tích. Vì vậy, tôi cam kết rằng các kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và khách quan. Đồng thời, những kết quả này chưa từng được công bố trong bất kỳ nghiên cứu nào trước đây. Tôi chịu hoàn toàn trách nhiệm trước pháp luật nếu có bất kỳ sai sót nào liên quan đến tính trung thực của các số liệu và kết quả nêu trong luận văn.

Hà Nội, ngày 13 tháng 11 năm 2024

Tác giả luận văn



Vũ Đặng Hải Long

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt kỳ thực tập tại Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, tôi đã có khoảng thời gian tuyệt vời không chỉ để tích lũy thêm kiến thức mà còn học được nhiều kinh nghiệm sống. Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến những người đã giúp đỡ tôi.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo cùng các thầy cô giảng viên của Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, những người đã luôn tận tâm truyền dạy những kiến thức quý giá và khơi dậy niềm đam mê học tập trong tôi suốt thời gian vừa qua.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các giảng viên hướng dẫn thực tập của tôi, TS. Nguyễn Quang Huy từ Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội và PGS. TS. Lê Thị Nhi Công từ Viện Công nghệ Sinh học, dù rất bận rộn với lịch trình công tác, nhưng vẫn dành thời gian để hướng dẫn tôi hoàn thành kỳ thực tập thành công. Tôi xin chân thành cảm ơn ThS. Nguyễn Đăng Quang và Bùi Đức Thịnh vì tất cả sự hỗ trợ của họ.

Cuối cùng nhưng không kém phần quan trọng, với niềm vui lớn, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới ba mẹ tôi, những người luôn ủng hộ tinh thần cho tôi suốt cuộc đời.

Hà Nội, ngày 13 tháng 11 năm 2024

Tác giả luận văn



Vũ Đặng Hải Long

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	vii
MỞ ĐẦU	1
NỘI DUNG	4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. KKS là một vấn đề toàn cầu	4
1.2. Một số nghiên cứu về tình trạng KKS của vi khuẩn trong môi trường thủy sinh trên thế giới	7
1.3. Một số nghiên cứu về KKS trong nuôi trồng thủy hải sản	11
1.4. Thực trạng KKS ở Việt Nam và nghiên cứu về KKS tại sông Mekong.....	13
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. Thu và bảo quản mẫu.....	17
2.2. Xử lý mẫu	19
2.2.1 Xử lý mẫu cho tách chiết DNA	19
2.2.2. Xử lý các mẫu cho nuôi cấy vi khuẩn	19
2.3. Phân lập vi khuẩn và định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS	20
2.4. Xác định khả năng KKS của các chủng vi khuẩn phân lập bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch	20
2.5. Định lượng gen KKS bằng phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase thời gian thực nhắm đích (qPCR nhắm đích).....	21
2.6. Xử lý số liệu.....	23
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	24
3.1. Phân lập và định danh vi khuẩn	24
3.2. Kết quả đánh giá khả năng KKS của các vi khuẩn phân lập được	25
3.3. Kết quả định lượng gen KKS bằng phương pháp qPCR nhắm đích.....	35
3.3.1. Kết quả tách DNA	35
3.3.2. Kết quả tạo đường chuẩn cho qPCR nhắm đích.....	36
3.3.3. Kết quả định lượng gen KKS	36
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	48
KẾT LUẬN	48

KIẾN NGHỊ	48
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	49
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	50

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Giải nghĩa tiếng Anh	Giải nghĩa tiếng Việt
Aero	Aeromonas isolation Medium base	Môi trường phân lập Aeromonas
CGN	Horizontal gene transfer	Chuyển gen ngang
CT	Can Tho	Cần Thơ
CA	Chromogenic Coliform Agar	Thạch Coliform sinh màu
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm
DTDD	Mobile genetics	Di truyền di động
DT	Dong Thap	Đồng Tháp
ĐBSCL	Mekong Delta	Đồng bằng Sông Cửu Long
ĐNÁ	Southeast Asia	Đông Nam Á
ESBL	Extended spectrum beta-lactamases	Các beta-lactam phổ rộng
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Ủy ban Châu Âu về Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên hợp quốc
KKS	Antibiotic resistance	Kháng kháng sinh
MRC	Mekong River Commission	Ủy ban sông Mekong
MAR	Multiple antibiotic resistance index	Chỉ số kháng đa kháng sinh
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry	Giải hấp/ion hoá bằng laser hỗ trợ ma trận
qPCR	Real-time polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực
TCBS	Thiosulfate-Citrate Bile-Sucrose Agar	Thạch Thiosulfate-Citrate Bile-Sucrose
VKGB	Disease-causing bacteria	Vi khuẩn gây bệnh
VKKKS	Antibiotic-resistant bacteria	Vi khuẩn kháng kháng sinh
VKĐKT	Multidrug-resistant bacteria	Vi khuẩn đa kháng thuốc
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1: *Thông tin các cặp môi bao gồm trình tự DNA, nhiệt độ bắt cặp trong phản ứng qPCR, nhiệt độ nóng chảy và chiều dài đoạn gen được nhân lên sử dụng trong phản ứng qPCR nhằm đích.....22*

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

- Hình 1.1:** KKS từ quan điểm Một sức khỏe (Mối liên hệ tự nhiên giữa con người, động vật và môi trường tạo thách thức đối với quan điểm Một sức khỏe trong việc chống lại KKS. Các mối quan hệ chính và con đường lây truyền trực tiếp được chỉ ra ở các mũi tên). Nguồn: Grube và cộng sự [8].....5
- Hình 1.2:** Nguồn gốc ô nhiễm các dòng sông thúc đẩy tình trạng KKS ở các dòng sông. Nguồn: Selvarajan và cộng sự [28]8
- Hình 2.1:** Bản đồ lấy mẫu sông Mekong, Việt Nam biểu diễn địa điểm lấy mẫu ở tỉnh Cần Thơ (A) và ở tỉnh Đồng Tháp (B). Ứng dụng MyMap được sử dụng để đánh dấu toạ độ các địa điểm lấy mẫu (Google, Mĩ)18
- Hình 3.1:** Phần trăm số lượng vi khuẩn phân lập được trên từng loại môi trường (A), phần trăm các loại vi khuẩn quan tâm trên các mẫu nước và trầm tích (B) 25
- Hình 3.2:** Phân bố các nhóm vi khuẩn tìm được theo số lượng đại diện và khu vực tìm thấy.....25
- Hình 3.3:** Phần trăm vi khuẩn chọn lọc và mức độ kháng của chúng với các nhóm kháng sinh theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (CLSI, 2020) và Ủy ban Châu Âu về Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh (EUCAST, 2021) 26
- Hình 3.4:** Mức độ kháng của vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae với các kháng sinh chọn lọc (A), mức độ kháng của vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* với các kháng sinh chọn lọc (B), mức độ kháng của vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* với các kháng sinh chọn lọc (C). Kháng sinh được chọn theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (CLSI, 2020) và Ủy ban Châu Âu về Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh (EUCAST, 2021).29
- Hình 3.5:** Chỉ số MAR giữa các họ vi khuẩn đường ruột, *Pseudomonas*, và *Aeromonas* (A), các mẫu trầm tích và nước (B), giữa các mẫu ở Cần Thơ, Việt Nam (C), giữa các mẫu ở Đồng Tháp, Việt Nam (D).32
- Hình 3.6:** Sự phong phú tuyệt đối của 13 gen KKS và *intl1* tại Cần Thơ, Việt Nam (A) Ở các mẫu nước và mẫu trầm tích (B) Chuẩn hoá = \log_{10} của sự

<i>phong phú tuyệt đối (Số bản sao/g với mẫu trầm tích, và số bản sao/mL với mẫu nước).....</i>	<i>37</i>
Hình 3.7: <i>Sự phong phú tuyệt đối của 13 gen KKS và int11 tại Đồng Tháp, Việt Nam (A) Ở các mẫu nước và mẫu trầm tích và (B) Chuẩn hoá = log10 của sự phong phú tuyệt đối (Số bản sao/g với mẫu trầm tích, và số bản sao/mL với mẫu nước).....</i>	<i>40</i>
Hình 3.8: <i>Sự phong phú tuyệt đối của gen integron (Số bản sao/g với mẫu trầm tích, và số bản sao/mL với mẫu nước)</i>	<i>43</i>
Hình 3.9: <i>Mối tương quan giữa các thông số chất lượng nước + trầm tích và mức độ phong phú chuẩn hoá của gen KKS, gen 16S rRNA, và gen int11 (A), PCoA về hàm lượng tuyệt đối gen KKS giữa trầm tích và nước (B).....</i>	<i>46</i>

MỞ ĐẦU

Kháng kháng sinh (KKS) hiện được coi là mối đe dọa lớn đối với sức khỏe cộng đồng. Điều này đi ngược lại nhiều mục tiêu phát triển bền vững của Liên hợp quốc đề ra bao gồm: sức khỏe con người, an ninh lương thực, giảm nghèo, hạnh phúc và tăng trưởng kinh tế. Tuy nhiên, sự lưu hành KKS giữa các hệ vi sinh vật của con người, động vật và môi trường chưa được nghiên cứu đầy đủ ở nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Các con sông, thông qua mối liên hệ với rất nhiều hoạt động sống của con người, đang trở thành môi trường tiềm năng cho sự xuất hiện và phổ biến vi khuẩn KKS trên quy mô rộng lớn giữa các hệ sinh thái trên cạn và dưới nước, giữa con người, động vật và môi trường. Sông Mekong, một trong những con sông lớn nhất thế giới, chảy qua sáu quốc gia gồm Trung Quốc, Myanmar, Thái Lan, Lào, Campuchia và Việt Nam, ngày càng ô nhiễm do đó chịu tác động từ các hoạt động của con người. Nước thải từ khu công nghiệp, khu dân cư, đô thị chứa nhiều loại ô nhiễm trong đó có tồn dư kháng sinh, dược phẩm, kim loại nặng và vi khuẩn gây bệnh (VKGB) được thải trực tiếp vào dòng sông qua các nhánh sông nhỏ, kênh rạch. Bên cạnh đó, hoạt động nuôi thủy sản trên sông và ven bờ rất sôi động, dịch bệnh thủy sản diễn biến phức tạp, cùng với đó là nhu cầu sử dụng thuốc kháng sinh và hoá chất điều trị bệnh ngày càng tăng lên. Điều này có thể dẫn đến sự thúc đẩy tình trạng kháng thuốc nhanh chóng của vi khuẩn trong môi trường sông, trong đó có cả VKGB cho người và động vật, sinh vật dưới nước. Sông Mekong đóng vai trò rất quan trọng trong phát triển kinh tế, an ninh lương thực và an sinh xã hội của Việt Nam nói riêng và cả khu vực nói chung, do đó, nghiên cứu tình trạng KKS là hết sức cần thiết để đánh giá rủi ro sức khỏe liên quan đến việc bùng phát và lây nhiễm VKGB kháng thuốc trong cộng đồng.

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng cá nuôi nước ngọt chủ lực của Đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL), cung cấp thực phẩm nội địa và xuất khẩu có doanh thu lớn của Việt Nam. Do mô hình nuôi cá đã thay đổi nhanh chóng từ quảng canh sang thâm canh, cùng với việc mở rộng diện tích nuôi nên vấn đề ô nhiễm môi trường và dịch bệnh đã xảy ra ngày càng nhiều. Việc sử dụng kháng sinh cũng từ đó tăng lên, tồn dư kháng

sinh trong thực phẩm không chỉ gây tác động xấu đến khả năng xuất khẩu, ảnh hưởng đến sức khỏe con người, tồn dư kháng sinh trong môi trường thúc đẩy sự chọn lọc và phát triển vi khuẩn kháng thuốc, đặc biệt là VKGB ở cá cũng có khả năng gây bệnh ở người. Từ thực tiễn, nguồn nước sử dụng cho ao cá tra được lấy và thải trực tiếp vào những nhánh sông Mekong. Do đó sẽ có sự trao đổi qua lại hệ vi sinh vật và các chất ô nhiễm trong ao cá và môi trường sông Mekong. Tuy nhiên mối liên hệ giữa tình trạng vi khuẩn KKS ở lưu vực sông Mekong và khu nuôi cá tra chưa được nghiên cứu đầy đủ. Vì vậy, mục tiêu chính của đề tài đó là xác định được tình trạng vi khuẩn KKS và sự phổ biến gen KKS tại một số khu vực nuôi cá tra ở Cần Thơ và Đồng Tháp và nhánh sông Mekong liền kề. Cụ thể, trước hết, phân lập và xác định được tính KKS của các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh tại một số khu vực ao nuôi cá tra ở Cần Thơ và Đồng Tháp, và nhánh sông Mekong. Tiếp đó, định lượng được một số gen KKS phổ biến trong môi trường nước và trầm tích ao cá, và nhánh sông Mekong.

Về nội dung đề tài, nội dung thứ nhất đó là phân lập và định danh các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh (nhóm coliform, *Aeromonas* và *Vibrio*). Ở đây, các chủng vi khuẩn thuộc nhóm coliform, *Aeromonas*, *Vibrio* sẽ được nuôi cấy, phân lập trên các môi trường chọn lọc. Sau đó, chủng vi khuẩn sẽ được định danh nhanh bằng MALDI-TOF MS (Giải hấp/ion hoá bằng laser hỗ trợ ma trận) để xác định tới loài. Tiếp đó, ta xác định khả năng KKS của các chủng vi khuẩn phân lập được với các nhóm kháng sinh được dùng rộng rãi trong điều trị nhiễm trùng ở người và trong nuôi thủy sản trên môi trường thạch bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Cuối cùng, các gen KKS chọn lọc sẽ được xác định mật độ và định lượng. Trong đó, DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA được tách sẽ sử dụng làm khuôn nhân và định lượng gen 16S rRNA và một số gen KKS. Từ đây, phân tích mối liên hệ giữa mật độ vi khuẩn và gen KKS.

Về cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài: Những nghiên cứu gần đây đã phát hiện dư lượng kháng sinh và nhiều chất ô nhiễm khác trong sông Mekong. Việc phát thải những chất ô nhiễm này cũng như vi sinh vật gây bệnh từ nguồn nước thải sinh hoạt, đô thị và khu công nghiệp vào sông Mekong, cùng với hoạt động nuôi thủy sản sôi động sẽ đóng góp vào việc làm lây truyền, phát tán và bùng phát vi khuẩn KKS trong khu vực. Do đó nghiên cứu hiện trạng KKS ở

lưu vực sông Mekong và các khu nuôi cá tra sẽ cung cấp thông tin về mối liên hệ giữa quần thể vi khuẩn kháng thuốc, gen KKS giữa môi trường tự nhiên và khu nuôi cá. Các kết quả này sẽ là cơ sở khoa học quan trọng góp phần đánh giá yếu tố nguy cơ làm bùng phát và phát tán các chủng vi khuẩn kháng thuốc và gen KKS trong môi trường nuôi cá tra, có thể ảnh hưởng trực tiếp tới sức khỏe người dân.

Những đóng góp của luận văn: trong nghiên cứu này, chúng tôi đã bước đầu tìm ra một số loài vi khuẩn kháng thuốc phổ biến trong môi trường ao nuôi cá tra và khu vực nhánh sông Mekong liền kề. Bên cạnh đó, nghiên cứu này cũng định lượng được một số gen KKS quan trọng liên quan đến kháng thuốc điều trị bệnh ở người và khả năng phổ biến gen KKS trong môi trường thông qua cơ chế chuyển gen ngang (CGN). Lần đầu tiên, nghiên cứu mối liên hệ giữa sự phổ biến vi khuẩn kháng thuốc, gen KKS và một số điều kiện môi trường trong ao cá tra và lưu vực sông Mekong cũng đã được xác định. Những kết quả của nghiên cứu này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc phối hợp quản lý nguồn nước sông Mekong của các quốc gia thành viên cũng như hoạt động nuôi thủy sản theo quy trình sinh học, bền vững.

NỘI DUNG

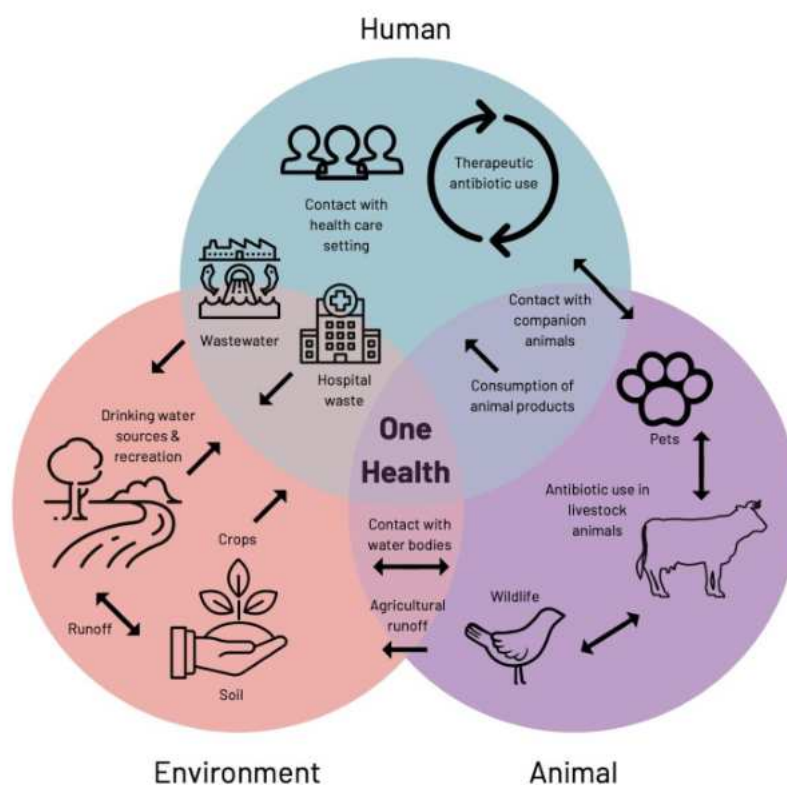
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. KKS là một vấn đề toàn cầu

Kháng sinh là các hợp chất hữu cơ được tạo ra bởi các vi sinh vật như vi khuẩn và nấm trong quá trình phát triển của chúng và có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của các vi sinh vật khác ngoài các sinh vật đó ở nồng độ thấp hoặc chúng là những chất do nhiều vi sinh vật (vi khuẩn, nấm) tạo ra trực tiếp với mục đích làm kìm hãm sự phát triển của các vi sinh vật khác và cuối cùng là tiêu diệt chúng [1]. Trong y học, việc đưa kháng sinh vào sử dụng lâm sàng được coi là bước đột phá trong thế kỷ 20 với việc điều trị các bệnh truyền nhiễm, ngoài ra chúng còn giúp thực hiện được nhiều thủ thuật y tế hiện đại, bao gồm điều trị ung thư, cấy ghép nội tạng và phẫu thuật tim hở [2].

Tuy nhiên, việc lạm dụng các hợp chất này đã dẫn đến sự gia tăng nhanh chóng tình trạng KKS với một số bệnh nhiễm trùng hiện không thể điều trị được [3]. KKS từ đó dần trở thành một trong những mối đe dọa sự phát triển và sức khỏe cộng đồng hàng đầu toàn cầu. Người ta ước tính rằng KKS vi khuẩn là nguyên nhân trực tiếp gây ra 1,27 triệu ca tử vong trên toàn cầu vào năm 2019 và tổng cộng đã có 4,95 triệu ca tử vong [4]. KKS ảnh hưởng đến tất cả các quốc gia, nhưng tạo ra gánh nặng cao hơn cả ở các quốc gia có thu nhập thấp và trung bình [5]. Mặc dù việc lạm dụng thuốc kháng sinh ở cả người và động vật đều là nguyên nhân lớn gây nên tình trạng này nhưng bên cạnh đó còn là do các chiến lược được phát triển của các quốc gia để chống lại việc lạm dụng đó thường chưa đạt nhiều thành tựu [6]. Những mối nguy hiểm của thời kỳ hậu kháng sinh đã khiến các nhà hoạch định chính sách ở mỗi quốc gia thừa nhận mối đe dọa này đối với sức khỏe con người và sẵn sàng tài trợ cũng như thúc đẩy sự quan tâm trở lại trong việc khám phá và phát triển kháng sinh mới [7]. Trước mối nguy cơ này, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên hợp quốc (FAO) và Tổ chức Thú y Thế giới (WOAH) đã đề xuất cách tiếp cận Một sức khỏe để thúc đẩy việc sử dụng thận trọng và có trách nhiệm thuốc kháng sinh. Mô hình Một sức khỏe đã nhấn mạnh mối quan hệ giữa sức khỏe con người, động vật và môi trường theo hình 1. Tuy nhiên, đến thời điểm hiện tại, các chương trình giám sát sự phát triển tình trạng

KKS được tập trung cho hai trong số ba trụ cột của mô hình Một sức khỏe, đó là sức khỏe con người và thú y. Vì vậy, KKS trong môi trường được coi là phần bị bỏ quên nhiều nhất.



Hình 1.1: KKS từ quan điểm Một sức khỏe (Mối liên hệ tự nhiên giữa con người, động vật và môi trường tạo thách thức đối với quan điểm Một sức khỏe trong việc chống lại KKS. Các mối quan hệ chính và con đường lây truyền trực tiếp được chỉ ra ở các mũi tên). Nguồn: Grube và cộng sự [8].

Đặc điểm nổi bật nhất của hệ vi sinh vật môi trường là sự đa dạng, bởi vi sinh vật có thể biến đổi các gen và sử dụng để chống lại tác dụng của kháng sinh [9]. Trên thực tế, nhiều loài vi khuẩn mang gen KKS một cách tự nhiên và chúng có từ trước khi con người sử dụng kháng sinh [10]. Tuy nhiên, tình trạng vi khuẩn KKS đang dần trở nên trầm trọng hơn do việc lạm dụng kháng sinh ở người, động vật, và thực vật, cũng như các hoạt động khác của con người đã đẩy nhanh sự chọn lọc, bùng phát và lan truyền gen KKS, và vi khuẩn KKS trong môi trường [11], [12], [13]. Hơn nữa, dưới áp lực chọn lọc của kháng sinh, kim loại nặng và các chất ô nhiễm khác trong môi trường, gen KKS với sự trợ giúp của các nhân tố di truyền di động (DTDD) như plasmid, transposon, integron, prophage, và các yếu tố di động tích hợp/tái tổ hợp thông qua các cơ

chế CGN, đã thúc đẩy sự bùng phát vi khuẩn KKS [14], [15]. Nhân tố DTDD làm cho bộ gen vi khuẩn trở nên linh hoạt hơn, dễ dàng tiếp nhận và/hoặc loại bỏ, trao đổi các nhân tố di truyền mới với vi sinh vật ở môi trường xung quanh. Do đó, việc xác định chính xác cấu trúc các nhân tố DTDD là rất quan trọng để xác định cơ chế chuyên, vị trí thường chèn và kiểu gen/trình tự vận chuyển gen KKS cũng như để theo dõi tần suất của các quá trình CGN [16].

Nghiên cứu gần đây cho thấy, nhiều gen KKS được tìm thấy từ các chủng vi khuẩn bệnh viện có nguồn gốc từ vi khuẩn môi trường [10] *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, và *Vibrionaceae* là những họ vi khuẩn thường gặp trong môi trường thủy sinh nhưng trong đó có nhiều loài là những tác nhân gây bệnh ở người và động vật [11], [14], [15]. Đáng lưu ý, chúng vừa là vật chủ và có khả năng trao đổi, tiếp nhận gen KKS với nhau và với các loài khác (kể cả loài gây bệnh và không gây bệnh), dẫn đến bùng phát nhanh chóng các loài vi khuẩn đa kháng thuốc (VKĐKT). Chẳng hạn, có bằng chứng cho thấy sự di chuyển của gen *blaCTX-M* (kháng beta-lactam phổ rộng) trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn môi trường *Kluyvera* spp. (hiếm khi gây bệnh) sang plasmid của các chủng *Escherichia coli* lâm sàng [17]. Ngày nay các biến thể gen *blaCTX-M* được tìm thấy rất phổ biến ở các chủng vi khuẩn bệnh viện [18] với lần đầu tiên phát hiện gen *blaNDM-1* (kháng carbapenem) ở chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, gây nhiễm trùng đường tiết niệu ở một phụ nữ đi du lịch tới Ấn Độ. Nghiên cứu sau đó đã phát hiện các chủng vi khuẩn mang gen *blaNDM-1* ở các mẫu nước uống tại New Delhi, chứ không phải ở nguồn nước thải tại Wales (nơi sinh sống của người phụ nữ), cho thấy gen *blaNDM-1* có nguồn gốc từ Ấn Độ [19]. Tình trạng mất vệ sinh đã làm ô nhiễm các nguồn nước uống, nước sông và làm cho tình trạng lây nhiễm VKKKS trở nên trầm trọng hơn ở Ấn Độ [20]. Như vậy, các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra mối liên hệ chặt chẽ giữa việc xuất hiện và lây nhiễm vi khuẩn KKS từ môi trường tới con người và sau đó lưu hành phổ biến ở các chủng phân lập trong khu vực bệnh viện. Đáng báo động, các VKĐKT như *Acinetobacter baumannii* và *Escherichia coli* kháng carbapenem, *P. aeruginosa* kháng quinolones thuộc nhóm 12 VKGB ưu tiên nghiên cứu phát triển kháng sinh mới do WHO công bố cũng đã được phát hiện trong môi trường thủy sinh [21]. Nếu KKS trong lâm sàng có nguồn gốc từ môi trường, thì khả

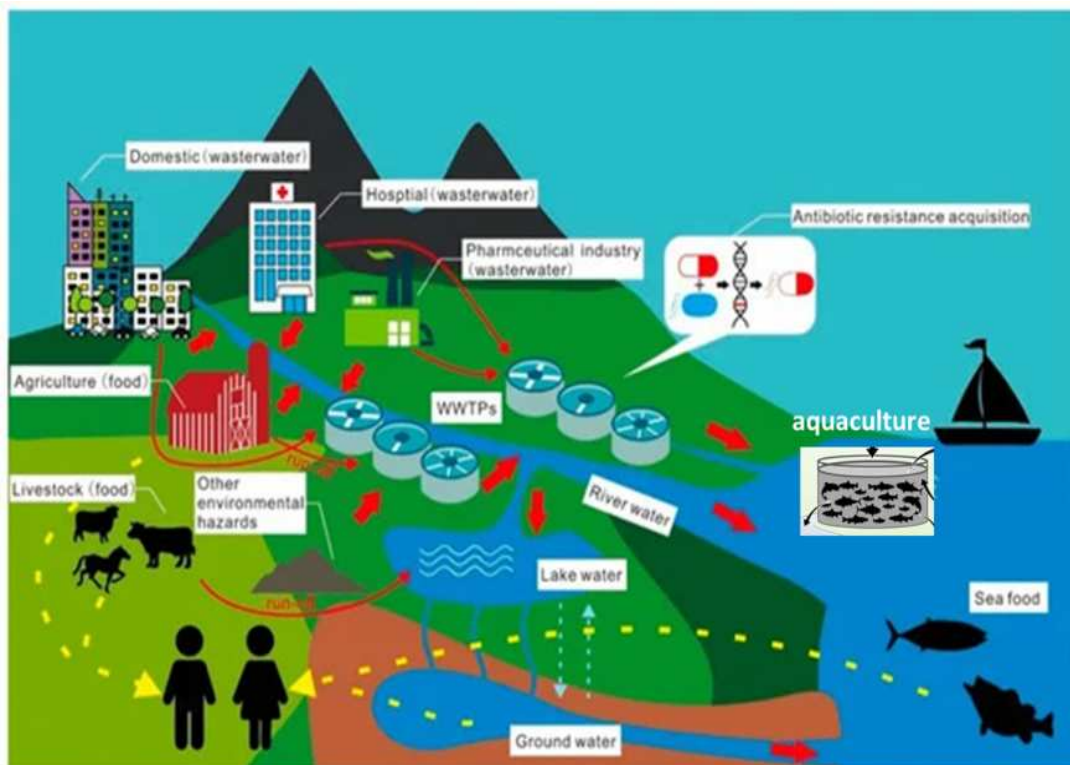
năng lây truyền có thể diễn ra theo hướng ngược lại, từ người sang môi trường và ngược lại.

Trên thực tế, sự phong phú và đa dạng gen KKS trong cộng đồng vi khuẩn môi trường vẫn chưa được xác định đầy đủ. Bên cạnh đó, nguồn gốc của khoảng 95% gen KKS di động vẫn chưa được biết. Như vậy, nguy cơ xuất hiện các gen KKS di động mới ở VKGB sẽ cao hơn trong môi trường thường xuyên tiếp xúc với kháng sinh như hệ vi sinh vật của người, động vật nuôi và môi trường bị ô nhiễm kháng sinh. Hiện nay vẫn còn thiếu dữ liệu cơ bản về sự phân bố và tác động của gen KKS di động trong nguồn nước tự nhiên, đặc biệt là ở các quốc gia có thu nhập thấp và trung bình như Đông Nam Á (ĐNÁ), nơi được xác định là điểm nóng hàng đầu về bùng phát và lây truyền VKGB KKS trên thế giới [22]. WHO đã nhấn mạnh việc thiếu thu thập dữ liệu có hệ thống liên quan đến KKS ở ĐNÁ và mô tả vấn đề KKS là “đang phát triển và thường bị bỏ rơi” [23]. Nhìn chung, giám sát KKS trên toàn khu vực hiện được thực hiện chủ yếu tại các cơ sở chăm sóc sức khỏe [22], nhưng KKS liên quan đến bệnh viện chỉ chiếm một phần nhỏ trong tổng gánh nặng KKS, có khả năng để lại lỗ hổng kiến thức lớn về gánh nặng KKS trong cộng đồng, ở động vật nuôi để sản xuất thực phẩm và trong môi trường. Do đó, việc phân tích sự đa dạng gen KKS và nhân tố DTDĐ mang gen KKS trong các môi trường sống sẽ cung cấp rõ ràng hơn về hệ quả y tế, sức khỏe trong tương lai gần. Trên cơ sở đó, các hành động cụ thể sẽ được xây dựng để giảm thiểu rủi ro đối với sự lây truyền của gen KKS di động mới sang các mầm bệnh của người và động vật.

1.2. Một số nghiên cứu về tình trạng KKS của vi khuẩn trong môi trường thủy sinh trên thế giới

Qua hình 1.2, có thể thấy hệ sinh thái thủy sinh thường dễ bị tổn thương nhất và trở nên ô nhiễm nghiêm trọng do các hoạt động của con người. Với quá trình công nghiệp hóa và đô thị hóa nhanh chóng, các dòng sông đã bị ảnh hưởng rất nhiều bởi các hoạt động của con người thông qua việc xả thải ô nhiễm chất thải công nghiệp và sinh hoạt có chứa kháng sinh, kim loại nặng, thuốc diệt khuẩn, thuốc trừ sâu dẫn đến sự phát triển vi khuẩn KKS và chọn lọc gen KKS mạnh mẽ cho thấy tác động tiêu cực của chúng đối với sức khỏe con người và môi trường. Do đó, sự xuất hiện của VKKKS gây bệnh và gen KKS trong môi trường nước, đặc biệt là ở các hệ thống sông đã trở thành mối lo ngại ngày

càng hiện hữu trên toàn thế giới [24], [25]. Bởi, các dòng sông được sử dụng rộng rãi làm nguồn nước uống, tưới tiêu, nuôi trồng thủy hải sản và mục đích giải trí, là nguồn sống của hàng tỷ người trên thế giới, chính vì thế, sự xâm nhập của thuốc kháng sinh, VKGB và gen KKS vào môi trường này làm cho việc quản lý chất lượng nước trở nên phức tạp hơn [26], [27]. Gần như tất cả các loại kháng sinh cùng nhiều loại VKGB và gen KKS đã được phát hiện trong các mẫu nước bề mặt và trầm tích đáy của các hệ thống sông lớn ở nhiều quốc gia từ cả 5 châu lục, như Trung Quốc (Sông Hoàng Hà, Bắc Kinh, Thượng Hải, Quảng Đông, Côn Minh, Hồ Nam, Vân Nam), Ấn Độ (Sông Hằng, Sông Ấn, Kshipra, Mula, Mutha, Torsa, Brahmaputra và Ganga), Pakistan (sông Indus), Iran (sông Babolrud), Nhật Bản (các dòng sông ở Tokyo, sông Yasu và Hino), Hàn Quốc (Sông Hàn), Indonesia (sông Mã), Turkey (sông Kizilirmak), Các quốc gia Châu Âu (Sông Tiber, Aniene, Sowe, West Midlands, Lockwitzbach, Sense), Mỹ (Sông Altamaha, South Fork Iowa, Cache La Poudre, Savannah), Canada (Sông Salmon, South Nation, Fales), Cuba (sông Almendares), Bolivia (sông La Paz), Colombia (sông Bogotá), South Africa (sông Umgeni và Aller), Australia (sông Brisbane và Werribee) [14], [24], [25].



Hình 1.2: Nguồn gốc ô nhiễm các dòng sông thúc đẩy tình trạng KKS ở các dòng sông. Nguồn: Selvarajan và cộng sự [28].

Các phân tử kháng sinh bình thường sẽ được chuyển hóa trong cơ thể người hoặc động vật, nhưng phần lớn (70–90%) được bài tiết dưới dạng không đổi qua phân và nước tiểu. Các phân tử kháng sinh xâm nhập vào nước thải dưới dạng hợp chất chính hoặc chất chuyển hóa từ nước thải của bệnh viện, công ty dược phẩm, nhà máy xử lý nước thải, nuôi trồng thủy sản và trang trại chăn nuôi. Điều này đã dẫn đến việc một lượng lớn kháng sinh đi vào nước mặt, nước ngầm và thậm chí cả nước uống, còn môi trường sông và biển lại trở thành nơi tích tụ kháng sinh chính của môi trường [29]. Ở các nước phát triển, nhờ hệ thống xử lý nước thải tốt, nồng độ kháng sinh trong nước mặt thường thấp rơi vào chỉ vài chục ng/L, như sông Arno và sông Po ở miền trung và miền bắc Italy nồng độ < 25,4 ng/L [30]; trong nước biển tại vịnh Victoria - Hồng Kông < 50 ng/L [31], [32].; Hàm lượng kháng sinh trong nước của sông Huangpu - Thượng Hải - Trung Quốc < 313 ng/L [33]. Trong môi trường nước mặt, kháng sinh có thể trải qua nhiều con đường chuyển hóa dưới ảnh hưởng của các yếu tố tự nhiên, chẳng hạn như bị phân hủy dưới tác động của ánh sáng mặt trời, kết hợp với các chất khác trong môi trường, tích lũy trong sinh vật thủy sinh và trầm tích, hoặc tồn dư trong nước. Tại hồ Baiyangdian, Trung Quốc, người ta đã phát hiện thấy nồng độ kháng sinh sulfonamides dao động từ 0,86 đến 1563 ng/L [34]. Ở Pháp, ít nhất 17 loại kháng sinh thuộc 4 nhóm, bao gồm quinolones, sulfonamides, nitroimidazoles, và diaminopyrimidines, đã được phát hiện một lần trong các cửa sông hoặc trong dòng sông Seine [35]. Trong nước ngầm, do mật độ vi sinh vật thấp và điều kiện oxy hóa khử nghèo nàn, kháng sinh có thể bị biến đổi không hoàn toàn hoặc chuyển hóa thành các chất độc hại hơn, thậm chí có thể tồn tại không thay đổi trong thời gian dài. Ở một số khu vực gần bãi chôn lấp chất thải rắn, người ta đã phát hiện thấy nồng độ kháng sinh trong nước ngầm có thể đạt từ 10 µg/L đến 1 mg/L [36]. Khi tồn tại trong nước, kháng sinh có thể tích lũy vào trầm tích thông qua các cơ chế như trao đổi ion, tạo phức với ion kim loại, hoặc tương tác với các chất ưa nước khác. Cơ chế hấp phụ kháng sinh vào trầm tích không chỉ phụ thuộc vào bản chất của kháng sinh và trầm tích, mà còn liên quan đến quá trình tạo phức với các ion kim loại như Fe^{3+} , ... Các hợp chất humic trong bùn cũng có thể làm thay đổi tính chất bề mặt và khả năng hấp phụ của kháng sinh, như đã được quan sát trong phản ứng hấp phụ của tetracycline lên oxit nhôm dưới tác động

của axit humic [37]. Sự liên kết với các hạt rắn hoặc tạo phức có thể làm giảm khả năng phát hiện kháng sinh trong môi trường và giảm hoạt tính kháng khuẩn [19].

Enterobacteriaceae, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* và *Vibrionaceae*, chiếm ưu thế trong môi trường nước là VKGB có ý nghĩa lâm sàng đáng kể và là vật chủ chính của gen KKS [11], [14], [15]. Đáng chú ý, gen KKS được trao đổi và phát tán rất nhiều trong các chủng vi khuẩn và giữa các loài gây bệnh này, và do đó làm tăng sự phát triển của các loài mang gen KKS. Các chủng *A. baumannii*, *E. coli* và *P. aeruginosa* kháng nhiều loại thuốc thuộc danh sách tác nhân gây bệnh ưu tiên của WHO cũng được phát hiện trong môi trường nước. Hơn nữa, dư lượng kháng sinh, kim loại và nhiều chất thải khác nhau thúc đẩy sự lây lan của gen KKS trong vi khuẩn môi trường với sự trợ giúp của các yếu tố DTĐĐ thông qua các quá trình CGN [11], [14], [15]. Do đó, môi trường nước đại diện cho sự thu nhận và lan truyền gen KKS, cũng như để tăng sinh VKKKS [15].

Nhìn chung, các gen KKS liên quan kháng nhóm aminoglycoside (*aphA6*, *aacC1*, *aadB* và *aadA1*), β -lactam (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaVIM*, *blaCTX-M*, *blaOXA*, *blaAMPC*), sulfonamide (*sul1*, *sul2* và *sul3*), tetracycline (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, *tetO*, *tetX*, *tetQ* và *tetW*) và quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) thường được phát hiện nhiều nhất ở các hệ thống sông hồ trên thế giới [38], [39], [40], [41], [42]. Bên cạnh đó, các dòng sông chảy qua khu vực đô thị có mức độ đa dạng và hàm lượng gen KKS rất cao (10^4 - 10^6 bản sao/mL trong nước và 10^6 - 10^8 bản sao/g trong trầm tích) [38], [39], [42], [43], [44]. Các nghiên cứu đã chỉ ra mối liên hệ mật thiết giữa việc phát hiện dư lượng loại kháng sinh cụ thể với sự đa dạng và hàm lượng gen KKS trong môi trường sông. Mối liên hệ giữa nồng độ kháng sinh và gen KKS tương ứng cho thấy rằng nồng độ và sự phong phú của gen KKS ở một mức độ nhất định có liên quan đến sự hiện diện của các vi khuẩn KKS cụ thể trong môi trường. Do đó xác định các điểm nóng, hồ chứa vi khuẩn KKS và gen KKS ở những khu vực sông để hiểu sâu hơn về chu kỳ dịch tễ học và các yếu tố liên quan thúc đẩy sự hình thành, phát triển và phát tán KKS trong môi trường.

1.3. Một số nghiên cứu về KKS trong nuôi trồng thủy hải sản

Nuôi trồng thủy sản toàn cầu đã tăng trưởng mạnh mẽ trong giai đoạn từ năm 2005 đến năm 2019 với tốc độ trung bình khoảng 4,35 triệu tấn mỗi năm hoặc 5,21% hàng năm. Tổng sản lượng nuôi trồng thủy sản của thế giới năm 2019, khoảng 21,05% được đóng góp bởi các nước ĐNÁ. Nuôi trồng thủy sản ở ĐNÁ đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp nguồn protein, góp phần đảm bảo an ninh lương thực, nâng cao sinh kế của người dân, tạo thu nhập và việc làm, cũng như cải thiện tăng trưởng kinh tế. Theo quốc gia, Indonesia là một nhà sản xuất nuôi trồng thủy sản lớn vào năm 2019 đã đóng góp khoảng 61,50% từ nuôi trồng thủy sản vào tổng sản lượng nuôi trồng thủy sản của khu vực, tiếp theo là Việt Nam với 17,77% từ nuôi trồng thủy sản nước ngọt, Philippines với 9,33% từ nuôi trồng thủy sản nước biển, Myanmar với 4,28% từ nuôi trồng thủy sản nước ngọt và Thái Lan với 3,80% từ nuôi trồng nước lợ [45].

Tuy nhiên, sự tăng trưởng nhanh chóng của ngành này, đặc biệt là sự chuyển đổi sang các mô hình nuôi thâm canh, đã dẫn đến việc sử dụng thuốc kháng khuẩn ngày càng tăng. Điều này đã tạo ra một môi trường thuận lợi cho sự phát triển và lan truyền của các chủng vi khuẩn kháng thuốc, gây ra những thách thức lớn cho ngành nuôi trồng thủy sản và sức khỏe cộng đồng [46]. Việc sử dụng thuốc kháng khuẩn trong nuôi trồng thủy sản đã trở thành một vấn đề ngày càng nghiêm trọng, dẫn đến sự phát triển của các chủng vi khuẩn kháng thuốc. Các vi khuẩn này không chỉ gây ra những thách thức lớn cho ngành nuôi trồng thủy sản mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng. Khi những chủng vi khuẩn kháng thuốc này lây lan từ cá nuôi sang con người, chúng có thể gây ra các bệnh nhiễm trùng khó điều trị, làm gia tăng gánh nặng cho hệ thống y tế. Việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản, mặc dù cần thiết để kiểm soát bệnh tật, nhưng cũng tạo ra áp lực chọn lọc lên các quần thể vi khuẩn, thúc đẩy sự xuất hiện và lan truyền của các gen KKS [46]. Các vi khuẩn kháng thuốc có thể lây lan từ môi trường nuôi trồng thủy sản sang môi trường tự nhiên và chuỗi thức ăn, gây ra những hậu quả nghiêm trọng cho sức khỏe con người và động vật [47], [48]. Đặc biệt, các nhóm vi khuẩn như *Vibrio*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Edwardsiella* và *Escherichia*, thường có đại diện là tác nhân gây bệnh thực phẩm phổ biến, có thể mang và truyền các gen KKS, làm tăng nguy cơ nhiễm trùng khó điều trị ở người. Sự lây lan

của những vi khuẩn này không chỉ diễn ra qua thực phẩm mà còn qua môi trường, đặc biệt trong các hệ thống nước, nơi mà sự ô nhiễm do chất thải nông nghiệp và y tế có thể tạo điều kiện thuận lợi cho chúng phát triển. Việc sử dụng không hợp lý các kháng sinh trong chăn nuôi và nông nghiệp cũng góp phần làm gia tăng khả năng kháng thuốc của các vi khuẩn này, dẫn đến tình trạng KKS ngày càng nghiêm trọng, đe dọa sức khỏe cộng đồng và hệ thống y tế [49], [50]. Một số loài cá nuôi, chẳng hạn như cá da trơn, đã được ghi nhận có tỷ lệ sử dụng thuốc kháng khuẩn cao hơn nhiều so với các loài động vật trên cạn và thậm chí so với con người. Sự gia tăng này trong việc sử dụng thuốc kháng khuẩn không chỉ phản ánh nhu cầu ngày càng cao về sản lượng thủy sản mà còn đặt ra những mối lo ngại nghiêm trọng về sự phát triển của các chủng vi khuẩn kháng thuốc trong môi trường nuôi trồng thủy sản. Điều này có thể dẫn đến sự lây lan của các vi khuẩn kháng thuốc sang cộng đồng, gây ra những thách thức đáng kể cho sức khỏe cộng đồng. Hơn nữa, việc lạm dụng thuốc kháng khuẩn trong chăn nuôi thủy sản có thể tạo ra những “bể chứa” vi khuẩn kháng thuốc, làm tăng đáng kể nguy cơ nhiễm trùng kháng thuốc trong cả người và động vật. Tình hình này đòi hỏi cần có các biện pháp quản lý và giám sát chặt chẽ hơn để bảo vệ sức khỏe cộng đồng và bền vững cho ngành nuôi trồng thủy sản. [51], [52], [53].

Một mối đe dọa lớn đối với hoạt động nông nghiệp có lợi nhuận là dịch bệnh bùng phát [54]. Các loài thủy sinh sống trong điều kiện đông đúc và áp lực trong nuôi trồng thủy sản dễ bị nhiễm khuẩn hơn [55]. Do đó, người nông dân sử dụng thuốc kháng khuẩn để phòng ngừa và điều trị nhằm kiểm soát dịch bệnh bùng phát. Việc sử dụng quá mức và sử dụng sai thuốc kháng sinh được cho là lý do chính gây ra tình trạng KKS ở mức độ cao trong nuôi trồng thủy sản [48], [56], [57]. Mức độ kháng thuốc kháng sinh quan trọng về mặt y khoa trong các tác nhân gây bệnh thực phẩm trong nuôi trồng thủy sản đang gây lo ngại [58]. KKS trong nuôi trồng thủy sản khác nhau ở các khu vực, trong đó các nước đang phát triển và các vùng ấm áp cho thấy mức độ kháng thuốc tương đối cao hơn [56].

Một số nghiên cứu ở các nước ĐNÁ báo cáo rằng tính nhạy cảm với kháng sinh và chỉ số kháng đa kháng sinh (MAR) dao động trong khoảng từ 0,13 đến 0,88 với 74,7% các mẫu phân lập có giá trị MAR cao hơn 0,2 [59], [60]. Vi khuẩn KKS *Aeromonas* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. và

Vibrio spp. kháng với các loại kháng sinh thuộc ít nhất 3 loại trở lên và do đó được coi là các chủng kháng nhiều loại thuốc [60], [61]. Kết quả đưa ra cảnh báo cho người nuôi trồng thủy sản và người quản lý trong việc ngăn ngừa sự lây lan của KKS trong các hệ thống nuôi trồng thủy sản [62]. Hơn nữa, các kiểu kháng thuốc có liên quan đến địa lý và khí hậu [56], [58]. Nhiệt độ ảnh hưởng đến tỷ lệ tử vong của động vật thủy sinh nuôi cấy bị nhiễm thực nghiệm các tác nhân gây bệnh vi khuẩn chính: *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp., *Flavobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Vibrio* spp. và *Yersinia* spp. Nhiệt độ tăng có liên quan đến việc tăng tỷ lệ tử vong ở hầu hết các sinh vật thủy sinh bị nhiễm bệnh [56]. Ngoài ra, hạ lưu sông Mekong và đồng bằng sông Cửu Long ở miền Nam Campuchia và Việt Nam đã dự đoán các điểm nóng về tình trạng kháng thuốc đa kháng sinh trong môi trường nước ngọt. Indonesia chiếm số lượng khảo sát cao thứ ba cần tiến hành nhiều nghiên cứu về KKS hơn trong tương lai. Trong môi trường biển, vùng nước ven biển của Thái Lan và Malaysia trên Vịnh Thái Lan và vùng nước ven biển của Thái Lan trên Biển Andaman có MAR thấp hơn [58]. Ở Singapore, chỉ một số loại kháng sinh nhất định mới được phép sử dụng cho động vật và dư lượng kháng sinh tìm thấy trong thực phẩm không được vượt quá mức dư lượng tối đa. Tuy nhiên, điều đó không có nghĩa là loại bỏ được KKS trong nuôi trồng thủy sản. VKKKS và nhiều gen KKS đã được phát hiện tại các trang trại nuôi cá và các địa điểm khảo sát ở Singapore [63]. Gen KKS đã được phát hiện tại các trang trại nuôi trồng thủy sản của Malaysia ở eo biển Johor, có thể lây lan sang trang trại nuôi trồng thủy sản địa phương nằm trong cùng vùng nước [64].

1.4. Thực trạng KKS ở Việt Nam và nghiên cứu về KKS tại sông Mekong

Việt Nam nằm trong số những nước có tỷ lệ KKS cao do lạm dụng các loại thuốc, đặc biệt là kháng sinh với vi khuẩn. Các cửa hàng thuốc bán thuốc kháng sinh thường bán thuốc không qua kê đơn; bác sĩ kê đơn thuốc kháng sinh một cách không hợp lý; các trang trại chăn nuôi sử dụng thuốc không đúng với hướng dẫn của nhà sản xuất cũng như tiêu chuẩn [65].

Một nghiên cứu ở Việt Nam cho thấy 1 kg sinh khối động vật có 247,3 mg hoạt chất kháng khuẩn, cao hơn mức tiêu thụ hoạt chất trung bình toàn cầu của Tổ chức Thú y Thế giới ở động vật (168,7 mg) trong khi tại hệ thống bệnh viện, trên 40% bệnh nhân được sử dụng thuốc kháng sinh mà WHO xác định

là những thuốc có khả năng tạo ra vi khuẩn kháng thuốc cao [66], [67]. Lượng thuốc kháng sinh lớn nhất (theo thứ tự giảm dần) được sử dụng cho lợn (41,7% tổng lượng sử dụng), người (28,3%), nuôi trồng thủy sản (21,9%) và gà (4,8%), trong khi con số đó ở các nước Châu Âu chỉ khoảng dưới 1,5% [66].

Gần đây, ngày càng có nhiều báo cáo về sự hiện diện của dư lượng kháng sinh ở môi trường sông và biển Việt Nam. Tại các vùng rừng ngập mặn thuộc các tỉnh Thái Bình, Nam Định, Cà Mau và rừng Cần Giờ, nồng độ dư lượng cao nhất được tìm thấy trong các mẫu bùn là trimethoprim, sulfamethoxazole, norfloxacin và axit oxolinic, ngoài ra, mẫu nước lấy từ ao nuôi tôm cũng chứa dư lượng các kháng sinh đó khá cao [68]. Kết quả phân tích kháng sinh trong nước tại các khu vực thượng lưu, trung lưu và hạ lưu của các kênh dẫn nước thải chính ở thành phố Hà Nội ra sông Hồng có nồng độ sulfamethoxazole: 612-4330 ng/L; sulfamethazine: 16,166,2 ng/L; trimethoprim: 23-1808 ng/L [69]; Kháng sinh nhóm macrolites, sulfonamides và trimethoprim đã phát hiện trong nước mặt, nước thải chăn nuôi lợn tại lưu vực sông Mekong với nồng độ từ 15 đến 328 ng/L [70].

Sông Mekong là một trong những con sông quan trọng nhất ở ĐNÁ, chảy qua 6 quốc gia để đến điểm cuối cùng là Việt Nam. Trải dài gần 4900 km từ cao nguyên Tây Tạng đến Biển Đông, nơi đây chứa đựng rất nhiều hệ sinh thái và là môi trường sinh hoạt của con người. Đối với Việt Nam, sông Mekong đóng vai trò to lớn vì sự gắn liền của nó với các khía cạnh của lịch sử, văn hóa, kinh tế và môi trường [71]. Sông Mekong là một trong những trung tâm lớn về nuôi trồng thủy sản, đa dạng sinh học và là khu vực trọng điểm sản xuất nông nghiệp của Việt Nam. Tuy nhiên, hiện nay, tính đến 4/2024, hơn 80% trong số 60 triệu người sống ở khu vực này đã bị ảnh hưởng đáng kể bởi những thay đổi về nguồn thực phẩm do sự ô nhiễm, biến đổi khí hậu, suy thoái các hệ sinh thái trầm tích, nước, các hoạt động phát triển ở thượng nguồn và tăng trưởng dân số [72]. Ngoài ra, tình trạng ô nhiễm kháng sinh, cũng như vi khuẩn KKS được tìm thấy trong môi trường sông Mekong đang diễn biến rất phức tạp. Điển hình, trong một báo cáo của Giang và cộng sự năm 2014 tại sông Mekong, Việt Nam, các loại kháng sinh bao gồm sulfamethoxazole, trimethoprim, enrofloxacin, sulfadiazine được tìm thấy trong các mẫu nước kênh và nước sông với giá trị trung bình lần lượt là 21, 17, 12 và 4 ng/L [73]. Điều này cho thấy việc lạm

dụng thuốc kháng sinh trong nước ở các hộ nuôi trồng thủy sản đang rất phổ biến.

Ngoài ra, con sông này có quần thể cá đa dạng thứ ba trên thế giới, với 1.148 loài cá và là nơi có nghề cá nội địa lớn nhất, sản lượng hàng năm đạt 2,3 triệu tấn, năm 2015, Ủy ban sông Mekong (MRC) ước tính tổng sản lượng là 4,4 triệu tấn với giá trị khoảng 17 tỷ đô la Mỹ [71]. Thái Lan và Việt Nam lần lượt là nước xuất khẩu cá và sản phẩm thủy sản lớn thứ ba và thứ tư thế giới vào năm 2012, dựa trên giá trị [74]. Việt Nam đã mở rộng nuôi trồng thủy sản, sản xuất nhiều hơn đánh bắt tự nhiên, với diện tích nuôi tôm lên đến 600.000 ha [75]. Khoảng 70% kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam và Thái Lan là loại cực kỳ quan trọng cho sức khỏe con người [76], [77]. Tác động tích lũy của việc sử dụng kháng sinh trong các giai đoạn sản xuất trước đó, có thể đã được lựa chọn, làm giàu và ưu tiên cho gen KKS và VKKKS. Sông Mekong, với chất thải chứa kháng sinh thải ra từ nhiều hoạt động nuôi trồng thủy sản và các hoạt động khác của con người, có thể là điểm nóng môi trường quan trọng, nơi VKKKS có nhiều khả năng xuất hiện hơn. Việc sử dụng hệ thống sông cho mục đích di chuyển hoặc sinh hoạt có thể khiến con người tiếp xúc với dư lượng kháng sinh, VKKKS và gen KKS. Do đó, sông Mekong có thể là nơi ủ bệnh và là nơi chứa VKKKS, gen KKS và yếu tố DTĐĐ của chúng, có thể là nguồn gây ô nhiễm tiềm ẩn cho con người, động vật và môi trường.

Sông Mekong đóng vai trò quan trọng trong việc đảm bảo an ninh lương thực, dinh dưỡng, sức khỏe và sinh kế cho các quốc gia hạ lưu, nhưng thường bị lãng quên. Các hoạt động không bền vững như sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản, xả thải, xây đập và biến đổi khí hậu đang khiến sông dễ bị suy thoái, gây tác động tiêu cực cho các cộng đồng phụ thuộc vào nó. Để bù đắp cho nguy cơ gia tăng của môi trường thực phẩm ven sông và an ninh lương thực, MRC, một tổ chức liên chính phủ, đã được thành lập vào năm 1995 để thúc đẩy đối thoại và hợp tác khu vực tại lưu vực hạ lưu sông Mekong. Sứ mệnh của MRC là "thúc đẩy và điều phối quản lý và phát triển bền vững nguồn nước và các nguồn tài nguyên liên quan vì lợi ích chung của các quốc gia hạ lưu sông Mekong và phúc lợi của người dân". Dựa trên Hiệp định Mekong giữa Campuchia, Lào, Thái Lan và Việt Nam, MRC đóng vai trò vừa là nền tảng khu vực cho ngoại giao về nước vừa là trung tâm tri thức - để quản lý nguồn nước và hỗ trợ phát triển bền vững của khu vực.

Cá tra (danh pháp khoa học: *Pangasiidae*), là một loài cá thuộc bộ da trơn (*Siluriformes*). Cá tra là loài cá thuộc bộ da trơn, với Việt Nam là nước sản xuất lớn nhất châu Á, đặc biệt ở khu vực sông Mekong [78]. Loài cá này được xuất khẩu nhiều sang các nước phương Tây, thường thay thế cá loại cá đắt tiền như cá tuyết [79]. Hoạt động nuôi trồng diễn ra dọc sông Mekong tại An Giang, Hậu Giang và các tỉnh như Tiền Giang, Cần Thơ, Đồng Tháp, Vĩnh Long [78]. Sản lượng chiếm 30% tổng sản lượng thủy sản, xuất khẩu đến hơn 150 quốc gia [80]. Tuy nhiên, việc nuôi cá với mật độ cao, nhằm đáp ứng nhu cầu thị trường và tối đa hóa sản lượng, đã khiến nông dân phải đối mặt với các vấn đề nghiêm trọng, đặc biệt là các đợt bùng phát dịch bệnh gây thiệt hại nặng nề về kinh tế [81]. Một trong những bệnh phổ biến và nguy hiểm nhất đối với cá tra là bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây ra [82]. Việc sử dụng kháng sinh phổ biến [83] đã tạo ra vi khuẩn kháng thuốc trong môi trường nuôi [84], [85], gây khó khăn cho kiểm soát dịch bệnh [86], [87].

Một phương pháp đang được áp dụng cho các nghiên cứu về KKS trên toàn cầu đó là phương pháp Một sức khỏe do vi khuẩn KKS và gen KKS có thể di chuyển qua lại giữa con người, động vật và môi trường. Nhiều quốc gia và một số cơ quan quốc tế đã đưa phương pháp Một sức khỏe vào các kế hoạch hành động của họ để giải quyết tình trạng KKS. Các hành động cần thiết có thể được kể đến bao gồm cải thiện các quy định và chính sách sử dụng kháng sinh, giám sát, quản lý, kiểm soát nhiễm trùng, vệ sinh, chăn nuôi và các lựa chọn thay thế cho thuốc kháng sinh [88]. Vậy nên, khi nghiên cứu về tình trạng KKS của vi khuẩn tại sông Mekong, việc xem xét nghiên cứu ở động vật chăn nuôi (cá tra), môi trường (nước trong ao nuôi, nước thải từ ao nuôi, trầm tích) là rất cần thiết trong việc tìm ra nguyên nhân cũng như vị trí bị “tôn thương” trong mối quan hệ giữa con người, vật nuôi và môi trường.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

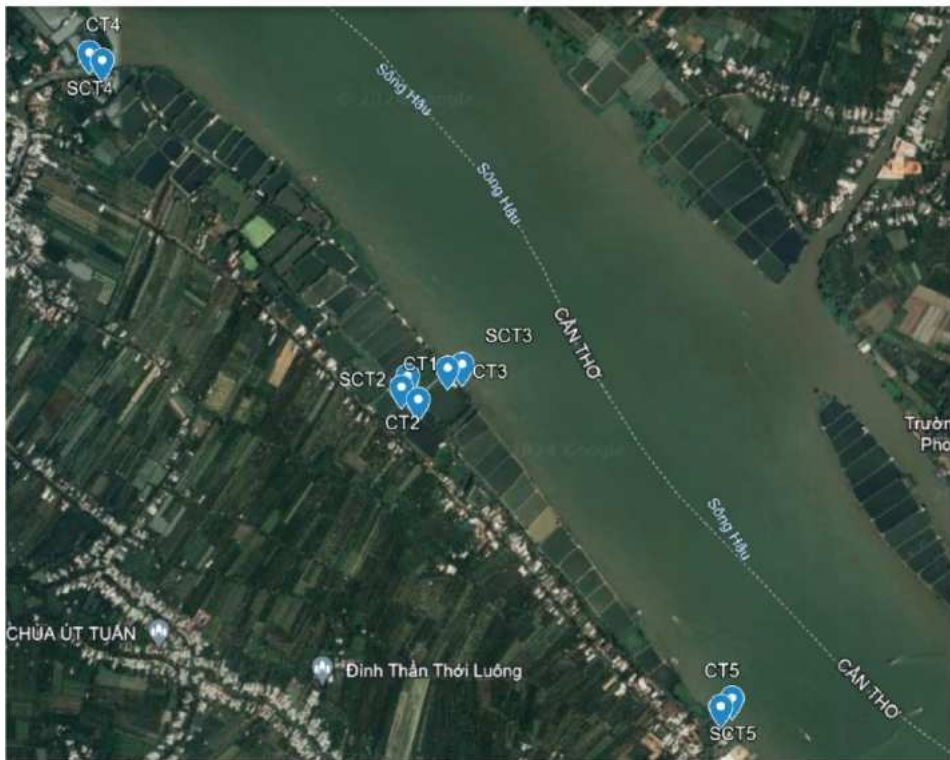
2.1. Thu và bảo quản mẫu

Mẫu nước và mẫu trầm tích được thu tại khu nuôi cá tra ở 2 tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp trong tháng 3/2024. Tại mỗi khu nuôi cá tra, các mẫu nước và trầm tích được thu thập tại khu vực bên trong ao nuôi cá tra và khu vực cấp nước/ thải nước ra sông Mekong của ao: 9 vị trí lấy mẫu ở tỉnh Cần Thơ bao gồm: trại cá Cần Thơ 1 (CT1), trại cá Cần Thơ 2 (CT2), sông trại cá Cần Thơ 2 (SCT2), trại cá Cần Thơ 3 (CT3), sông trại cá Cần Thơ 3 (SCT3), trại cá Cần Thơ 4 (CT4), sông trại cá Cần Thơ 4 (SCT4), trại cá Cần Thơ 5 (CT5), sông trại cá Cần Thơ 5 (SCT5); 8 vị trí lấy mẫu ở tỉnh Đồng Tháp bao gồm: trại cá Đồng Tháp 1 (DT1), sông trại cá Đồng Tháp 1 (SDT1), trại cá Đồng Tháp 2 (DT2), trại cá Đồng Tháp 3 (DT3), sông trại cá Đồng Tháp 3 (SDT3), trại cá Đồng Tháp 4 (DT4), sông trại cá Đồng Tháp 4 (SDT4), Sông Tiền Đồng Tháp (STDT) và tất cả vị trí lấy mẫu trên được biểu diễn tại hình 2.1.

Với các mẫu nước, ở mỗi địa điểm lấy mẫu, 10 lít (L) nước được lấy tại vị trí cách mặt nước 5 cm với 3 lần lấy khác nhau trộn đều sau đó thu vào các chai nhựa 500 mL vô trùng. Từ đây, các chai nhựa được giữ trong thùng đá trước khi được vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Với trầm tích, thu khoảng 500 g trầm tích vào các khay nhựa đựng mẫu vô trùng để đồng nhất mẫu, sau đó được chuyển vào các ống falcon 50 mL vô trùng, lưu giữ trong thùng đá trước khi được vận chuyển về phòng thí nghiệm.

A.



B.



Hình 2.1: Bản đồ lấy mẫu sông Mekong, Việt Nam biểu diễn địa điểm lấy mẫu ở tỉnh Cần Thơ (A) và ở tỉnh Đồng Tháp (B). Ứng dụng MyMap được sử dụng để đánh dấu tọa độ các địa điểm lấy mẫu (Google, Mỹ).

2.2. Xử lý mẫu

2.2.1 Xử lý mẫu cho tách chiết DNA

Với mẫu nước, 600 mL nước ở mỗi mẫu được lọc vào 2 màng 0,22 μm Cellulose acetate (Sartorius Stedim Biotech, Pháp). Sau đó các màng được cắt thành các mảnh nhỏ và đưa vào bộ kit tách chiết DNA - DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Với mẫu trầm tích ở mỗi địa điểm, cân 1 g trầm tích và cũng đưa vào bộ kit tách chiết DNA - DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Phụ lục 1).

DNA tổng số sau khi thu được sẽ được điện di trên thạch 1% agarose và chụp kết quả điện di bằng máy Benchtop UV Transilluminators (Analytik Jena, Đức). Song song với đó, mỗi mẫu DNA sẽ được kiểm tra chất lượng và đo nồng độ bằng máy Nanodrop 2000 spectrophotometers (Thermo fisher, Mỹ). Tất cả các mẫu DNA tinh khiết sẽ được bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Xử lý các mẫu cho nuôi cấy vi khuẩn

Ở mỗi địa điểm thu mẫu, mẫu nước sẽ được lọc qua 3 màng 0,22 μm Cellulose acetate (Sartorius Stedim Biotech, Pháp) với khoảng 10-30 mL nước cho mỗi màng. Các màng sẽ được đặt lên bề mặt của 3 đĩa môi trường thạch bao gồm: Chromogenic Coliform Agar (CA) (Sigma, Đức) để phân lập vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) và coliform trong nước; Thiosulfate-Citrate Bile-Sucrose Agar (TCBS) (Merck, Đức) để phân lập nhóm vi khuẩn *Vibrio*; Aeromonas isolation Medium base (Aero) (HIMEDIA, Ấn Độ) để phân lập các vi khuẩn thuộc nhóm *Aeromonas*. Các đĩa môi trường thạch được nuôi cấy ở nhiệt độ 32°C qua đêm.

Với các mẫu trầm tích, 10 mg trầm tích sẽ được hoà tan trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9% tại phòng thí nghiệm. Sau đó 10 mL nước sẽ được lọc qua 3 màng 0,2 μm Cellulose acetate (Sartorius Stedim Biotech, Pháp). Các màng cũng sẽ được đặt lên bề mặt của 3 đĩa môi trường giống với xử lý mẫu nước như mô tả ở trên.

2.3. Phân lập vi khuẩn và định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS

Vi khuẩn được chọn dựa vào hình thái và màu sắc khuẩn lạc trên màng lọc ở các đĩa môi trường thạch. Sau đó khuẩn lạc sẽ được nuôi cấy ria riêng rẽ ra các đĩa môi trường giống với môi trường đặt màng. Các đĩa môi trường này sẽ được nuôi cấy ở tủ nuôi Refrigerated Incubator Shaker (Concord, Mỹ) ở nhiệt độ 32°C qua đêm.

Các vi khuẩn phân lập được sẽ được định danh nhanh bằng phương pháp MALDI-TOF MS sử dụng máy MALDI Biotyper (Bruker, Đức). Mẫu phân tích được chuẩn bị bằng cách trộn hoặc phủ lên bằng dung dịch hợp chất hữu cơ hấp thụ năng lượng gọi là chất nền. Khi chất nền kết tinh lại sau khi sấy khô hoặc khô tự nhiên, mẫu nằm trong chất nền cũng kết tinh đồng thời. Tại đây, mẫu trong chất nền được ion hóa bằng chùm tia laze của máy MALDI Biotyper. Quá trình giải hấp và ion hóa bằng chùm tia laser tạo ra các ion proton riêng lẻ từ các chất phân tích trong mẫu. Các ion được proton hóa sau đó được gia tốc ở một điện thế cố định, trong đó chúng tách khỏi nhau dựa trên tỷ số khối lượng trên điện tích của chúng (m/z). Sau đó, các chất phân tích tích điện được phát hiện và đo bằng các loại máy phân tích khối lượng khác nhau nhưng đối với các ứng dụng vi sinh, chủ yếu sử dụng máy phân tích khối TOF. Trong quá trình phân tích MALDI-TOF, tỷ lệ m/z của một ion được đo bằng cách xác định thời gian cần thiết để nó di chuyển dọc theo chiều dài của ống bay [89]. Từ các số liệu thu được, ta có thể đối chiếu với cơ sở dữ liệu phổ của nhà sản xuất để định danh nhanh tên loài.

2.4. Xác định khả năng KKS của các chủng vi khuẩn phân lập bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Các chủng vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn đường ruột *Enterobacteria*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* có khả năng gây bệnh cho người, vật nuôi sau khi được xác định bằng phương pháp MALDI-TOF MS sẽ được nuôi cấy và làm kháng sinh đồ bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm, Mỹ (CLSI, 2020) và Ủy ban Châu Âu về Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh (EUCAST, 2021). Các kháng sinh được chọn là các kháng sinh đại diện cho mỗi nhóm kháng sinh được liệt kê ở phụ lục 2.

Vi khuẩn kháng từ 03 kháng sinh thuộc 03 nhóm thuốc kháng sinh sẽ được phân loại là VKĐKT. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Chúng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm làm đối chứng dương.

Chỉ số MAR – đánh giá tình trạng KKS của vi khuẩn được xác định bằng công thức: a/b , trong đó ‘a’ đại diện cho số lượng kháng sinh mà một chủng phân lập đã kháng và ‘b’ đại diện cho tổng số kháng sinh được thử nghiệm [90]. Điểm chỉ số MAR lớn hơn 0,2 cho thấy việc sử dụng kháng sinh nhiều ở khu vực đó và dự đoán môi trường có nguy cơ cao về sự lây lan vi khuẩn KKS [91].

2.5. Định lượng gen KKS bằng phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase thời gian thực nhắm đích (qPCR nhắm đích)

DNA tổng số tách từ các mẫu trầm tích và mẫu nước sẽ được pha loãng về nồng độ 2 ng/ μ L và được sử dụng làm DNA đầu vào trong phản ứng qPCR nhắm đích. Tổng cộng 13 cặp mồi được sử dụng cho nghiên cứu phát hiện và định lượng các gen liên quan đến KKS bao gồm: nhóm gen kháng sulfonamide (*sul1*, *sul2*), nhóm gen kháng tetracyclin (*tetX*, *tetQ*, *tetM*), nhóm gen kháng beta-lactam (*blaNDM*, *blaIMP*, *blaKPC*, *blaOXA-48*, *blaVIM*), gen kháng colistin (*mcr-1*), gen kháng vancomycin (*vanA*), gen kháng methicillin (*mecA*). Bên cạnh đó, số lượng bản sao các gen integron nhóm 1 (*intl1*, liên quan đến quá trình trao đổi gen) và gen 16S rRNA (trình tự bảo tồn ở vi khuẩn) cũng được định lượng để phân tích mối liên hệ phổ biến vi khuẩn kháng thuốc và gen KKS trong mẫu nghiên cứu. Thông tin chi tiết về trình tự, nhiệt độ bắt cặp mồi, tài liệu tham khảo được liệt kê trong bảng 2.1.

Phản ứng qPCR nhắm đích sử dụng Mastermix FastGen 2x IC green qPCR Universal mix (Nippon Gentic, Đức) với mỗi phản ứng có tổng thể tích 10 μ L bao gồm 5 μ L Mastermix, 0,4 μ L mỗi mồi, 4,2 μ L nước DNA-free (ThermoFisher, Mỹ) và 1 μ L DNA đầu vào. Nhiệt độ gắn mồi ở mỗi gen được nêu trong bảng 2.1. Để xác nhận phản ứng qPCR diễn ra bình thường, 1 phản ứng với DNA dương tính và 1 phản ứng không có DNA đầu vào sẽ được thực hiện đồng thời với các lần thực hiện thí nghiệm.

Bên cạnh đó, sản phẩm PCR mẫu đối chứng dương của các gen được tinh sạch bằng bộ kit GenJET PCR purification kit (Thermo fisher, Mỹ). Các bản sao DNA này sẽ được đo nồng độ bằng máy Nanodrop 2000

spectrophotometers (Thermo fisher, Mỹ) để kiểm tra độ tinh sạch cũng như nồng độ DNA. Sử dụng phần mềm NEBioCalculator v1.15.7 (New England Biolabs, USA), ta tính được số bản sao của gen như sau:

Số mol DNA mạch đôi (mol) = Khối lượng DNA mạch đôi (g)/((Độ dài của DNA mạch đôi (bp) x 615,96 g/mol/bp) + 36,04 g/mol)

Số bản sao DNA = số mol DNA mạch đôi x $6,022 \times 10^{23}$ phân tử/mol

Sau khi có được số bản sao DNA của các gen quan tâm, tiến hành pha loãng sản phẩm PCR thành các dải nồng độ từ 10^1 đến 10^{10} . Các nồng độ DNA đầu vào này sẽ được sử dụng cho phản ứng qPCR để tạo đường chuẩn cho phân tích số lượng tuyệt đối bản sao gen trong từng mẫu nghiên cứu.

Bảng 2.1: Thông tin các cặp mồi bao gồm trình tự DNA, nhiệt độ bắt cặp trong phản ứng qPCR, nhiệt độ nóng chảy và chiều dài đoạn gen được nhân lên sử dụng trong phản ứng qPCR nhắm đích.

S T T	Tên gen	Tên mồi	Trình tự DNA	Nhiệt độ bắt cặp	Nhiệt độ nóng chảy	Chiều dài	Tham khảo
1	16S rRNA	16S rRNA -R	5'-TGTGTAGCGGTGAAATGCG-3'	62°C	~85°C	140	[92]
		16S rRNA -F	5'-CATCGTTTACGGCGTGGAC-3'				
2	sul1	sul1-R	5'-CGCACCGGAAACATCGCTGCAC-3'	65	87-88°C	163	[93]
		sul1-F	5'-TGAAGTTCGCGCAAGGCTCG-3'				
3	sul2	sul2-F	5'-TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG-3'	57,5°C	~90°C	191	[93]
		sul2-R	5'-CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG-3'				
4	tetX	tetX-F	5'-AGCCTTACCAATGGGTGTA-3'	57	81°C	278	[94]
		tetX-R	5'-TTCTTACCTTGGACATCCCG-3'				
5	tetQ	tetQ-F	5'-AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG-3'	63	82°C	167	[95]
		tetQ-R	5'-CGGAGTGTCAATGATATTGCA-3'				
6	tetM	tetM-F	5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3'	55	80°C	171	[96]
		tetM-R	5'-TGGCGTGTCTATGATGTTAC-3'				
7	blaNDM	blaNDM-F	5'-AACACAGCCTGACTTTCG-3'	55	80-82°C	111	[97]
		blaNDM-R	5'-TGATATTGTCCTGGTGTGG-3'				
8	blaIMP	blaIMP-F	5'-TTGACTCCATTTACTGCTA-3'	55	80-82°C	172	[98]
		blaIMP-R	5'-TCATTTGTTAATTCAGATGCATA-3'				
9	blaKPC	blaKPC-F	5'-GATACCACGTTCCGTCTGG-3'	58	84-87°C	246	[99]
		blaKPC-R	5'-GCAGTTCCGGTTTGTCTC-3'				

S T T	Tên gen	Tên mồi	Trình tự DNA	Nhiệt độ bắt cặp	Nhiệt độ nóng chảy	Chiều dài	Tham khảo
10	<i>blaOXA</i>	<i>blaOXA-48F</i>	5'-AGGCACGTATGAGCAAGATG-3'	60	88-89°C	189	[100]
		<i>blaOXA-48R</i>	5'-TGGCTTGTTTGACAATACGC-3'				
11	<i>VIM</i>	<i>VIM-F</i>	5'-GAGTTGCTTTTGATTGATACAG-3'	55	90-93°C	247	[98]
		<i>VIM-R</i>	5'-TCGATGAGAGTCCTTCTAGA-3'				
12	<i>Mcr-1</i>	<i>Mcr-1-F</i>	5'-TCCAAAATGCCCTACAGACC-3'	59	85°C	205	[101]
		<i>Mcr-1-R</i>	5'-GCCACCACAGGCAGTAAAAT-3'				
13	<i>vanA</i>	<i>vanA-F</i>	5'-GGCAAGTCAGGTGAAGATG-3'	60	90°C	163	[102]
		<i>vanA-R</i>	5'-ATCAAGCGGTCAATCAG-3'				
14	<i>mecA</i>	<i>mecA-F</i>	5'-TCCAGATTACAACCTCACCAGG-3'	58	74°C	162	[99]
		<i>mecA-R</i>	5'-CCACTTCATATCTGTAAACG-3'				
15	<i>Int1</i>	<i>int1-F</i>	5'-GCC TTG ATG TTA CCC GAG AG-3'	60	92°C	96	[103]
		<i>int1-R</i>	5'-GAT CGG TCG AAT GCG TGT-3'				

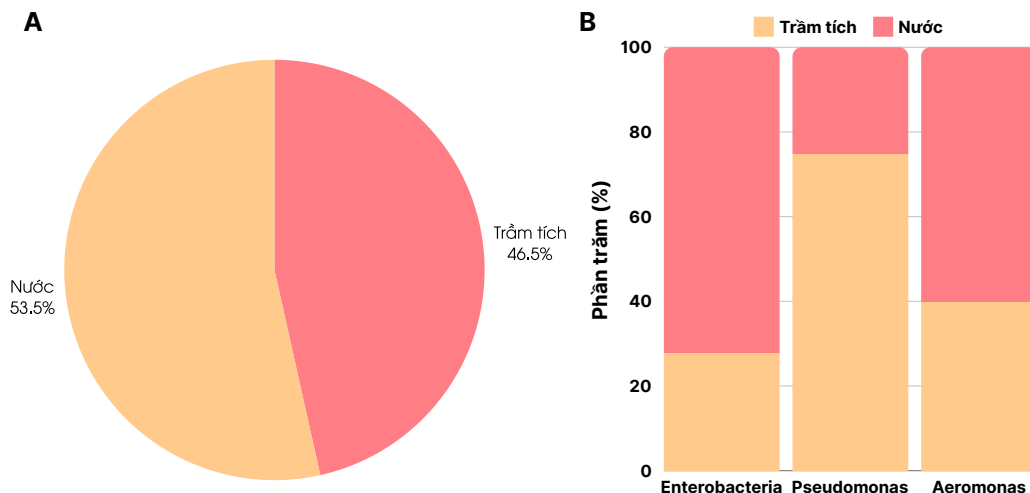
2.6. Xử lý số liệu

Sử dụng Microsoft Excel và RStudio để thống kê, xử lý tổng hợp dữ liệu và làm các bảng biểu diễn.

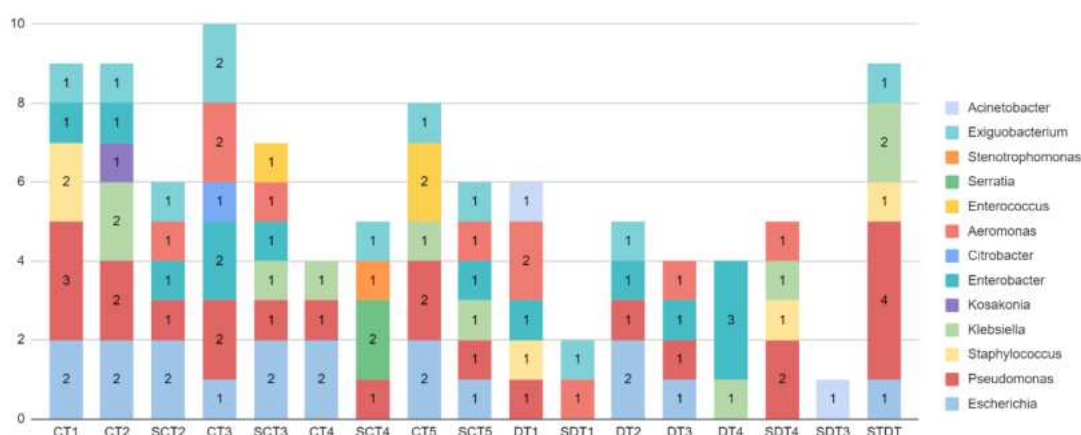
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh vi khuẩn

Từ phân lập đặc điểm hình thái kiểu hình, tổng số 159 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ các mẫu môi trường, và bằng phương pháp MALDI-TOF MS, đã định danh được 105 chủng vi khuẩn, trong đó, các chủng vi khuẩn được phân lập từ môi trường nước chiếm tỷ lệ cao hơn so với trầm tích (Xem hình 3.1 (A)). Nhóm vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae* phân lập được bao gồm *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* và *Citrobacter* (Xem hình 3.2). Bên cạnh đó các chi vi khuẩn có khả năng gây bệnh cho người như: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* và *Acinetobacter* cũng đã được phân lập. Chi vi khuẩn xuất hiện nhiều nhất trong các mẫu nghiên cứu là *Pseudomonas* (n=23), tiếp theo là *Escherichia* (n=18), *Enterobacter* (n=13), *Klebsiella* (n=10) và *Aeromonas* (n=10). Đây đều là các chi vi khuẩn có đại diện nằm trong nhóm đa kháng thuốc hoặc thường gây bệnh ở người được WHO quan tâm [21]. Chi vi khuẩn *Enterobacter* và *Aeromonas* phân bố chủ yếu ở môi trường nước cao gấp 1,5 lần trong các mẫu trầm tích. Trong khi đó *Pseudomonas* lại phân lập được chủ yếu từ các mẫu trầm tích (80%). Phù hợp với những nghiên cứu trước đó, *Enterobacter* (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, và *Citrobacter*), *Aeromonas* và *Pseudomonas* là những chi vi khuẩn phổ biến trong môi trường nước sông cũng như khu vực nuôi thủy sản [104].



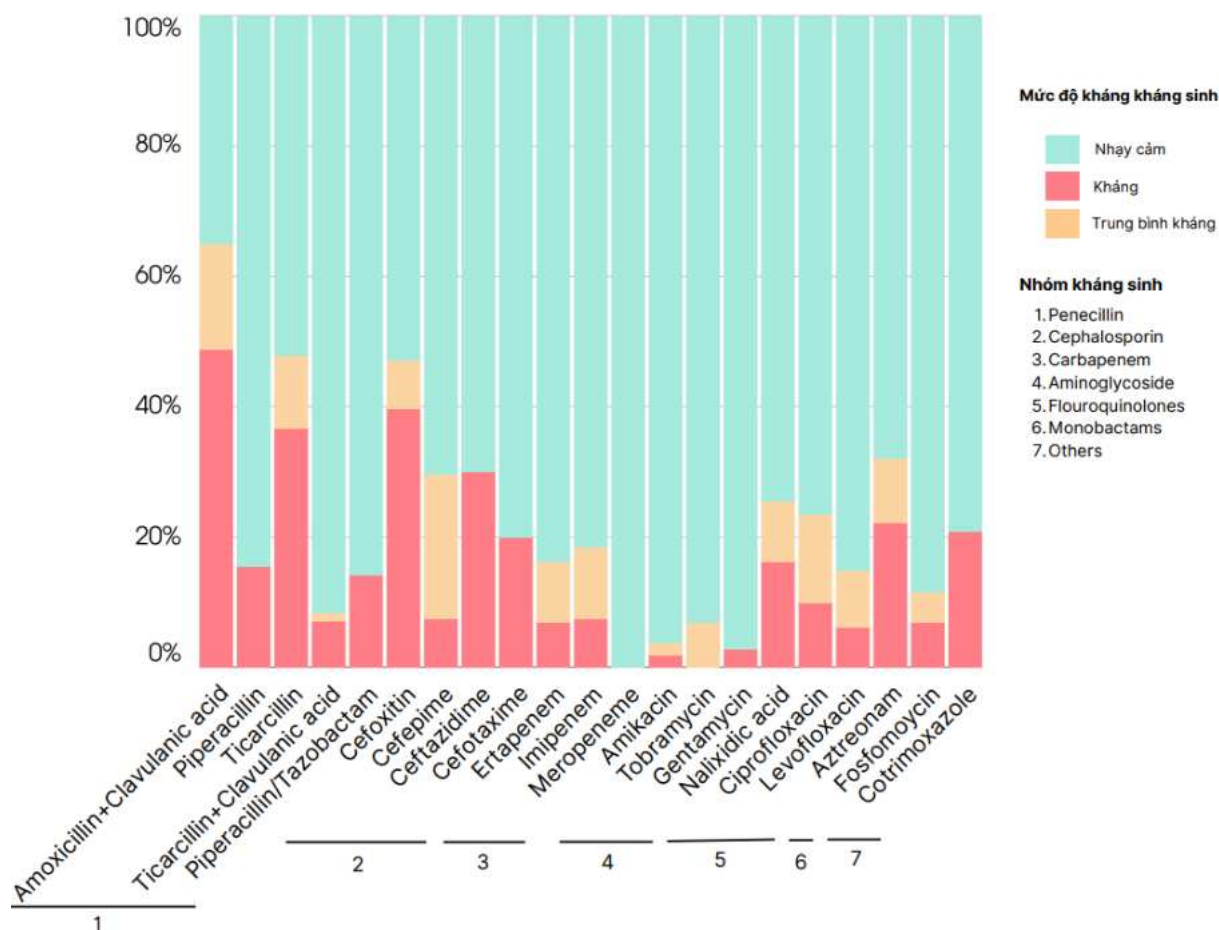
Hình 3.1: Phân trăm số lượng vi khuẩn phân lập được trên từng loại môi trường (A), phân trăm các loại vi khuẩn quan tâm trên các mẫu nước và trầm tích (B).



Hình 3.2: Phân bố các nhóm vi khuẩn tìm được theo số lượng đại diện và khu vực tìm thấy.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng KKS của các vi khuẩn phân lập được

Vi khuẩn đa phần kháng với các kháng sinh thuộc nhóm penicillin (16-50%), tiếp đó là cephalosporin thế hệ 3 (8-40%) và carbapenem (20%). Các kháng sinh có hiện tượng kháng này đều được liệt kê trong danh sách của WHO là các nhóm kháng sinh cần phải quan tâm trên vi khuẩn kháng thuốc [21]. Ngoài ra, một số kháng sinh như aztreonam, fosfomycin, cotrimoxazol cũng xuất hiện tình trạng kháng cao, lần lượt là 23%, 8% và 21%. Đây đều là những kháng sinh phổ rộng để điều trị các bệnh liên quan đến vi khuẩn đường ruột (Xem hình 3.3).



Hình 3.3: Phần trăm vi khuẩn chọn lọc và mức độ kháng của chúng với các nhóm kháng sinh theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (CLSI, 2020) và Ủy ban Châu Âu về Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh (EUCAST, 2021).

Nhìn chung, họ vi khuẩn đường ruột với các đại diện *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Echerichia coli* và *Citrobacter freundii* có xu hướng kháng nhiều với nhóm kháng sinh penicillin, và kháng các kháng sinh khác ở mức trung bình (Xem hình 3.4 và Phụ lục 7).

Xét riêng nhóm kháng sinh penicillin, hai kháng sinh nổi lên là có tình trạng kháng và trung bình kháng cao trong nhóm này là amoxicillin – axit clavulanic và ticarcillin. Trong một nghiên cứu về các vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* tại ao nuôi tôm tại khu vực sông Mekong, người ta tìm ra được có tới 88% vi khuẩn kháng với kháng sinh amoxicillin [105]. Như vậy có thể nói tình trạng KKS với amoxicillin là rất phổ biến trong các ao nuôi trồng thủy sản tại khu vực sông Mekong. Mặc dù có sự kết hợp sử dụng axit

clavulanic, tuy nhiên mức độ KKS này vẫn tương đối cao (60%). Còn với kháng sinh ticarcillin, một nghiên cứu phân tích vi khuẩn *Salmonella* phân lập được trong các mẫu thịt lợn, bò, gà ở các chợ khu vực sông Mekong tìm ra được có tới 48,6% vi khuẩn kháng với kháng sinh này [106]. Điều này do đó cũng chỉ ra rằng cùng với amoxicillin, mức độ phổ biến sử dụng ticarcillin trong thủy sản nói chung và trong ngành chăn nuôi nói riêng đang trong tình trạng báo động ở khu vực sông Mekong, Việt Nam.

Xét trong loài *Klebsiella pneumoniae*, nhiều đại diện tìm thấy có khả năng kháng trên 3 loại kháng sinh (3/7 vi khuẩn phân lập, thậm chí có vi khuẩn kháng 9 loại kháng sinh trong đó có kháng sinh thuộc nhóm flouroquinolones, monobactam). Được biết, *Klebsiella pneumoniae* là một trong những vi khuẩn có khả năng kháng cao với flouroquinolones trong họ vi khuẩn đường ruột [107]. Điều này trùng khớp với nghiên cứu này, khi có 2/7 vi khuẩn phân lập được kháng với cả 3 kháng sinh thuộc nhóm này.

Với *Echerichia coli*, tình trạng kháng đa kháng sinh cũng rất phổ biến với 4/15 vi khuẩn phân lập được kháng trên 3 loại kháng sinh. Các vi khuẩn *Echerichia coli* ở mỗi vị trí tìm được đều có hồ sơ KKS khác nhau, trải đều ở các loại kháng sinh thử nghiệm. Trong đó, đáng chú ý có một cá thể vi khuẩn *Echerichia coli* có khả năng kháng tới 9/18 kháng sinh được thử nghiệm đặc biệt là các nhóm kháng sinh thuộc nhóm carbapenem.

Tiếp theo là nhóm *Enterococcus*, đây là nhóm có 2 đại diện là *Enterococcus hirae*, *Enterococcus casseliflavus*. Ở nhóm này, có 2/3 vi khuẩn kháng từ 3 thuốc kháng sinh trở lên, 2 vi khuẩn này đều là *Enterococcus hirae* và hồ sơ kháng của 2 vi khuẩn trải đều ra các nhóm kháng sinh thử nghiệm. Xét các nghiên cứu trước đó về vi khuẩn ở sông Mekong, mặc dù không tìm ra được báo cáo nào liên quan đến vi khuẩn *Enterococcus hirae* vì không thường xuyên gây bệnh ở người nhưng báo cáo này đã tìm ra được vi khuẩn *Enterococcus hirae* tiềm năng, có thể coi là mầm bệnh KKS.

Với nhóm *Enterobacteria*, đây là nhóm có 5 đại diện là *Enterobacter roggkampii*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter bugandensis*. Các đại diện thuộc nhóm này đa phần kháng dưới 3 loại kháng sinh. Chỉ có 3/15 cá thể kháng trên 3 loại kháng sinh thuộc loài *Enterobacter roggkampii*, *Enterobacter bugandensis*. Kháng sinh mà phần lớn các đại diện thuộc nhóm này kháng là amoxicillin - axit clavulanic

và cefoxitin. Các vi khuẩn đa kháng còn kháng thêm các kháng sinh thuộc nhóm beta-lactam như ertapenem và imipenem.

Một đại diện duy nhất thuộc nhóm *Citrobacter* là *Citrobacter freundii*, vi khuẩn này kháng một nửa số kháng sinh được thử nghiệm (9/18 loại kháng sinh). Trong một nghiên cứu về vi khuẩn trong cá sông ở khu vực miền Nam Việt Nam năm 2022, các vi khuẩn *Citrobacter freundii* thường xuyên được tìm thấy các gen kháng carbapenem như *NDM-1* [108]. Điều này cho thấy tình trạng KKS carbapenem ở loài vi khuẩn này là tương đối phổ biến ở sông Mekong, Việt Nam nói chung, và miền Nam, Việt Nam nói riêng.

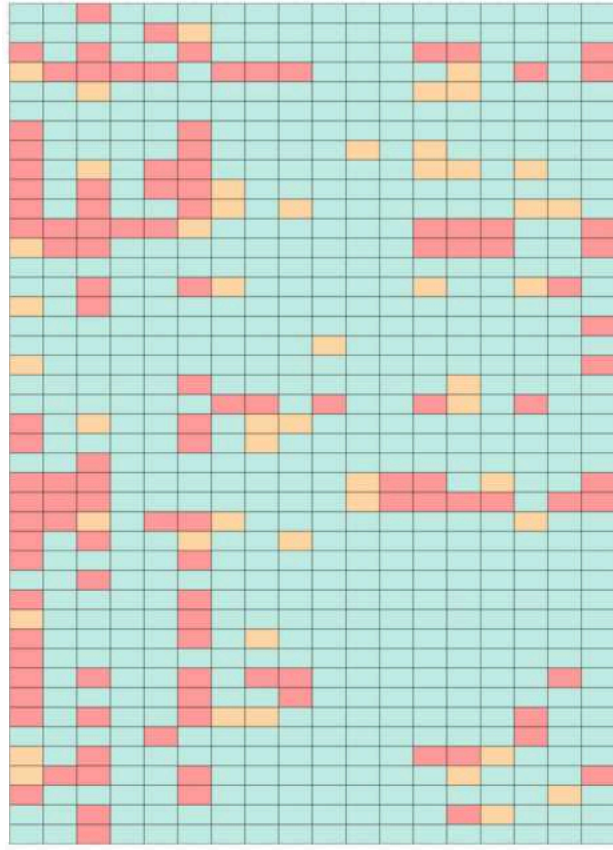
Tình trạng KKS ở các loài vi khuẩn thuộc họ vi khuẩn đường ruột trong môi trường sông Mekong, Việt Nam, đã được nhiều nghiên cứu quan tâm và chỉ ra những kết quả đáng báo động. Nghiên cứu này, cũng như nghiên cứu về *Echerichia coli* từ cá nuôi và cá tự nhiên ở sông Mekong vào năm 2014 [109], đều cho thấy tỷ lệ KKS cao ở các loài vi khuẩn này. Cụ thể, các loài vi khuẩn như *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Echerichia coli* và *Citrobacter freundii* có xu hướng kháng cao với nhóm kháng sinh penicillin, đặc biệt là amoxicillin – axit clavulanic và ticarcillin. Tình trạng kháng đa kháng sinh cũng phổ biến, đặc biệt ở *Klebsiella pneumoniae* và *Echerichia coli*, với một số chủng *Echerichia coli* thậm chí còn kháng tới 9/18 loại kháng sinh được thử nghiệm, bao gồm cả nhóm carbapenem đáng lo ngại. Tương tự, nghiên cứu năm 2014 cũng ghi nhận tỷ lệ kháng cao với nhiều loại kháng sinh, bao gồm penicillin, cephalosporin thế hệ 3 và fluoroquinolone ở các chủng *Echerichia coli*. Điều này cho thấy sự tương đồng đáng kể giữa hai nghiên cứu về tình trạng KKS cao ở các loài thuộc họ vi khuẩn đường ruột trong môi trường sông Mekong. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã mở rộng phạm vi phân tích bằng cách xem xét nhiều loài vi khuẩn hơn và đánh giá khả năng kháng với các nhóm kháng sinh khác như fluoroquinolone và carbapenem, qua đó cung cấp một sự toàn diện hơn về tình trạng KKS trong khu vực.

Như vậy, việc mà các nghiên cứu tìm ra các VKĐKT trong các mẫu nước và trầm tích ở hầu hết các ao và sông cạnh ao là một bằng chứng cho thấy hiện tượng đa kháng thuốc đang xảy ra phổ biến tại tất cả các trại nuôi cá tra. Điều này có thể dẫn tới việc lan toả vi khuẩn kháng thuốc từ trong các ao ra ngoài môi trường cũng như ảnh hưởng tới sức khỏe của người sử dụng thực phẩm khi vi khuẩn trong cá tra được tiếp xúc với cơ thể con người.

A

Tên mẫu

CT_W_Ao_Klebsiella pneumoniae
 CT_W_Ao_Klebsiella aerogenes
 CT_W_Ao_Escherichia coli
 CT_W_Ao_Escherichia coli
 CT_W_Ao_Escherichia coli
 CT_W_Ao_Escherichia coli
 CT_W_Ao_Enterococcus casseliflavus
 CT_W_Ao_Enterobacter hormaechei
 CT_W_Ao_Enterobacter cloacae
 CT_W_Ao_Enterobacter cloacae
 CT_W_Ao_Enterobacter cloacae
 CT_W_Ao_Citrobacter freundii
 CT_W_Sông_Klebsiella pneumoniae
 CT_W_Sông_Escherichia coli
 CT_W_Sông_Enterobacter roggkampii
 CT_S_Ao_Klebsiella pneumoniae
 CT_S_Ao_Escherichia coli
 CT_S_Ao_Escherichia coli
 CT_S_Ao_Escherichia coli
 CT_S_Ao_Escherichia coli
 CT_S_Ao_Enterococcus hirae
 CT_S_Ao_Enterobacter kobei
 CT_S_Ao_Enterobacter cloacae
 CT_S_Sông_Klebsiella pneumoniae
 CT_S_Sông_Escherichia coli
 DT_W_Ao_Klebsiella pneumoniae
 DT_W_Ao_Klebsiella aerogenes
 DT_W_Ao_Escherichia coli
 DT_W_Ao_Escherichia coli
 DT_W_Ao_Enterobacter roggkampii
 DT_W_Ao_Enterobacter kobei
 DT_W_Ao_Enterobacter hormaechei
 DT_W_Ao_Enterobacter cloacae
 DT_W_Ao_Enterobacter cloacae
 DT_W_Ao_Enterobacter bugandensis
 DT_W_Ao_Enterobacter bugandensis
 DT_W_Sông_Klebsiella pneumoniae
 DT_W_Sông_Klebsiella pneumoniae
 DT_W_Sông_Escherichia coli
 DT_W_Sông_Enterococcus hirae
 DT_W_Sông_Enterobacter bugandensis
 DT_S_Ao_Escherichia coli
 DT_S_Ao_Escherichia coli



Mức độ kháng kháng sinh

- Nhạy cảm
- Kháng
- Trung bình kháng

Nhóm kháng sinh

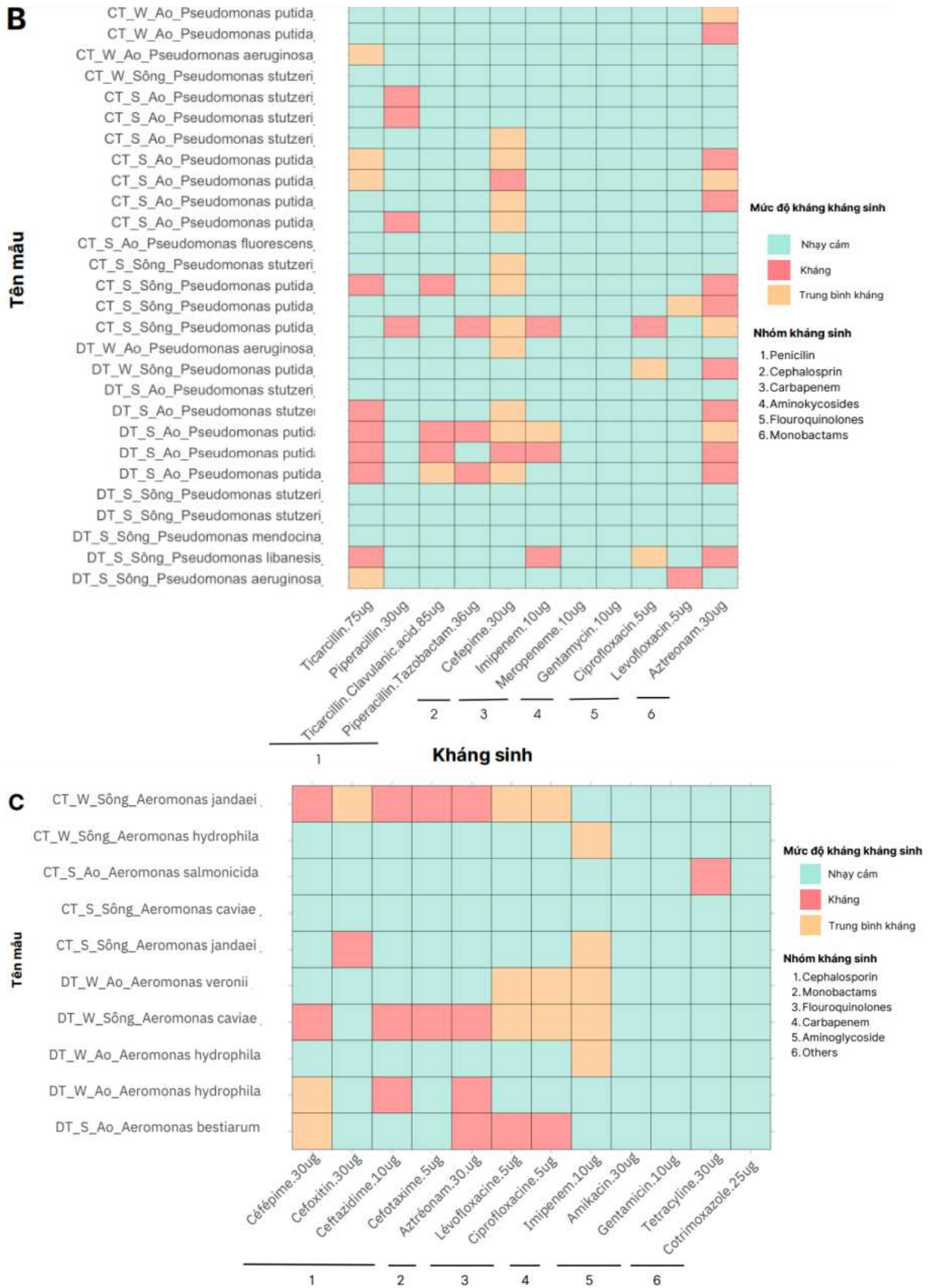
1. Penicillin
2. Cephalosporin
3. Carbapenem
4. Aminoglycoside
5. Flouroquinolones
6. Monobactams
7. Others

Amoxicillin, Clavulanic acid 30ug
 Piperacillin 30ug
 Ticarcillin 75ug
 Piperacillin/Clavulanic acid 30ug
 Piperacillin/Tazobactam 36ug
 Cefoxitin 30ug
 Cefepime 30ug
 Ertapenem 10ug
 Imipenem 10ug
 Amikacin 30ug
 Tobramycin 10ug
 Gentamycin 10ug
 Nalidixic acid 30ug
 Ciprofloxacin 5ug
 Levofloxacin 5ug
 Aztreonam 30ug
 Fosfomycin 200ug
 Cotrimoxazole 25ug

2 3 4 5 6 7

Kháng sinh

1

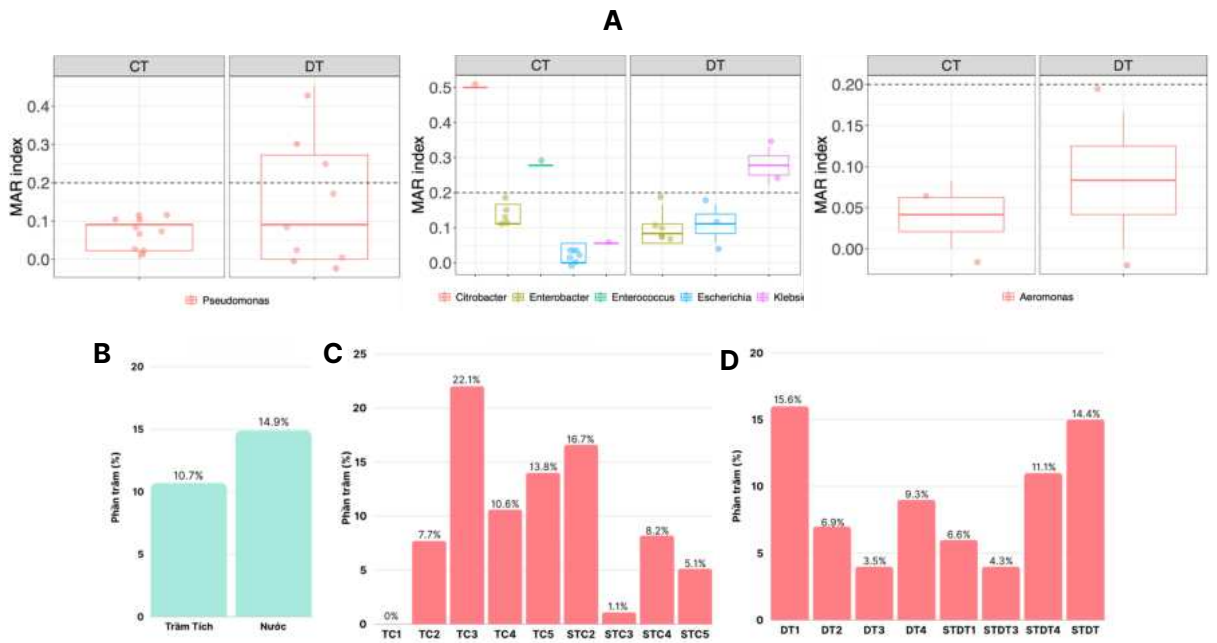


Hình 3.4: Mức độ kháng của vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* với các kháng sinh chọn lọc (A), mức độ kháng của vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* với các kháng sinh chọn lọc (B), mức độ kháng của vi khuẩn thuộc chi

Aeromonas với các kháng sinh chọn lọc (C). Kháng sinh được chọn theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (CLSI, 2020) và Ủy ban Châu Âu về Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh (EUCAST, 2021).

Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ số MAR của vi khuẩn phân lập từ nước cao hơn đáng kể so với vi khuẩn từ trầm tích. Điều này chỉ ra rằng vi khuẩn trong nước có xu hướng kháng lại nhiều loại kháng sinh hơn. Có một số nguyên nhân tiềm ẩn cho sự khác biệt này. Thứ nhất, môi trường nước dễ bị ô nhiễm hơn trầm tích do tiếp xúc trực tiếp với nhiều nguồn ô nhiễm khác nhau, bao gồm nước thải sinh hoạt, công nghiệp, nông nghiệp và đặc biệt là từ các hoạt động nuôi trồng thủy sản. Các chất ô nhiễm này, bao gồm cả kháng sinh, có thể tạo áp lực chọn lọc, thúc đẩy sự phát triển và lan truyền của vi khuẩn kháng thuốc. Thứ hai, môi trường nước cũng tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiếp xúc và trao đổi gen giữa các vi khuẩn, bao gồm cả các gen KKS, dẫn đến sự gia tăng nhanh chóng của vi khuẩn kháng thuốc. Trong khi đó, trầm tích tuy có thể hoạt động như một "bể chứa" cho vi khuẩn, nhưng do điều kiện môi trường ổn định hơn và ít tiếp xúc với các nguồn ô nhiễm mới, tốc độ phát triển và lan truyền của vi khuẩn kháng thuốc trong trầm tích có thể chậm hơn so với trong nước.

Xét MAR của từng vị trí lấy mẫu ở Cần Thơ và Đồng Tháp. Ở Cần Thơ, Có những khu vực ao nuôi trồng thủy sản có tỉ lệ MAR cao như các ao CT2, CT3, CT4, CT5 với lần lượt là 7,7%, 22,1%, 10,6%, 13,8%. Tuy nhiên các sông phát thải cạnh ao tương ứng lại có tỉ lệ MAR thấp như STC3, STC5 với lần lượt 1,1% và 5,1%. Điều này có thể do dòng nước thải khi đi ra ngoài sông đã đưa vi khuẩn kháng thuốc phát tán ra các khu vực khác (Xem hình 3.5 (C) và hình 3.5 (D)).



Hình 3.5: Chỉ số MAR giữa các họ vi khuẩn đường ruột, *Pseudomonas*, và *Aeromonas* (A), các mẫu trầm tích và nước (B), giữa các mẫu ở Cần Thơ, Việt Nam (C), giữa các mẫu ở Đồng Tháp, Việt Nam (D).

Tình trạng KKS tại Cần Thơ và Đồng Tháp, Việt Nam đang là một vấn đề đáng quan ngại, được phản ánh qua nhiều nghiên cứu gần đây. Nghiên cứu này, với việc tập trung vào vi khuẩn phân lập từ môi trường nước và trầm tích, đã ghi nhận 26,7% vi khuẩn *Escherichia coli* có khả năng kháng đa kháng sinh (Kháng từ 3 thuốc kháng sinh trở lên). Tình trạng này cũng được ghi nhận ở nghiên cứu về *Salmonella*, một nhóm VKGB cũng thuộc nhóm vi khuẩn đường ruột vào năm 2021 tại các trại và khu dân cư ở khu vực sông Mekong, với tất cả các chủng *Salmonella* phân lập được đều kháng ít nhất một loại kháng sinh, và nhiều vi khuẩn trong chi này xuất hiện tình trạng đa kháng [99]. Kết hợp với kết quả trong nghiên cứu này, ta có thể thấy tình trạng KKS đáng báo động ở các vi khuẩn đường ruột như *Escherichia coli* và chi *Salmonella* trong môi trường tại các khu nuôi cá tại Cần Thơ, Việt Nam.

So sánh với nghiên cứu về khả năng KKS của *Pseudomonas* và *Aeromonas* phân lập từ các ao nuôi cá năm 2014 chỉ số MAR trung bình trong nghiên cứu này (14,9% đối với mẫu nước và 10,7% đối với mẫu trầm tích) thấp hơn so với chỉ số MAR của *Pseudomonas* 45,7% và *Aeromonas* 29,3% phân lập được [86]. Điều này gợi ý rằng vi khuẩn phân lập từ môi trường nuôi trồng

thủy sản có thể có mức độ KKS khác nhau giữa các ao nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng việc so sánh trực tiếp các giá trị MAR giữa các nghiên cứu là không hoàn toàn chính xác do sự khác biệt trong phương pháp tính toán và các loại kháng sinh được sử dụng. Với nghiên cứu trước đó, các kháng sinh phần lớn được sử dụng là các kháng sinh phổ biến được sử dụng như sulfonamide, tetracyclin, ... Còn với các kháng sinh trong nghiên cứu này, một phần không nhỏ các kháng sinh được sử dụng sẽ thuộc nhóm carbapenem - nhóm kháng sinh thuộc nhóm “Phương thuốc cuối cùng” trong việc điều trị KKS vi khuẩn trên người [110]. Mặc dù vậy, trong số các vi khuẩn *Pseudomonas* và *Aeromonas* tìm được, phần lớn đều tìm thấy tình trạng kháng trung bình hoặc kháng với các thuốc thuộc nhóm này.

So sánh giữa chỉ số MAR của Cần Thơ (CT) và Đồng Tháp (DT), có thể thấy với nhóm *Pseudomonas*, ở DT có chỉ số này cao hơn so với các vi khuẩn ở CT. Với chỉ số MAR ở DT là 0,3, so với 0,1 ở CT. Tuy nhiên ở cả hai vùng, chỉ số MAR đều ở mức dưới 0,2 cho thấy nhóm *Pseudomonas* đa kháng thuốc vẫn ở mức chưa thực sự quan ngại ở cả hai nơi này. Ngoài ra một xu hướng tương tự cũng xuất hiện với nhóm *Aeromonas*, với chỉ số MAR ở CT và DT lần lượt là 0,05 và 0,1. Điều này đối lập với một nghiên cứu ở vi khuẩn phân lập từ cá tra ở sông Mekong vào năm 2014 với chỉ số MAR có giá trị trung bình lần lượt là 0,457 và 0,293 với các chủng *Pseudomonas* và *Aeromonas* [86]. Tương tự cũng đã ghi nhận chỉ số MAR cao (0,4 đến 0,66) với loài *Aeromonas hydrophila* phân lập trên cá tra năm 2023. Tuy nhiên điểm chung của cả hai nghiên cứu vừa nêu là đều thí nghiệm trên các kháng sinh được dùng phổ biến trong môi trường như amoxicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, ... Còn với nghiên cứu này, các kháng sinh được sử dụng là các kháng sinh thuộc cùng nhóm nhưng khác loại và có thêm thử nghiệm với kháng sinh thuộc nhóm carbapenem, do đó chỉ số MAR của *Aeromonas* và *Pseudomonas* trở nên thấp hơn. Như vậy, nghiên cứu này đã bổ sung thêm vào hồ sơ kháng của các chủng *Aeromonas* và *Pseudomonas* phân lập được ở khu vực Mekong, Việt Nam. Góp phần làm rõ hơn về tình trạng của loại vi khuẩn này tại đây.

Xem xét đặc biệt vào các nhóm vi khuẩn đường ruột ở CT. Với *Citrobacter* (n=1, MAR = 0,5), dù chỉ có một cá thể *Citrobacter freundii* được phân lập nhưng cá thể đó đã kháng tới một nửa số kháng sinh được thử nghiệm, cho thấy mối nguy hiểm tiềm tàng mà loài này đóng góp. Mặc dù, ở mẫu DT,

không có sự xuất hiện của loài này nhưng cũng ghi nhận một sự vượt trội ở loài *Klebsiella* so với cùng loại vi khuẩn ở mẫu CT. Một họ vi khuẩn khác ở CT cho thấy mức độ kháng vượt trội là *Enterococcus*. Dù không tìm thấy đại diện này ở các mẫu DT nhưng với việc đại diện này có chỉ số MAR vượt trội với các loài gây bệnh khác ở vi khuẩn đường ruột thì đây cũng được xem như mối nguy hại tàng.

Mặc dù các nghiên cứu hiện nay sử dụng các phương pháp và tập trung vào các loài vi khuẩn khác nhau, kết hợp với nghiên cứu này, đã chỉ ra một thực tế đáng lo ngại: tình trạng KKS ở khu vực sông Mekong, Việt Nam đang ở mức báo động. Đặc biệt, các vi khuẩn đường ruột như *Escherichia coli* và *Salmonella*, các nhóm gây bệnh trên người như *Pseudomonas* và *Aeromonas* cũng như vi khuẩn từ môi trường nuôi trồng thủy sản, đang thể hiện khả năng kháng đáng kể với nhiều loại kháng sinh.

Ở Tây và Nam Á, các phân lập *Aeromonas* spp. biểu hiện tỷ lệ kháng cao với tetracyclin, sulfonamid, aminoglycoside, monobactam, carbapenem và cephalosporin, cùng với khả năng kháng vừa phải với fluoroquinolone, cho thấy các lựa chọn điều trị để kiểm soát nhiễm trùng *Aeromonas* xâm lấn hoặc không tự giới hạn có thể đã bị hạn chế ở tiểu vùng này so với hồ sơ kháng thuốc thấp hơn được báo cáo bên ngoài Châu Á [85], [110]. Tỷ lệ kháng carbapenem cao từ *Aeromonas* spp. cũng được xác định ở tiểu vùng này. *Aeromonas* spp. sản xuất metallo-beta-lactamase có thể gây cảm ứng, có khả năng kháng ampicillin, amoxicillin – axit clavulanic và cefazolin và được biết là biểu hiện gen mã hóa carbapenemase (cphA) mà tầm quan trọng của gen này vẫn chưa được biết [111]. Nghiên cứu gần đây xác định tác nhân gây bệnh ở cá *Aeromonas allosaccharophila* là nguồn gốc của gen cephalosporinase di động, mang lại khả năng kháng beta-lactam và có thể liên quan đến việc sử dụng thuốc kháng khuẩn trong nuôi trồng thủy sản [112]. Trong khi thuốc kháng khuẩn beta-lactam được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản [113] theo tìm hiểu qua các dẫn liệu, carbapenem không được sử dụng. Khả năng kháng carbapenem gia tăng được xác định ở Tây Á và Nam Á có thể phản ánh khả năng kháng có thể gây ra khi tiếp xúc nhiều với thuốc kháng khuẩn beta-lactam trong môi trường ở tiểu vùng này và, kết hợp với khả năng kháng carbapenem ngày càng tăng ở *Aeromonas* spp. được báo cáo gần đây từ các khu vực khác có thể cần được điều tra thêm [114].

Dù có sự khác biệt giữa các tiểu vùng và tác nhân gây bệnh truyền qua thực phẩm, có thể thấy tỷ lệ kháng cao đối với cephalosporin thế hệ ba và bốn, phù hợp với xu hướng đã được ghi nhận trong chăn nuôi [115]. Tỷ lệ kháng ceftriaxone, ceftazidime và cefotaxime ở *Escherichia coli* là 27,1% trên toàn khu vực nghiên cứu, nhưng tăng lên gần 40% ở Tây và Nam Á và vượt quá 50% ở ĐNÁ. Điều này cho thấy sự kháng cephalosporin thế hệ ba đã lan rộng trong một số loài thuộc họ *Enterobacteriaceae* ở Châu Á. Sự kháng thuốc ở *Escherichia coli* có thể liên quan đến ô nhiễm phân từ người và động vật, phản ánh sự tích lũy các gen kháng thuốc kháng khuẩn, tương tự như quan sát thấy ở một số mầm bệnh ở người như *Shigella* [116]. Sự xuất hiện của vi khuẩn đường ruột sản xuất beta-lactam phổ rộng (ESBL), có khả năng thủy phân cephalosporin thế hệ ba, là một mối đe dọa đáng kể đối với sức khỏe cộng đồng [117]. Nghiên cứu này củng cố các báo cáo trước đó về sự tồn tại của các gen ESBL có thể được mã hóa trên plasmid, làm tăng nguy cơ CGN và mở rộng khả năng kháng thuốc, đe dọa đến hiệu quả của nhóm cephalosporin quan trọng này.

3.3. Kết quả định lượng gen KKS bằng phương pháp qPCR nhắm đích

3.3.1. Kết quả tách DNA

DNA tổng số của 17 mẫu nước, 17 mẫu trầm tích được đánh giá bằng phương pháp điện di, đo nồng độ và xác định độ tinh sạch. Kết quả đo nồng độ được biểu diễn tại phụ lục 4. Nhìn chung, nồng độ DNA các mẫu nước có độ biến thiên từ 21 ng/ μ L (CT2-W) đến 96 ng/ μ L (STDT-W), còn ở các mẫu trầm tích, nồng độ DNA có độ biến thiên cao hơn từ 29,2 ng/ μ L (DT2-S) đến 380,9 ng/ μ L (SDT3-S). Trong khi đó hệ số OD 260/280 (Là OD bức sóng hấp thụ của DNA/bức sóng hấp thụ của protein) dao động ở cả 2 loại mẫu nước và trầm tích trong khoảng từ 1,8 đến 2,0. Thông thường, OD 260/280 > 1,8 được xem là tinh sạch. Ở đây, có thể thấy OD 260/280 của các mẫu DNA tổng số đều đạt mức lớn hơn hoặc bằng giá trị 1,8. Các DNA tổng số thu được sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (Phụ lục 4).

3.3.2. Kết quả tạo đường chuẩn cho qPCR nhắm đích

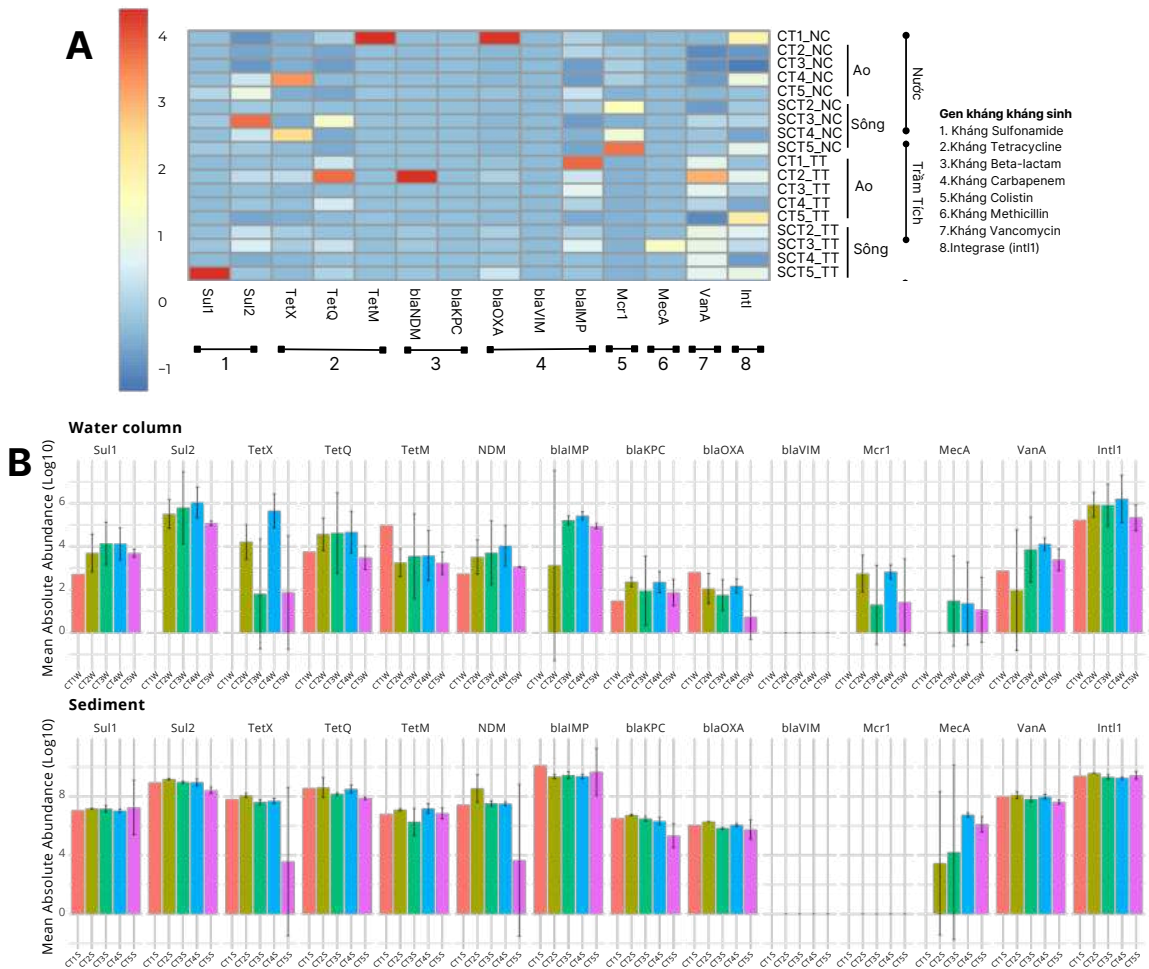
Đường chuẩn được đánh giá dựa vào các chỉ số như độ hiệu quả, hệ số tương quan (Giá trị R^2), độ dốc, hệ số chặn Y. Thông thường giá trị R^2 (là thước đo thống kê về độ tuyến tính của đường chuẩn qPCR) lý tưởng nhất khi bằng 1. Tiếp đó, độ dốc là thước đo tốc độ thay đổi giá trị chu kỳ ngưỡng (Giá trị CT) trên mỗi thay đổi của độ pha loãng log trong chuẩn định lượng và một đường chuẩn lý tưởng có độ dốc là $-3,32$. Hệ số chặn Y tương ứng với giới hạn phát hiện lý thuyết của xét nghiệm, giá trị chặn Y lý tưởng bằng số chu kỳ của phản ứng qPCR [118].

Bằng phương pháp pha loãng DNA được tinh sạch đã biết số lượng bản sao, các phản ứng qPCR được thực hiện với các nồng độ DNA khác nhau để xây dựng đường chuẩn trong việc tính số lượng bản sao. Các đường chuẩn của các gen bao gồm: 16S rRNA, *sull*, *sul2*, *tetQ*, *tetM*, ... được liệt kê tại phụ lục 5 với các chỉ số đánh giá đã được nêu ở trên. Ở phụ lục 5, có thể thấy các chỉ số của đường chuẩn đều đạt ở mức chấp nhận. Các đường chuẩn này sẽ được sử dụng để định tính bản sao DNA của các gen nhắm đích.

3.3.3. Kết quả định lượng gen KKS

Đường chuẩn của phản ứng qPCR nhắm đích được dựng tại phụ lục 5 cho phép định lượng một cách tương đối số bản sao của gen kháng ở nồng độ ban đầu. Từ đó tính được mối tương quan giữa số lượng gen kháng trên số lượng gen 16S rRNA (Được coi là trình tự bảo tồn của vi khuẩn).

Hình 3.6 và 3.7 đã biểu hiện chi tiết về sự phong phú tương đối của 13 gen KKS, bao gồm *sull* và *sul2* (liên quan đến kháng sulfonamide), *tetX*, *tetM*, và *tetQ* (liên quan đến kháng tetracyclin), *NDM* và *KPC* (liên quan đến kháng beta-lactam), *OXA*, *VIM*, và *IMP* (liên quan đến kháng carbapenem), *mcr-1* (liên quan đến kháng colistin), *mecA* (liên quan đến kháng methicillin), và *vanA* (liên quan đến kháng vancomycin). Để đánh giá mức độ phong phú này, kết quả được tính toán bằng cách chia số lượng bản sao của từng gen KKS cho số lượng bản sao của gen 16S rRNA trong cùng một mẫu, từ đó cung cấp một chỉ số tương đối về sự hiện diện của các gen KKS trong môi trường nghiên cứu.



Hình 3.6: Sự phong phú tuyệt đối của 13 gen KKS và *int11* tại Cần Thơ, Việt Nam (A) Ở các mẫu nước và mẫu trầm tích (B) Chuẩn hoá = \log_{10} của sự phong phú tuyệt đối (Số bản sao/g với mẫu trầm tích, và số bản sao/mL với mẫu nước).

Tỷ lệ xuất hiện của 13 gen KKS tại các mẫu ở Cần Thơ đã được trình bày chi tiết trong hình 3.6 (A). Trước hết, ở môi trường nước, các gen KKS được phát hiện là *sul1*, *tetQ*, *tetM*, *NDM*, *KPC* và *IMP* xuất hiện ở tất cả 9 mẫu (100%).

Ở mẫu trầm tích, các gen kháng sulfonamide, tetracyclin và carbapenem cũng hiện diện ở tất cả 9 mẫu. Gen kháng vancomycin (*VanA*) và carbapenem (*NDM*) được tìm thấy ở 8/9 mẫu.

Sự hiện diện phổ biến của các gen như *sul1*, *tetQ*, *tetM* ở cả các môi trường tại các trang trại nuôi cá tra khu vực Cần Thơ, cho thấy sự phổ biến gen KKS trong hệ sinh thái. Mặt khác, sự xuất hiện riêng biệt của một số gen KKS, như *IMP* trong mẫu nước, chỉ ra những nguồn ô nhiễm và con đường lây truyền

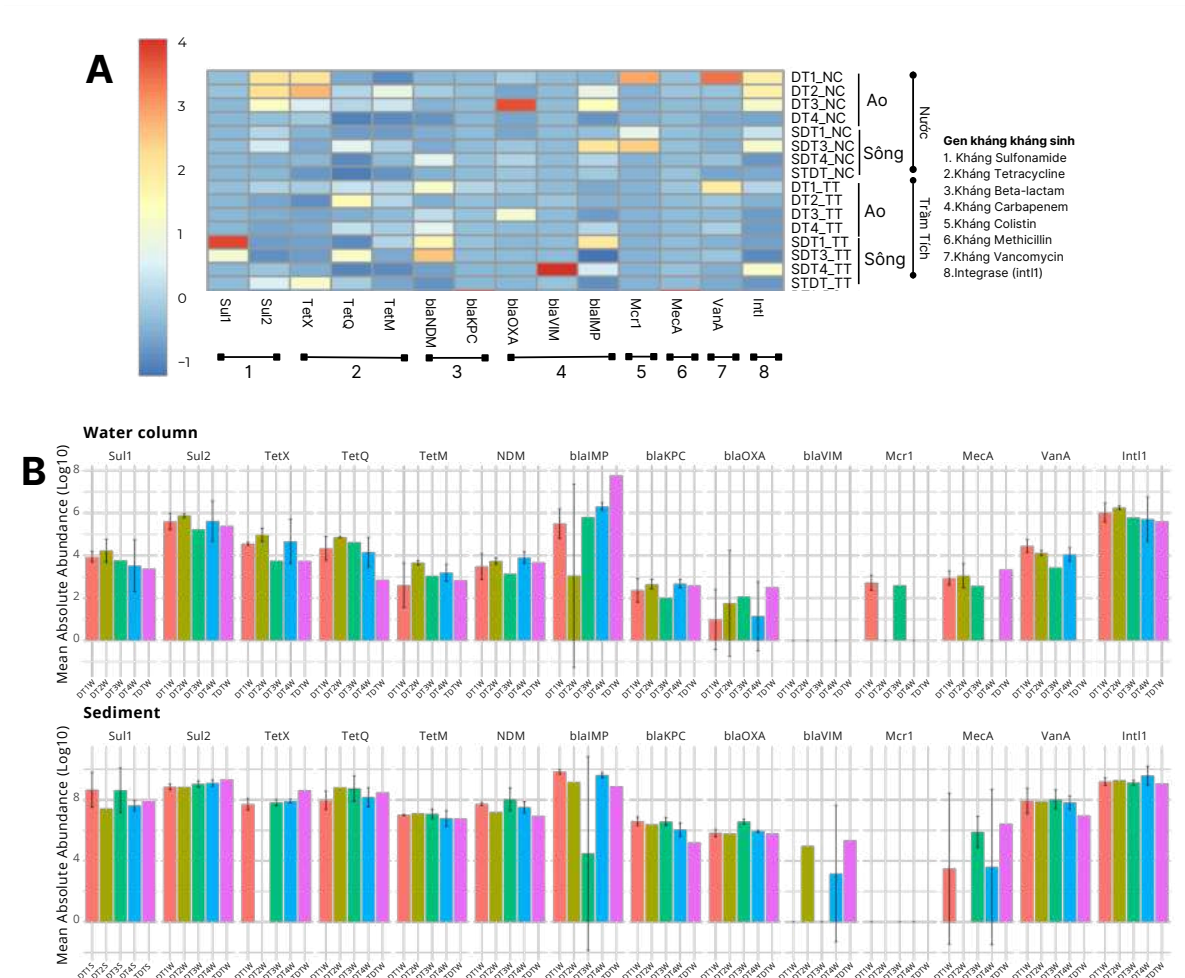
đặc thù cho từng môi trường. Sự hiện diện độc nhất của gen *IMP* trong nước có thể liên quan đến việc sử dụng kháng sinh trong cộng đồng hoặc trong các hoạt động nông nghiệp đã xâm nhập vào nguồn nước.

Kết quả định lượng bằng qPCR cho thấy sự phân bố phong phú của các gen KKS khác nhau giữa các mẫu nước, trầm tích tại Cần Thơ (Xem hình 3.6 (B)). Trầm tích là môi trường đóng vai trò như một “bể chứa” tiềm năng, có thể giải phóng các gen KKS vào môi trường xung quanh và gây ô nhiễm cho các sinh vật sống. Trong số các gen KKS được khảo sát, *sul2* ($9,1 \times 10^8$ bản sao/mL) là gen phong phú nhất, tiếp theo là *tetQ* ($3,1 \times 10^8$ bản sao/mL) và *NDM* ($2,0 \times 10^8$ bản sao/mL). Sự hiện diện phổ biến của *sul2*, một gen kháng sulfonamide, có thể liên quan đến việc sử dụng rộng rãi các loại kháng sinh này trong điều trị nhiễm trùng ở người và động vật. Tương tự, sự phong phú của *tetQ* và *NDM* cũng chỉ ra sự kháng thuốc cao đối với tetracyclin và carbapenem, hai nhóm kháng sinh quan trọng trong y tế. Đáng chú ý, tất cả 13 gen được khảo sát đều được phát hiện trong mẫu trầm tích, cho thấy sự đa dạng và phức tạp của vấn đề KKS trong môi trường này. Với mẫu nước tại Cần Thơ cho thấy sự hiện diện của các gen KKS, với *tetM* ($2,4 \times 10^4$ bản sao/mL), *tetQ* ($1,3 \times 10^5$ bản sao/mL) và *IMP* (3×10^5 bản sao/mL) là những gen chiếm ưu thế. Điều này cho thấy sự kháng thuốc phổ biến đối với tetracyclin và một số loại beta-lactam trong môi trường nước. Sự hiện diện đáng kể của *sull* ($1,6 \times 10^4$ bản sao/mL) và *sul2* ($1,6 \times 10^6$ bản sao/mL) cũng chỉ ra tình trạng kháng sulfonamide đáng quan ngại. Mặt khác, *mcr-1* ($5,4 \times 10^1$ bản sao/mL), gen kháng colistin, được phát hiện với mức độ phong phú thấp nhất, có thể phản ánh việc sử dụng hạn chế hoặc kiểm soát tốt hơn loại kháng sinh này trong khu vực.

Một nghiên cứu về vi khuẩn ở sông Mekong năm 2021 [119] kết hợp với kết quả nghiên cứu này cho thấy sự khác biệt đáng kể trong kết quả định lượng gen 16S rRNA (Phụ lục 6). Trong khi nghiên cứu Mekong trước đó báo cáo số lượng bản sao 16S rRNA trong trầm tích cao hơn đáng kể, từ $7,95 \times 10^7$ đến $2,14 \times 10^8$ bản sao/g, thì nghiên cứu này đã chỉ ra khoảng $1,4 \times 10^8$ đến 4×10^8 bản sao/g nếu giả định 1 μ L DNA tổng số tương đương 0,1 g trầm tích. Sự khác biệt đó có thể xuất phát từ sự khác biệt về đơn vị và phương pháp định lượng, hoặc phản ánh sự khác biệt thực sự về quần thể vi khuẩn giữa các địa điểm và điều kiện môi trường nghiên cứu. Hơn nữa, nghiên cứu về vi khuẩn trong sông Mekong năm 2021 chỉ ra số lượng bản sao 16S rRNA trong mẫu nước cao hơn

đáng kể so với mẫu trầm tích. Tuy nhiên, kết quả của báo cáo này lại cho thấy điều ngược lại, với số lượng vi khuẩn trong mẫu nước thấp hơn so với mẫu trầm tích. Sự khác biệt này có thể được giải thích bởi sự khác biệt về địa điểm và thời gian lấy mẫu, hoặc các yếu tố môi trường khác biệt giữa hai nghiên cứu. Như vậy có thể nói, nghiên cứu này đã bổ sung thêm cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu về vi khuẩn tại sông Mekong.

Sự phát hiện các gen kháng sulfonamide (*sul1* và *sul2*) là những gen phổ biến nhất trong cả mẫu nước và trầm tích tại các dòng sông lân cận ở phía Nam Việt Nam đã được xác nhận trong nghiên cứu của Thong và cộng sự năm 2021 tại khu vực sông Sài Gòn [120]. Kết quả này không chỉ củng cố thêm những phát hiện về sự phổ biến của các gen kháng sulfonamide trong môi trường thủy sinh mà còn mở rộng phạm vi ảnh hưởng của vấn đề này ra toàn khu vực phía Nam Việt Nam. Điều này cho thấy tầm quan trọng của các gen kháng sulfonamide như một báo cáo quan trọng về tình trạng ô nhiễm kiểm soát tại các vùng thủy tinh. Sự đa dạng của các loại gen này có thể liên quan đến việc sử dụng rộng rãi các loại thuốc sulfonamide trong điều trị nhiễm độc ở người và động vật, cũng như trong nông nghiệp và nuôi trồng thủy sản [121]. Sự tồn tại và lan truyền của các chủng kháng sulfonamide trong môi trường không chỉ làm giảm hiệu quả điều trị mà còn tạo điều kiện cho sự phát triển của các chủng vi khuẩn kháng đa thuốc, ảnh hưởng lớn tới sức khỏe cộng đồng và hệ sinh thái. Ngoài ra, nghiên cứu này đã phát hiện của các gen KKS tetracyclin và beta-lactam. Điều này cho thấy sự tồn tại rộng rãi của các gen này trong hệ sinh thái thủy sinh, một vấn đề không chỉ giới hạn ở khu vực này mà vẫn được ghi nhận ở các nghiên cứu khác, ví dụ như nghiên cứu tại Trung Quốc [122]. Hơn nữa, việc phát hiện các gen kháng carbapenem, một nhóm kháng sinh được sử dụng để điều trị các nhiễm trùng nặng, làm tăng thêm mối lo ngại về sự gia tăng của các chủng vi khuẩn kháng đa thuốc, một thách thức lớn đối với sức khỏe cộng đồng.



Hình 3.7: Sự phong phú tuyệt đối của 13 gen KKS và *int11* tại Đồng Tháp, Việt Nam (A) Ở các mẫu nước và mẫu trầm tích và (B) Chuẩn hoá = \log_{10} của sự phong phú tuyệt đối (Số bản sao/g với mẫu trầm tích, và số bản sao/mL với mẫu nước).

Tỷ lệ xuất hiện của 13 gen KKS tại các mẫu Đồng Tháp, ở trong 3 môi trường: nước và trầm tích được trình bày trong hình 3.7 (A). Trong mẫu nước 8 gen (*sul1*, *sul2*, *tetX*, *tetQ*, *tetM*, *KPC*, *NDM* và *IMP*) được phát hiện ở tất cả các mẫu (100%), tiếp theo là *vanA* (chiếm 87,5%), *mecA* (chiếm 75%) và *OXA* (chiếm 62,5%). Môi trường trầm tích, cũng cho thấy sự phổ biến của gen KKS với 10 gen (*sul1*, *sul2*, *tetX*, *tetQ*, *tetM*, *KPC*, *NDM*, *IMP*, *OXA* và *vanA*) có mặt ở 100% mẫu, trong khi *mecA* được tìm thấy ở 62,5% mẫu và *VIM* ở 37,5% mẫu.

Kết quả này cho thấy sự liên quan chặt chẽ giữa môi trường nước, trầm tích tại Đồng Tháp thông qua sự phân bố của các gen KKS. Trầm tích đã đóng vai trò là “bể chứa” gen KKS, với sự hiện diện của hầu hết các gen được nghiên cứu, trong khi môi trường nước có thể là con đường lây truyền gen KKS. Ngoài

ra, sự khác biệt về một số gen KKS giữa các môi trường, như *vanA* và *mecA* phổ biến hơn trong nước, và sự xuất hiện duy nhất của *VIM* trong trầm tích, chỉ ra những nguồn ô nhiễm và con đường lây truyền đặc thù.

Kết quả qPCR về sự phong phú của các gen KKS và *intl1* trong các mẫu từ Đồng Tháp cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các môi trường nước, trầm tích (Xem hình 3.7 (B)). Một số gen KKS xuất hiện phổ biến trong 2 loại mẫu, bao gồm *sul1*, *sul2*, *tetX*, *tetQ*, *tetM*, *KPC*, *NDM*, *IMP*, *OXA* và *vanA*. Trong môi trường nước, *tetX* ($6,4 \times 10^4$ bản sao/mL) và *tetQ* ($3,7 \times 10^5$ bản sao /mL) là hai gen có mức độ phong phú cao nhất, cho thấy sự kháng thuốc phổ biến đối với tetracyclin trong môi trường nước. Bên cạnh đó, *sul1* ($1,2 \times 10^4$ bản sao/mL) và *sul2* ($6,2 \times 10^5$ bản sao/mL) cũng được phát hiện với số lượng đáng kể, chỉ ra tình trạng kháng sulfonamide đáng quan ngại. Mặc dù *mcr-1* ($2,03 \times 10^2$ bản sao/mL) và *VIM*, các gen kháng colistin và một số beta-lactam, có sự phong phú thấp nhất, nhưng sự hiện diện của chúng vẫn cần được theo dõi và kiểm soát chặt chẽ. Mẫu trầm tích ở Đồng Tháp, Việt Nam cho thấy sự phong phú đáng kể của các gen KKS với tất cả 13 gen được khảo sát đều hiện diện. Trong đó, *sul1* ($1,4 \times 10^8$ bản sao/mL) và *sul2* ($7,1 \times 10^9$ bản sao/mL), là các gen kháng sulfonamide, là gen phong phú nhất, cùng với *tetQ* ($4,3 \times 10^9$ bản sao/mL), gen kháng tetracyclin. Sự khác biệt này nhấn mạnh vai trò của trầm tích như một "bể chứa" gen KKS tiềm tàng, có thể giải phóng các gen này vào môi trường nước theo thời gian, gây ô nhiễm và làm gia tăng tình trạng KKS trong quần thể vi sinh vật. Điều này đặt ra mối lo ngại về khả năng lan truyền KKS trong hệ sinh thái và ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng.

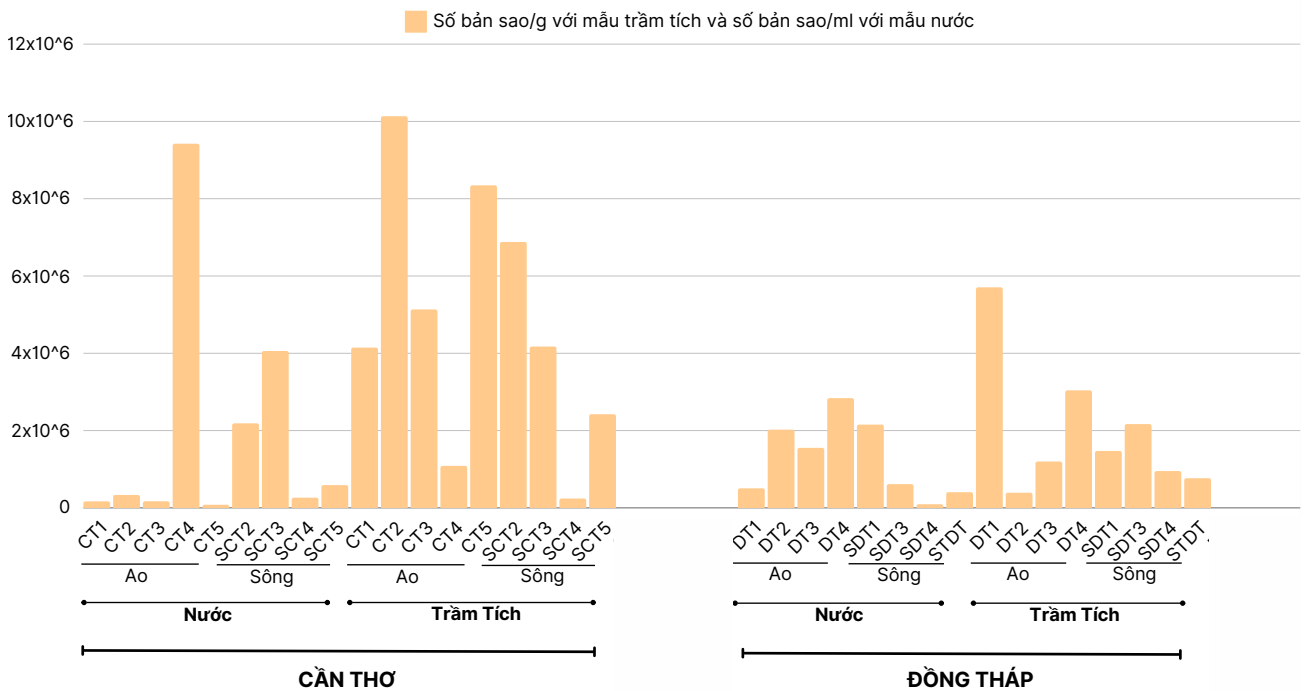
Kết quả nghiên cứu về gen KKS giữa Cần Thơ và Đồng Tháp cho thấy cả hai địa điểm đều có sự hiện diện đáng kể của gen KKS trong các mẫu môi trường, đặc biệt là nước và trầm tích (Phụ lục 13). Tuy nhiên, có một số khác biệt quan trọng. Tại Cần Thơ, các gen KKS phổ biến nhất bao gồm *sul1*, *tetQ*, *tetM*, *NDM* và *KPC*, xuất hiện trong tất cả các mẫu nước và trầm tích. Trong khi đó, ở Đồng Tháp, 8 gen KKS (*sul1*, *sul2*, *tetX*, *tetQ*, *tetM*, *KPC*, *NDM* và *IMP*) được phát hiện trong toàn bộ các mẫu nước, cho thấy sự phổ biến rộng hơn. Về mức độ phong phú, trầm tích ở cả hai địa điểm đều chứa nhiều gen KKS hơn so với nước, với Cần Thơ ghi nhận *sul2* là gen phong phú nhất trong trầm tích, còn *tetM*, *tetQ* và *IMP* chiếm ưu thế trong nước. Ở Đồng Tháp, *tetQ* là gen phổ biến nhất trong trầm tích, trong khi *tetX* và *tetQ* nổi bật trong nước.

Về phân bố, tại Cần Thơ, một số gen KKS như *IMP* chỉ xuất hiện trong nước. Ngược lại, Đồng Tháp có sự phân bố gen KKS đồng đều hơn giữa các môi trường, thể hiện sự lan truyền rộng rãi trong hệ sinh thái. Tóm lại, cả 2 vùng nghiên cứu này đều đối mặt với tình trạng ô nhiễm gen KKS nghiêm trọng, đặc biệt là ở các khu vực nuôi trồng thủy sản, với Đồng Tháp có mức độ KKS cao hơn, thể hiện qua sự phổ biến và phong phú của các gen KKS.

Nghiên cứu này cùng với nghiên cứu vào năm 2021 ở Mekong [119], đều đã phát hiện sự phổ biến của các gen KKS thuộc các nhóm kháng sinh như sulfonamide (*sul1*, *sul2*), tetracyclin (*tetX*, *tetQ*, *tetM*), và beta-lactam, đồng thời chỉ ra mối liên hệ giữa sự xuất hiện của các gen này với hoạt động nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, có sự khác biệt trong phạm vi và phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu này đã tập trung vào hai địa điểm cụ thể là Cần Thơ và Đồng Tháp với mẫu nước và trầm tích trong khi nghiên cứu năm 2021 khảo sát một khu vực rộng hơn khu vực sông Mekong và chỉ sử dụng mẫu nước. Ngoài ra, số lượng gen KKS được phân tích trong nghiên cứu này là 13 gen, so với 22 gen trong nghiên cứu năm 2021. Đặc biệt, nghiên cứu năm 2021 còn phân tích mối quan hệ giữa các gen KKS và thành phần vi khuẩn, trong khi nghiên cứu này chưa đề cập đến khía cạnh này. Kết quả từ cả hai nghiên cứu đều chứng minh sự ô nhiễm gen KKS nghiêm trọng trong môi trường thủy sinh và mối liên hệ với hoạt động nuôi trồng thủy sản, với nghiên cứu này đã cung cấp cái nhìn chi tiết hơn về sự phân bố gen tại Cần Thơ và Đồng Tháp, trong khi nghiên cứu năm 2021 mang lại cái nhìn tổng thể về toàn khu vực và mối quan hệ giữa KKS và vi khuẩn.

Sự phổ biến của các gen kháng sulfonamide (*sul1*, *sul2*) và tetracyclin (*tet*) không chỉ giới hạn trong nghiên cứu này tại Đồng Tháp mà vẫn được ghi nhận rõ ràng tại các nhánh sông Mekong. Tại thượng nguồn, sự hiện diện đáng kể của gen KKS trong cả môi trường nước và trầm tích cũng được tìm thấy ở khu vực sông Mekong tại Trung Quốc qua nghiên cứu Zhang và cộng sự năm 2020 [123]. Nghiên cứu của tác giả này cho kết quả tại thượng nguồn sông Mekong ở Trung Quốc tồn tại nhiều gen KKS, bao gồm cả các gen kháng sulfonamide (*sul1*, *sul2*) và tetracyclin (*tet*) - những gen được ghi nhận phổ biến trong nghiên cứu này tại hạ lưu sông Mekong. Tuy nhiên, mức độ phong phú của các gen KKS có thể khác nhau giữa các khu vực. Thực tế, nghiên cứu này đã ghi nhận mức độ phong phú gen KKS cao hơn đáng kể so với nghiên cứu

của Zhang và cộng sự năm 2020 tại thượng nguồn sông Mekong. Sự khác biệt này có thể được giải thích bởi một số yếu tố. Thứ nhất, khu vực Đồng Tháp chịu ảnh hưởng mạnh mẽ từ hoạt động nuôi trồng thủy sản, trong khi thượng nguồn sông Mekong ít chịu tác động của con người hơn. Việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản có thể tạo áp lực chọn lọc, thúc đẩy sự phát triển và lan truyền của các gen KKS trong môi trường. Thứ hai, sự khác biệt về mức độ ô nhiễm và các yếu tố môi trường khác giữa hai khu vực cũng có thể đóng vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến sự phong phú của gen KKS. Mặc dù nghiên cứu ở thượng nguồn sông Mekong có thể ghi nhận mức độ phong phú gen KKS thấp hơn, nhưng sự hiện diện của chúng vẫn là một dấu hiệu đáng lo ngại về sự lan truyền rộng rãi của vấn đề KKS trong toàn bộ lưu vực sông. Điều này nhấn mạnh sự cần thiết phải có các biện pháp kiểm soát và quản lý kháng sinh hiệu quả trên toàn khu vực để ngăn chặn sự gia tăng và lan truyền của các gen kháng thuốc, bảo vệ sức khỏe cộng đồng và hệ sinh thái sông Mekong.



Hình 3.8: Sự phong phú tuyệt đối của gen integron (Số bản sao/g với mẫu trầm tích, và số bản sao/mL với mẫu nước).

Integron nhóm 1 (*intl1*) là các yếu tố DTDD có khả năng thu nhận và biểu hiện các gen cassette, bao gồm cả các gen KKS. Do đó, chúng đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển gen KKS theo chiều ngang giữa các vi khuẩn, góp phần làm gia tăng sự lây lan của KKS. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự khác biệt đáng kể về sự phong phú tuyệt đối của gen *intl1* giữa các mẫu trầm tích và nước tại Cần Thơ và Đồng Tháp, Việt Nam.

Dữ liệu nghiên cứu cho thấy sự phong phú của gen integron có sự biến động đáng kể giữa các mẫu và các loại môi trường ở cả Cần Thơ và Đồng Tháp. Nhìn chung, số lượng bản sao gen integron trong mẫu nước có xu hướng cao hơn so với mẫu trầm tích đặc biệt là ở các ao nuôi, có thể do việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đã tạo áp lực chọn lọc, thúc đẩy sự gia tăng và lan truyền của các gen KKS.

Tại Cần Thơ, các mẫu nước từ ao nuôi có số lượng bản sao gen integron cao nhất, đặc biệt là ở CT2 và CT5, với giá trị lên đến hơn 10×10^6 bản sao/mL. Mẫu nước sông tại Cần Thơ cũng có số lượng bản sao gen integron tương đối cao, đặc biệt là ở SCT3. Tương tự, ở Đồng Tháp, các mẫu nước ao nuôi cũng cho thấy sự phong phú gen integron cao, với DT1 và DT4 có số lượng bản sao vượt quá 3×10^6 bản sao/mL. Mẫu nước sông ở Đồng Tháp có số lượng bản sao thấp hơn so với các mẫu ao nuôi, nhưng vẫn ở mức đáng kể.

Số lượng bản sao gen integron trong mẫu trầm tích thấp hơn so với mẫu nước. Tại Cần Thơ, các mẫu trầm tích ao nuôi có số lượng bản sao dao động từ khoảng 2×10^5 đến hơn 4×10^6 bản sao/g, trong khi các mẫu trầm tích sông có số lượng bản sao thấp hơn, dao động từ khoảng 2×10^5 đến hơn 4×10^6 bản sao/g. Ở Đồng Tháp, số lượng bản sao gen integron trong trầm tích ao nuôi cũng thấp hơn so với mẫu nước, dao động từ khoảng 1×10^5 đến 8×10^5 bản sao/g. Mẫu trầm tích sông ở Đồng Tháp (STDT) có số lượng bản sao thấp nhất, chỉ khoảng $7,66 \times 10^5$ bản sao/g.

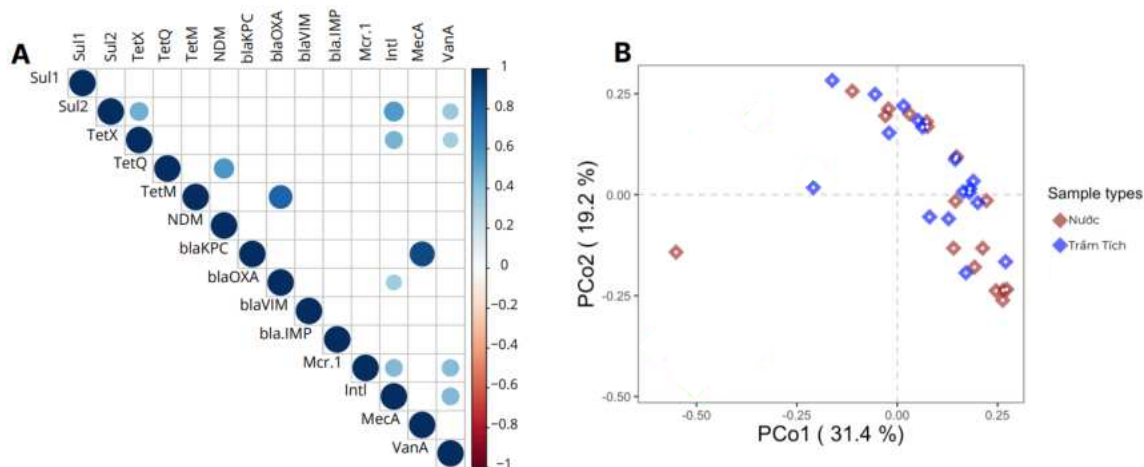
Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này một lần nữa nhấn mạnh tầm quan trọng của việc giám sát và kiểm soát sự lan truyền của gen integron và các gen KKS khác trong môi trường, đặc biệt là ở các khu vực nuôi trồng thủy sản, để ngăn chặn sự gia tăng của tình trạng KKS.

So sánh giữa hai địa điểm, Cần Thơ, Việt Nam có sự phong phú *intl1* cao hơn đáng kể so với Đồng Tháp, Việt Nam ở cả ba loại mẫu. Điều này có thể liên quan đến sự khác biệt về mức độ phát triển kinh tế, mật độ dân số, hoạt

động nông nghiệp và quản lý chất thải giữa hai khu vực. Tương tự như nghiên cứu trước đây [32], kết quả này cũng cho thấy sự giảm dần về sự phong phú của *intl1* từ trầm tích sang nước, gợi ý về ảnh hưởng của ô nhiễm từ đất liền đến môi trường nước và sinh vật thủy sinh. Tóm lại, ta thấy được sự phổ biến của integron trong môi trường và sinh vật ở Cần Thơ và Đồng Tháp, đồng thời nhấn mạnh vai trò tiềm năng của trầm tích như một “bể chứa” các yếu tố DTDD này. Sự khác biệt về sự phong phú *intl1* giữa các môi trường và địa điểm có thể liên quan đến các hoạt động của con người và các yếu tố môi trường khác nhau.

Nghiên cứu tại Mekong vào năm 2021 [119] cùng với nghiên cứu này đều tập trung vào phân tích sự phong phú của gen *intl1* trong các mẫu môi trường sông và đã cùng đưa ra kết luận quan trọng rằng trầm tích là môi trường có sự phong phú *intl1* cao nhất, nhấn mạnh vai trò của trầm tích như một “bể chứa” gen KKS quan trọng. Và nghiên cứu này còn cung cấp thêm thông tin về sự khác biệt về sự phong phú gen giữa hai khu vực là Cần Thơ và Đồng Tháp, Việt Nam cho thấy tính phức tạp của sự lan truyền và duy trì gen KKS trong hệ sinh thái sông.

Từ kết quả trên và nghiên cứu tại sông Mekong vào năm 2021 [119] đều cung cấp bằng chứng rõ ràng về sự hiện diện và lan truyền đáng kể của gen integron trong hệ sinh thái sông Mekong, đặc biệt tập trung ở những khu vực chịu ảnh hưởng mạnh từ hoạt động nuôi trồng thủy sản. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự phong phú của gen integron trong mẫu nước nói chung cao hơn so với mẫu trầm tích, với các mẫu nước từ ao nuôi có số lượng bản sao gen integron cao nhất. Điều này cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa hoạt động nuôi trồng thủy sản và sự gia tăng của gen integron, có thể là do việc sử dụng kháng sinh trong quá trình nuôi trồng đã tạo áp lực chọn lọc, thúc đẩy sự phát triển và lan truyền của các gen KKS. Mặc dù số lượng bản sao gen integron trong mẫu trầm tích thấp hơn, nhưng nghiên cứu năm 2021 vẫn phát hiện sự hiện diện của chúng, đặc biệt ở các khu vực gần đô thị và nông nghiệp, cho thấy khả năng lan truyền của gen này ra môi trường xung quanh. Tóm lại, cả hai nghiên cứu đều nhấn mạnh vai trò quan trọng của hoạt động nuôi trồng thủy sản trong việc gia tăng và lan truyền gen integron, đồng thời nhấn mạnh sự cần thiết phải giám sát và kiểm soát chặt chẽ tình trạng này để bảo vệ sức khỏe cộng đồng và hệ sinh thái sông Mekong.



Hình 3.9: Mối tương quan giữa các thông số chất lượng nước + trầm tích và mức độ phong phú chuẩn hoá của gen KKS, gen 16S rRNA, và gen *int11* (A), PCoA về hàm lượng tuyệt đối gen KKS giữa trầm tích và nước (B).

Phân tích mối tương quan giữa 13 gen KKS và *int11* trong các mẫu môi trường từ Đồng Tháp và Cần Thơ ở Việt Nam, dựa trên kết quả qPCR và trực quan hóa bằng biểu đồ nhiệt (Xem hình 3.9 (A)), đã chỉ ra một số mô hình đáng chú ý về sự di truyền chung của các gen này. Với các cặp gen có tương quan thuận mạnh mẽ, sự tương quan dương đáng kể ($r > 0,8$) giữa *sul1* và *sul2* cho thấy chúng thường cùng xuất hiện trong các mẫu. Điều này có thể là do chúng nằm trên cùng một plasmid hoặc các yếu tố DTĐĐ khác, tạo điều kiện cho việc đồng truyền giữa các vi khuẩn. Sự kết hợp này cũng có thể phản ánh áp lực chọn lọc tương tự từ việc sử dụng kháng sinh sulfonamide. Một cặp gen khác thể hiện mối tương quan thuận đáng kể ($r > 0,6$) là *tetM* và *NDM*, các gen mã hóa cho sự kháng thuốc tetracyclin và carbapenem tương ứng. Sự đồng hành này có thể liên quan đến việc các gen này cùng nằm trên các integron hoặc các cấu trúc di truyền khác, hoặc chúng có thể cung cấp lợi thế thích nghi cho vi khuẩn trong môi trường có sự hiện diện của nhiều loại kháng sinh khác nhau. Ngoài ra, có thể thấy cặp gen *KPC* và *OXA*, cả hai đều mã hóa cho các enzyme beta-lactam, cũng có mối tương quan thuận đáng kể ($r > 0,6$).

Ngược lại, với các cặp gen có tương quan nghịch, mối tương quan nghịch mạnh mẽ ($r < -0,8$) giữa *mecA* và *vanA* chỉ ra rằng chúng hiếm khi cùng xuất hiện trong một mẫu. Điều này có thể do sự khác biệt về các loại vi khuẩn mang

các gen này, hoặc các cơ chế KKS khác nhau mà chúng mã hóa có thể không tương thích hoặc không cần thiết cùng một lúc. Một cặp gen khác thể hiện mối tương quan nghịch là *VIM* và *IMP*, cả hai đều mã hóa cho các metallo-beta-lactamase. Mặc dù mối tương quan này không mạnh bằng *mecA* và *VanA*, nó vẫn gợi ý về sự khác biệt về nguồn gốc hoặc con đường lan truyền của hai gen này. Mối tương quan nghịch giữa *mcr-1* (gen kháng colistin) và *intl1* có thể phản ánh sự khác biệt về các yếu tố DTDD mang các gen này, hoặc sự khác biệt về áp lực chọn lọc tác động lên chúng.

Biểu đồ 3.9 (B) cung cấp cái nhìn trực quan về sự phân bố của các gen KKS trong 2 môi trường khác nhau: trầm tích và nước. Sự phân giải rõ ràng của các mẫu trầm tích cho thấy chúng có một hệ gen kháng sinh (resistome) khác biệt đáng kể so với nước. Điều này được cố gắng bằng cách sử dụng chúng chỉ cho trạng thái tích lũy có nhiều gen KKS phong phú hơn, đặc biệt là gen *intl1*, nhấn mạnh vai trò của trầm tích như một ổ chứa quan trọng của gen KKS trong hệ sinh thái này. Mặc dù các mẫu nước có vẻ tương đồng hơn trong resistome thành phần, biểu đồ vẫn cho thấy sự giảm nhẹ phân tách, hạn chế chỉ tồn tại của những khác biệt dù nhỏ. Điều này gợi ý rằng, mặc dù có sự tương tác và trao đổi vi khuẩn giữa các môi trường này, mỗi môi trường vẫn duy trì một tập hợp gen KKS cụ thể. Một phát hiện thú vị khác là sự thay đổi không gian trong thành phần điện trở được biết rõ hơn ở trầm tích so với mẫu nước. Điều này cho thấy môi trường trầm tích có độ ổn định và không cao nhất, có thể tạo điều kiện cho các gen KKS đa dạng hóa và tích lũy. Do đó, việc xem xét sự biến đổi không gian là rất quan trọng khi nghiên cứu về điện trở, đặc biệt là trong môi trường trầm tích.

Tóm lại, phân tích PCoA này đã làm sáng tỏ sự phân bố và biến đổi của gen KKS trong các môi trường khác nhau. Trầm tích nổi lên như một ổ chứa gen KKS quan trọng, trong khi mẫu nước thể hiện sự tương đồng điện trở cao hơn, nhưng vẫn có những điều khác biệt tinh tế. Nghiên cứu này rất cần thiết để nghiên cứu phải xem xét sự khác biệt giữa các môi trường và biến đổi không gian khi đánh giá giá trị truyền lan và đa dạng của gen KKS trong hệ sinh thái.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 6 nhóm vi khuẩn có đại diện gây bệnh cho người và động vật, bao gồm *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, và *Acinetobacter* từ môi trường nước và trầm tích sông Mekong, và ao nuôi cá tra tại hai tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp.

Kháng penicillin phổ biến nhất dao động từ 16% đến 50%, trong khi tình trạng kháng cephalosporin thế hệ 3 và carbapenem cũng đã được phát hiện. Tình trạng kháng đa kháng sinh cũng rất phổ biến, đặc biệt là ở *Klebsiella pneumoniae* và *Escherichia coli*.

13 gen KKS liên quan đến kháng các kháng sinh gồm sulfonamide (*sul1*, *sul2*), tetracyclin (*tetM*, *tetQ*, *tetX*), beta-lactam (*blaIMP*, *blaNDM*, *blaKPC*, *blaOXA*), colistin (*mcr-1*) và methicillin (*mecA*) đều được phát hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu với mật độ giao động từ $2,4 \times 10^4$ - 3×10^6 bản sao/mL, và $1,4 \times 10^8$ - $4,3 \times 10^9$ bản sao/g. Mật độ gen KKS trong các mẫu nước thấp hơn trong mẫu trầm tích.

Gen *intl1* mã hoá integron loại 1 cũng được phát hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu với mật độ cao. Bên cạnh đó, mối liên hệ có ý nghĩa thống kê được xác định giữa gen *intl1* và các gen *sul2*, *tetX* và *blaOXA*, cho thấy vai trò quan trọng của gen này trong việc thúc đẩy sự tiến hóa và lan truyền của vi khuẩn kháng thuốc.

KIẾN NGHỊ

Đề tài tiếp tục triển khai nghiên cứu giải trình tự bộ gen các chủng VKĐKT để hiểu biết rõ hơn về cơ chế phân tử và độc lực của chúng. Bên cạnh đó phân tích cấu trúc DTĐĐ có khả năng mang gen độc lực và gen kháng thuốc nhằm đánh giá nguy cơ lây truyền các gen này tới quần thể vi khuẩn trong ao cá và môi trường sông.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Nghiên cứu được đăng trong báo cáo toàn văn của **Hội nghị toàn quốc về CNSH 2024** - Thuộc tiểu ban chuyên môn: Công nghệ sinh học nông nghiệp - mã số: **AG-V-043**.

Vũ Đặng Hải Long, Nguyễn Đăng Quang, Nguyễn Quang Huy, 2024, Nghiên cứu tình trạng vi khuẩn kháng kháng sinh và sự phổ biến gen kháng kháng sinh ở một số ao nuôi cá tra tại Cần Thơ và Đồng Tháp, *Hội nghị toàn quốc về CNSH – 2024*, tr.1089-1094.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tanvir Mahtab Uddin, Arka Jyoti Chakraborty, Ameer Khusro, BM Redwan Matin Zidan, Saikat Mitra, Talha Bin Emran, Kuldeep Dhama, Md. Kamal Hossain Ripon, Márió Gajdác, Muhammad Umar Khayam Sahibzada, Md. Jamal Hossain, Niranjana Koirala, 2021, Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects, *Journal of Infection and Public Health*, Vol. 14, số 12, tr. 1750-1766
2. Katz, Leonard, and Richard H Baltz, 2016 “Natural product discovery: past, present, and future, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, Vol. 43, tr. 2-3
3. J. F. Prescott, 2014, The resistance *tsunami*, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology, *Vet. Microbiol.*, vol 171, số p.h 3, tr. 273–278
4. C. J. L. Murray et al., 2022, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *The Lancet*, vol 399, số p.h 10325, tr. 629–655
5. S. Pokharel, S. Raut, và B. Adhikari, 2019, Tackling antimicrobial resistance in low-income and middle-income countries, *BMJ Glob. Health*, vol 4, số p.h 6, tr. 2104
6. Kakkar M, Sharma A, Vong S., 2017, Developing a situation analysis tool to assess containment of antimicrobial resistance in Southeast Asia, vol. 358, tr. 3760
7. Walsh, C., Wencewicz, T., 2014 Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective, *J Antibiot* 67, trg. 7–22
8. A. Grube và J. Stewart, 2022, One Health in the Galapagos Social-Ecological System: Not Just the Absence of Disease, *Water, Food and Human Health in the Galapagos, Ecuador: “A Little World Within Itself”*, A. L. Thompson, V. Ochoa-Herrera, và E. Teran, B.t.v, Cham: Springer International Publishing, tr. 145–163.
9. D. G. J. Larsson và C.-F. Flach, 2022, Antibiotic resistance in the environment, *Nat. Rev. Microbiol.*, vol 20, số p.h 5, Art. số p.h 5
10. Forsberg, Kevin J et al., 2012, The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens, *Science (New York, N.Y.)* vol. 337,6098
11. Kim, DW., Cha, CJ., 2021, Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission, *Exp Mol Med* 53, trg. 301–309
12. Kraemer, M.U.G., Reiner, R.C., Brady, O.J. et al, 2019, Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, *Nat Microbiol* 4, trg. 854–863

13. C. M. Manaia, 2017, Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk, *Trends Microbiol.*, vol 25, số p.h 3, tr. 173–181
14. S. B. Shin, S. R. Cho, và J. S. Mok, 2023, Antimicrobial Resistance of Fecal-Indicator Bacteria Isolated from Aquatic Animal Farms along the Korean Coast, *Aquac. Res.*, vol 2023, số p.h 1, tr. 5014754,
15. Lee, K., Kim, DW., Lee, DH. *et al.*, 2020, Mobile resistome of human gut and pathogen drives anthropogenic bloom of antibiotic resistance. *Microbiome* 8, 2
16. W. Li và G. Zhang, 2022, Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer, *Environ. Res.*, vol 212, tr. 113267
17. M.-F. Lartigue, L. Poirel, D. Aubert, và P. Nordmann, 2006, In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol 50, số p.h 4, tr 1282–1286
18. L. Yuan et al., 2009, Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China, *J. Med. Microbiol.*, vol 58, số p.h Pt 11, tr 1449–1453
19. T. R. Walsh, J. Weeks, D. M. Livermore, và M. A. Toleman, 2011, Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study, *Lancet Infect. Dis.*, vol 11, số p.h 5, tr 355–362
20. A. Potron, J. Kalpoe, L. Poirel, và P. Nordmann, 2011, European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol 17, số p.h 12, tr. E24-26,
21. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance, 2024, WHO
22. Zellweger, Raphaël M et al., 2017, A current perspective on antimicrobial resistance in Southeast Asia, *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 72, 11, trg. 2963-2972
23. Antimicrobial resistance global report on surveillance : 2014 summary, 2014, WHO
24. G. Paolam, 2022, Antimicrobial Resistance in Rivers: A Review of the Genes Detected and New Challenges, 2022, *Environmental toxicology and chemistry* vol. 41,3, trg. 687-714
25. R. Singh, A. P. Singh, S. Kumar, B. S. Giri, và K.-H. Kim, 2019, Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies, *J. Clean. Prod.*, vol 234, tr. 1484–1505

26. R. B. Guevarra et al., 2022, Metagenomic characterization of bacterial community and antibiotic resistance genes found in the mass transit system in Seoul, South Korea, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol 246, tr. 114176
27. Z. Zheng, L. Ye, Y. Xu, E. W. Chan, và S. Chen, 2024, Dynamics of antimicrobial resistance and genomic characteristics of foodborne *Vibrio* spp. in Southern China (2013–2022), *J. Hazard. Mater.*, vol 479, tr. 135672
28. Selvarajan, R., Obize, C., Sibanda, T., Abia, A.L.K., 2013, Evolution and Emergence of Antibiotic Resistance in Given Ecosystems: Possible Strategies for Addressing the Challenge of Antibiotic Resistance, 2024, Available at: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/1/28>
29. H. Heuer et al., 2002, Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer, *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol 42, số p.h 2, tr. 289–302
30. Ettore Zuccato, Sara Castiglioni, Renzo Bagnati, Manuela Melis, Roberto Fanelli, 2010, Occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment, *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 179, Issues 1–3. trg. 1042-1048
31. Deng, W., Li, N., Zheng, H., & Lin, H, 2016, Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in Hong Kong. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 125, trg. 121-127
32. J. Lu, Y. Zhang, J. Wu, J. Wang, C. Zhang, và Y. Lin, 2019, Occurrence and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the Bohai Sea and Yellow Sea areas, China, *Environ. Pollut.*, vol 252, tr. 450–460
33. Jiang, L., Hu, X., Yin, D., Zhang, H., & Yu, Z., 2011, Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere*, vol. 82(6), trg. 822-828
34. W. Li, Y. Shi, L. Gao, J. Liu, và Y. Cai, 2012, Occurrence of Antibiotics in Water, Sediments, Aquatic Plants, and Animals from Baiyangdian Lake in North China, *Chemosphere*, vol 89, tr. 1307
35. F. Tamtam et al., 2008, Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions, *Sci. Total Environ.*, vol 393, số p.h 1, tr. 84–95,
36. Q. Sui, X. Cao, S. Lu, W. Zhao, Z. Qiu, và G. Yu, 2015, Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review, *Emerg. Contam.*, vol 1
37. Gu, Cheng, and K G Karthikeyan, 2008, Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes, *Journal of Environmental Quality*, vol. 37,2, trg. 704
38. K. Kümmerer, 2009, Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I, *Chemosphere*, vol 75, số p.h 4, tr. 417–434

39. D. Cacace et al., 2019, Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings, *Water Res.*, vol 162, tr. 320–330
40. Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P. *et al.*, 2019, Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* **10**, trg. 1124
41. S. Raza, H. Shin, H.-G. Hur, và T. Unno, 2022, Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants, *Water Res.*, vol 208, tr. 117882
42. W. Zhou et al., 2022, Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Escherichia coli* from pigs and chickens in Zhejiang, China, *Front. Microbiol.*, vol 13
43. Y. Liu, S. Kyle, và P. D. Straight, 2018, Antibiotic Stimulation of a *Bacillus subtilis* Migratory Response, *mSphere*, vol 3, số p.h 1, tr. e00586-
44. Rodriguez-Mozaz, Sara et al., 2015, Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river, *Water research*, vol. 69, trg. 234-242
45. 2022 - SEAFDEC/AQD, 2022, [Online]. Available at: <https://www.seafdec.org.ph/2022/>
46. S. A. Braun, T. M. Jansen, B. Homey, và P. A. Gerber, 2015, Successful therapy of condylomata acuminata with ingenol mebutate, *Hautarzt Z. Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.*, vol 66, số p.h 4, tr 223–225
47. Bhat, R.A.H., Altinok, I., 2023, Antimicrobial Resistance (AMR) and Alternative Strategies for Combating AMR in Aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 23(11), TRJFAS24068
48. L. Santos và F. Ramos, 2018, Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem, *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 52, số p.h 2, tr. 135–143
49. M. E. Velazquez-Meza, M. Galarde-López, B. Carrillo-Quiróz, và C. M. Alpuche-Aranda, 2022, Antimicrobial resistance: One Health approach, *Vet. World*, vol 15, số p.h 3, tr. 743–749
50. C. Verraes et al., 2013, Antimicrobial resistance in the food chain: a review, *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol 10, số p.h 7, tr. 2643–2669
51. Aly, Salah và Albutti, Aqel, 2014, Antimicrobials Use in Aquaculture and their Public Health Impact, *J Aquac Research Development*, vol. 5
52. Schar, D., Klein, E.Y., Laxminarayan, R. *et al.* 2020, Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Sci Rep* **10**, trg. 21878
53. Caputo, A., Bondad-Reantaso, M. G., Karunasagar, I., Hao, B., Gaunt, P., Verner-Jeffreys, D., Fridman, S., & Dorado-Garcia, A., 2023, Antimicrobial resistance in aquaculture: A global analysis of literature and national action plans. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), trg. 568-578

54. N. Hedberg et al., 2018, Antibiotic use in Vietnamese fish and lobster sea cage farms; implications for coral reefs and human health, *Aquaculture*, vol 495, tr. 366–375
55. Cabello, Felipe C et al., 2013, Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health, *Environmental microbiology* vol. 15,7, trg. 1917-42
56. M. Reverter et al., 2020, Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance, *Nat. Commun.*, vol 11, số p.h 1, tr 1870
57. Watts, Joy E M, et al., 2017, The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions, *Marine drugs*, vol. 15,6, trg. 158
58. D. Schar, C. Zhao, Y. Wang, D. G. J. Larsson, M. Gilbert, và T. P. Van Boeckel, 2021, Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia, *Nat. Commun.*, vol 12, số p.h 1, tr. 5384
59. Chia, Nicholas H et al., 2016, Determining the Number of Ischemic Strokes Potentially Eligible for Endovascular Thrombectomy: A Population-Based Study, *Stroke*, vol. 47,5, trg. 1377-80
60. Ninh, Doan Thi, et al., 2021, Prevalence, Virulence Gene Distribution and Alarming the Multidrug Resistance of *Aeromonas hydrophila* Associated with Disease Outbreaks in Freshwater Aquaculture.” *Antibiotics (Basel, Switzerland)* vol. 10,5, trg. 532
61. Jeamsripong, Saharuetai et al., 2022, Molecular Epidemiology of Antimicrobial Resistance and Virulence Profiles of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Vibrio* spp. Isolated from Coastal Seawater for Aquaculture, *Antibiotics (Basel, Switzerland)* vol. 11,12, trg. 1688.
62. F. Fikri, D. K. Wardhana, A. Purnomo, S. Khairani, S. Chhetri, và M. T. E. Purnama, 2022, Aerolysin gene characterization and antimicrobial resistance profile of *Aeromonas hydrophila* isolated from milkfish (*Chanos chanos*) in Gresik, Indonesia, *Vet. World*, vol 15, số p.h 7, tr. 1759–1764
63. C. Ng et al., 2018, Microbial water quality and the detection of multidrug resistant *E. coli* and antibiotic resistance genes in aquaculture sites of Singapore, *Mar. Pollut. Bull.*, vol 135, tr. 475–480
64. Thiang, E. L., Lee, C. W., Takada, H., Seki, K., Takei, A., Suzuki, S., ... Bong, C. W., 2021, Antibiotic residues from aquaculture farms and their ecological risks in Southeast Asia: a case study from Malaysia, *Ecosystem Health and Sustainability*, vol. 7(1)
65. WHO, 2023, Everyone has a responsibility to prevent Antimicrobial Resistance in Viet Nam, <https://www.who.int/vietnam/news/detail/20-11-2023-everyone-has-a-responsibility-to-prevent-antimicrobial-resistance-in-viet-nam>
66. J. J. Carrique-Mas, M. Choisy, N. Van Cuong, G. Thwaites, và S. Baker, 2020, An estimation of total antimicrobial usage in humans and animals in Vietnam, *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol 9, số p.h 1, tr. 16

67. S. McKinn et al., 2021, Drivers of antibiotic use in Vietnam: implications for designing community interventions, *BMJ Glob. Health*, vol 6, số p.h 7, tr. e005875
68. T. X. Le và Y. Munekage, 2004, Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam, *Mar. Pollut. Bull.*, vol 49, số p.h 11, tr. 922–929
69. Hoa, P. T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., Viet, P. H., & Suzuki, S., 2011, Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam, *Science of The Total Environment*, vol. 409(15), trg. 2894-2901
70. Managaki, Satoshi et al., 2017, Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta, *Environmental science & technology*, vol. 41,23, trg. 8004-10.
71. Impress Travel, Why is the Mekong River Important to Vietnam?, Available at: <https://impresstravel.com/why-is-the-mekong-river-important-to-vietnam/>
72. Thi Da Chau, Le Phong Thanh, Vo Long Tran, Dinh Tran Vo, Nguyen Phuong Xuan, Landos Matt., 2024, From pristine to polluted how chemicals and pollutants drive fishery declines and ecosystem collapse case study: Mekong river Vietnam, *Mekong River Vietnam* tr. 1–70.
73. Nguyen Dang Giang, Chau et al., 2015, Occurrence and Dissipation of the Antibiotics Sulfamethoxazole, Sulfadiazine, Trimethoprim, and Enrofloxacin in the Mekong Delta, Vietnam, *PloS one*, vol. 10,7, tr. e0131855
74. Tạp chí Thủy sản Việt Nam, Việt Nam là nước xuất khẩu thủy sản lớn thứ 3 thế giới, 2024, <https://thuysanvietnam.com.vn/viet-nam-la-nuoc-xuat-khau-thuy-san-lon-thu-3-the-gioi/>
75. Open Development Mekong, 2015, Fishing, fisheries and aquaculture, <https://opendevelopmentmekong.net/topics/fishing-fisheries-and-aquaculture>
76. S. Rico et al., 2014, Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production, *PloS One*, vol 9, số p.h 10, tr. e109844
77. Pham, D.K., Chu, J., Do, N.T. *et al.*, 2015, Monitoring Antibiotic Use and Residue in Freshwater Aquaculture for Domestic Use in Vietnam. *EcoHealth* **12**, tr. 480–489
78. N. D. Tan, V. T. X. Tuyen, H. T. N. Ha, và D. T. A. Dao, 2023, Overview: The value chain of Tra catfish in Mekong Delta Region, Vietnam, *Vietnam J. Chem.*, vol 61, số p.h 1, tr. 1–14, 2023

79. Guimarães, Carlos Frederico Marques, et al., 2015, The chemical quality of frozen Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets, *Food science & nutrition*, vol. 4,3, tr. 398-408
80. Catfish exports show positive growth in most markets, Available at: <https://en.vcci.com.vn/catfish-exports-show-positive-growth-in-most-markets>
81. De Silva Sena, Phuong Nguyen, 2011, Striped catfish farming in the Mekong Delta, Vietnam: A tumultuous path to a global success. *Reviews in Aquaculture*, vol. 3, tr. 45 - 73
82. Tu Thanh Dung, Nguyen Thi Nhu Ngoc, Nguyen Quoc Thinh, 2020, Common diseases of pangasius catfish farmed in Vietnam, *Vibo*
83. P. Tran Minh et al., 2015, An evaluation of fish health-management practices and occupational health hazards associated with *Pangasius catfish* (*Pangasianodon hypophthalmus*) aquaculture in the Mekong Delta, Vietnam, *Aquac. Res.*, vol. 47
84. B. Suyamud, Y. Chen, D. T. T. Quyen, Z. Dong, C. Zhao, và J. Hu, 2024, Antimicrobial resistance in aquaculture: Occurrence and strategies in Southeast Asia, *Sci. Total Environ.*, vol 907, tr. 167942,
85. A. Petersen và A. Dalsgaard, 2003, Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand, *Aquaculture*, vol 219, số p.h 1, tr. 71–82
86. Nguyen, Hoang Nam Kha et al., 2014, Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam, *Veterinary microbiology* vol. 171,3-4
87. M. Nawaz, A. A. Khan, S. Khan, K. Sung, và R. Steele, 2008, Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish, *Food Microbiol.*, vol 25, số p.h 1, tr. 85–91
88. S. A. McEwen và P. J. Collignon, 2018, Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective, *Microbiol. Spectr.*, vol 6, số p.h 2
89. N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, và J. S. Viridi, 2015, MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis, *Front. Microbiol.*, vol 6, tr. 791
90. Krumperman, P H. 1983, Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods, *Applied and environmental microbiology*, vol. 46,1, tr. 165-70
91. Osundiya, Olusegun & Oladele, Rita & Oduyebo, Oyinlola, 2013, Multiple Antibiotic Resistance (MAR) indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, vol. 14.
92. Song, Siyuan et al., 2019, Effects of *Oenanthe javanica* on Nitrogen Removal in Free-Water Surface Constructed Wetlands under Low-Temperature Conditions, *International journal of environmental research and public health*, vol. 16,8, tr. 1420

93. R. Pei, S.-C. Kim, K. H. Carlson, và A. Pruden, Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG), 2006 *Water Res.*, vol 40, số p.h 12, tr. 2427–2435
94. D. F. Pazra, H. Latif, C. Basri, I. W. T. Wibawan, và P. Rahayu, 2023, Detection of tetracycline resistance genes and their diversity in *Escherichia coli* isolated from pig farm waste in Banten province, Indonesia, *Vet. World*, vol 16, số p.h 9, tr. 1907–1916
95. E. Auerbach, E. Seyfried, và K. McMahon, 2007, Tetracycline Resistance Genes in Activated Sludge Wastewater Treatment Plants, *Water Res.*, vol 41, tr. 1143–51
96. Y. Kang et al., 2018, High diversity and abundance of cultivable tetracycline-resistant bacteria in soil following pig manure application, *Sci. Rep.*, vol 8, tr. 1489
97. M. Stegger et al., 2012, Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*, *Clin. Microbiol. Infect.*, vol 18, số p.h 4, tr. 395–400
98. H. Goudarzi, E. S. Mirsamadi, Z. Ghalavand, M. Hakemi Vala, H. Mirjalali, và A. Hashemi, 2019, Rapid detection and molecular survey of *blaVIM*, *blaIMP* and *blaNDM* genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* using new multiplex real-time PCR and melting curve analysis, *BMC Microbiol.*, vol 19, tr. 122
99. H. Tahmasebi, S. Dehbashi, và M. R. Arabestani, 2020, Prevalence and Molecular Typing of Colistin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) Among β -Lactamase-Producing Isolates: A Study Based on High-Resolution Melting Curve Analysis Method, *Infect. Drug Resist.*, vol 13, tr. 2943–2955
100. A. Teban-Man et al., 2021, Municipal Wastewaters Carry Important Carbapenemase Genes Independent of Hospital Input and Can Mirror Clinical Resistance Patterns, *Microbiol. Spectr.*, vol 10, số p.h 2, tr. e02711-21
101. A. S. Sidhu, F. N. Mikolajczyk, và J. C. Fisher, 2023, Antimicrobial Resistance Linked to Septic System Contamination in the Indiana Lake Michigan Watershed, *Antibiotics*, vol 12, số p.h 3, Art. số p.h 3
102. Clark, N C et al, 1993, Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 37, 11, tr. 2311-7
103. M. Quintela-Baluja et al., 2021, Dynamics of integron structures across a wastewater network – Implications to resistance gene transfer, *Water Res.*, vol 206, tr. 117720
104. D. H. Phu, T. Wongtawan, D. B. Truong, N. Van Cuong, J. Carrique-Mas, và T. Thomrongsuwannakij, 2022, A systematic review and meta-analysis of integrated studies on antimicrobial resistance in Vietnam, with

- a focus on Enterobacteriaceae, from a One Health perspective, *One Health*, vol 15, tr. 100465
105. Quach Van Cao Thi, Nguyen Bao Trung, & Tu Thanh Dung, 2024, The antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* originated from intensively farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Ben Tre and Soc Trang provinces of the Mekong Delta, Vietnam: *Veterinary Integrative Sciences*, vol. 23(1), tr. 1–14
 106. N. T. Nhung et al., 2018, Antimicrobial residues and resistance against critically important antimicrobials in non-typhoidal *Salmonella* from meat sold at wet markets and supermarkets in Vietnam, *Int. J. Food Microbiol.*, vol 266, tr. 301–309
 107. Hooper, David C, and George A Jacoby, 2015, Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1354,1, tr. 12-31
 108. T. Nakayama et al., 2022, Isolation of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* harbouring NDM-1, 4, 5, OXA48 and KPC from river fish in Vietnam, *Food Control*, vol 133, tr. 108594
 109. Ngọc Hôn, Nguyễn & Tran, Hoa & Nguyen, Quoc Thinh & Hinenoya, A. & Nakayama, Tatsuya & Harada, Kazuo & Asayama, Megumi & Warisaya, Minae & Hirata, Kazumasa & Phuong, Nguyen & Yamamoto, Yoshimasa, 2016, Spread of Antibiotic and Antimicrobial Susceptibility of ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Wild and Cultured Fish in the Mekong Delta, Vietnam, *Fish Pathology*, vol. 51
 110. G. Meletis, E. Oustas, C. Botziori, E. Kakasi, và A. Koteli, 2015, Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance, *New Microbiol.*, vol 38, số p.h 3, tr. 417–421
 111. C. Bottoni et al., 2015, Identification of New Natural CphA Metallo- β -Lactamases CphA4 and CphA5 in *Aeromonas veronii* and *Aeromonas hydrophila* Isolates from Municipal Sewage in Central Italy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol 59, số p.h 8, tr. 4990–4993
 112. M. Piotrowska, D. Przygodzińska, K. Matyjewicz, và M. Popowska, 2017, Occurrence and Variety of β -Lactamase Genes among *Aeromonas* spp. Isolated from Urban Wastewater Treatment Plant, *Front. Microbiol.*, vol 8, tr. 863
 113. L. Li et al., 2022, Determining β -lactam antibiotics in aquaculture products by modified QuECHERS combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), *Arab. J. Chem.*, vol 15, số p.h 7, tr. 103912
 114. Huang, En et al., 2023, Carbapenem resistance in the food supply chain, *Journal of food protection*, vol. 86,7, tr. 100108

115. R. E. Hornish và S. F. Kotarski, 2002, Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals, *Curr. Top. Med. Chem.*, vol 2, số p.h 7, tr. 717–731
116. M. J. Spoletti, M. E. Vidal, và F. Ruiz, 2018, Shigella spp in stool cultures: 20 year analysis, *Int. J. Infect. Dis.*, vol 73, tr 333–334
117. Husna, Asmaul et al., 2023, Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities, *Biomedicines* vol. 11,11, tr. 2937
118. Basics of real-time PCR, Available at: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
119. T. T. H. Pham, K. D. H. Dang, E. Rohrbach, F. Breider, và P. Rossi, 2021, Seasonal and spatial variability of antibiotic resistance genes and Class I integrons in the rivers of the Mekong delta, Vietnam, *bioRxiv*.
120. Truong, T., Hoang, T. L., Tran, L. T., Pham, T. P., và Le T., 2020, Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in the Saigon River Impacted by Anthropogenic Activities, *Water*, vol. 13(16), tr. 2234
121. Li, Dong-Fang et al., 2019, Genotyping and Zoonotic Potential of *Enterocytozoon bieneusi* in Pigs in Xinjiang, China, *Frontiers in microbiology*, vol. 10, tr. 2401
122. B. Guo et al., 2022, Prevalence and risk factors of carbapenem-resistant Enterobacterales positivity by active screening in intensive care units in the Henan Province of China: A multi-center cross-sectional stud”, *Front. Microbiol.*, vol 13, tr. 894341
123. Q. Zhang et al., 2020, Cyanobacterial blooms contribute to the diversity of antibiotic-resistance genes in aquatic ecosystems, *Commun. Biol.*, vol 3, số p.h 1, tr. 1–10

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Kit tách chiết DNA - DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Quick-Start Protocol May 2019

DNeasy® PowerSoil® Pro Kit

Solution CD2 should be stored at 2–8°C upon arrival. All other reagents and kit components should be stored at room temperature (15–25°C).


Further information

- DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook: www.qiagen.com/HB-2495
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Ensure that the PowerBead Pro Tubes rotate freely in the centrifuge without rubbing.
- If Solution CD3 has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves.
- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom. Add up to 250 mg of soil and 800 µl of Solution CD1. Vortex briefly to mix.
2. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 1.5–2 ml tubes (cat. no. 13000-V1-24). Vortex at maximum speed for 10 min.
Note: If using the Vortex Adapter for more than 12 preps simultaneously, increase the vortexing time by 5–10 min.
Note: For more information about other bead beating methods, see the “Protocol: Detailed” section of DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook.
3. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 × g for 1 min.
4. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
Note: Expect 500–600 µl. The supernatant may still contain some soil particles.
5. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex for 5 s.
6. Centrifuge at 15,000 × g for 1 min at room temperature. Avoiding the pellet, transfer up to 700 µl of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
Note: Expect 500–600 µl.
7. Add 600 µl of Solution CD3 and vortex for 5 s.

— Sample to Insight — 

8. Load 650 µl of the lysate onto an MB Spin Column and centrifuge at 15,000 × g for 1 min.
9. Discard the flow-through and repeat step 8 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
10. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column.
11. Add 500 µl of Solution EA to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 × g for 1 min.
12. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
13. Add 500 µl of Solution C5 to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 × g for 1 min.
14. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided).
15. Centrifuge at up to 16,000 × g for 2 min. Carefully place the MB Spin Column into a new 1.5 ml Elution Tube (provided).
16. Add 50–100 µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane.
17. Centrifuge at 15,000 × g for 1 min. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.
Note: We recommend storing the DNA frozen (–30 to –15°C or –90 to –65°C) as Solution C6 does not contain EDTA. To concentrate DNA, please refer to the Troubleshooting Guide.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy®, PowerSoil® (QIAGEN Group) 1117569 05/2019 HB-2494.003 © 2019 QIAGEN, all rights reserved.

Phụ lục 2: Bảng các kháng sinh sử dụng trong thí nghiệm đánh giá khả năng KKS bằng cách sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa kháng sinh cho từng nhóm vi khuẩn (S=Nhạy cảm, R=Kháng).

Nhóm vi khuẩn	Nhóm kháng sinh	Tên kháng sinh	Tên viết tắt - nồng độ	Quy ước kháng trên đĩa thạch (cm)
Vi khuẩn đường ruột	Penicillin	Amoxicillin – axit clavulanic	AUG 30 μ g	S \geq 18 R \leq 13
		Piperacillin	PIP 30 μ g	S \geq 14, R <14
		Ticarcillin	TIC-TC 75 μ g	S \geq 23, R \leq 20
		Ticarcillin+Axit clavulanic	TCC-TIM 85 μ g	S \geq 20, R \leq 14
		Piperacillin/Tazobactam	PTZ 36-110 μ g	S \geq 20, R < 20
	Cephalosporin	Cefoxitin	FOX 30 μ g	S \geq 18, R \leq 14
		Cefepime	FEP 30 μ g	S \geq 25, R \leq 18
	Carbapenem	Ertapenem	ETP 10 μ g	S \geq 22, R \leq 18
		Imipenem	IPM 10 μ g	S \geq 23, R \leq 19
	Aminoglycoside	Amikacin	AN-AK 30 μ g	S \geq 17, R \leq 14
		Tobramycin	TM-TOB 10 μ g	S \geq 15, R \leq 12
		Gentamycin	GM-CN 10 μ g	S \geq 15, R \leq 12
	Flouoroquinolones	Nalixidic acid	NA 30 μ g	S \geq 19, R \leq 13
		Ciprofloxacin	CIP 5 μ g	S \geq 26, R \leq 21
		Levofloxacin	LEV 5 μ g	S \geq 21, R \leq 16

Nhóm vi khuẩn	Nhóm kháng sinh	Tên kháng sinh	Tên viết tắt - nồng độ	Quy ước kháng trên đĩa thạch (cm)	
	Monobactams	Aztreonam	ATM 30µg	S ≥ 21, R ≤ 17	
	Khác	Fosfomycin	FOS-FF 200µg	S ≥ 16, R ≤ 12	
		Cotrimoxazole=Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT 25µg	S ≥ 16, R ≤ 10	
<i>Aeromonas</i>	Penicillin	Ticarcillin	TIC-TC 75µg	S ≥ 23, R ≤ 20	
		Piperacillin/Tazobactam	PTZ 36-110µg	S ≥ 20, R < 20	
	Cephalosporin	Cefepime	FEP 30µg	S ≥ 25, R ≤ 18	
	Carbapenem	Imipenem	IPM 10µg	S ≥ 23, R ≤ 19	
	Aminoglycosides	Tobramycin	TM-TOB 10µg	S ≥ 15, R ≤ 12	
		Gentamycin	GM-CN 10µg	S ≥ 15, R ≤ 12	
	Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CIP 5µg	S ≥ 26, R ≤ 21	
		Levofloxacin	LEV 5µg	S ≥ 21, R ≤ 16	
	Khác	Cotrimoxazole=Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT 25µg	S ≥ 16, R ≤ 10	
		Tetracycline	TET 30µg	S ≥ 15, R ≤ 11	
	<i>Pseudomonas</i>	Penicillin	Ticarcillin	TIC-TC 75µg	S ≥ 23, R ≤ 20
			Piperacillin	PIP 30µg	S ≥ 14, R < 14
			Ticarcillin+Axetil clavulanic	TCC-TIM 85µg	S ≥ 20, R ≤ 14
Piperacillin/Tazobactam			PTZ 36-110µg	S ≥ 20, R < 20	

Nhóm vi khuẩn	Nhóm kháng sinh	Tên kháng sinh	Tên viết tắt - nồng độ	Quy ước kháng trên đĩa thạch (cm)
	Cephalosprin	Cefepime	FEP 30µg	S ≥ 25, R ≤ 18
	Carbapenem	Imipenem	IPM 10µg	S ≥ 23, R ≤ 19
	Aminoglycosides	Gentamycin	GM-CN 10µg	S ≥ 15, R ≤ 12
	Flouroquinolones	Nalixidic acid	NA 30µg	S ≥ 19, R ≤ 13
		Ciprofloxacin	CIP 5µg	S ≥ 26, R ≤ 21
		Levofloxacin	LEV 5µg	S ≥ 21, R ≤ 16
	Monobactams	Aztreonam	ATM 30µg	S ≥ 21, R ≤ 17
<i>Acinetobacter</i>	Penicillin	Ticarcillin	TIC-TC 75µg	S ≥ 23, R ≤ 20
		Piperacillin/Tazobactam	PTZ 36µg	S ≥ 20, R < 20
	Cephalosprin	Cefepime	FEP 30µg	S ≥ 25, R ≤ 18
	Carbapenem	Imipenem	IPM 10µg	S ≥ 23, R ≤ 19
	Aminoglycosides	Tobramycin	TM-TOB 10µg	S ≥ 15, R ≤ 12
		Gentamycin	GM-CN 10µg	S ≥ 15, R ≤ 12
	Flouroquinolones	Ciprofloxacin	CIP 5µg	S ≥ 26, R ≤ 21
		Levofloxacin	LEV 5µg	S ≥ 21, R ≤ 16
	Khác	Cotrimoxazole=Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT 25µg	S ≥ 16, R ≤ 10
		Tetracycline	TET 30µg	S ≥ 15, R ≤ 11

Phụ lục 3: Bảng đánh giá chất lượng nước ở các vị trí lấy mẫu được đo bằng máy Horiba Multiparameter Water Quality meter kit (Thermo Fisher, Đức).

STT	Tên khu vực	Nhiệt độ nước (độ C)	pH	Chỉ số oxy hoá khử (ORP mV)	Độ dẫn điện (mS/cm)	Độ đục (NTU)	Nồng độ oxy hoà tan (mg/L DO)	Phần trăm oxy hoà tan (%DO)	Tổng chất rắn hoà tan (g/L TDS)
1	CT1	28,65	7,45	148	0,43	98,5	2,82	36,8	27,9
2	CT2	28,62	7,16	150	0,43	98,1	2,91	37,9	27,9
3	SCT2	29,99	6,88	182	0,431	96,9	2,06	26,8	0,28
4	CT3	30,3	6,72	193	0,416	106	4,62	61,3	27,1
5	SCT3	30,04	6,68	196	0,363	196	0,72	9,6	23,5
6	SCT4	30,05	6,67	190	0,401	189	0,99	13,1	26,1
7	CT4	30,7	6,76	203	0,449	198	1,38	18,4	29,2
8	CT5	30,42	6,43	220	0,483	130	1,21	16,1	31,4
9	SCT5	30,8	6,56	198	0,424	117	3,51	47,2	27,6
10	DT1	29,61	6,41	213	0,475	104	1,31	17,3	30,9
11	SDT1	27,69	7,35	119	0,423	56,8	1,22	15,7	27,5
12	DT2	29,71	6,29	209	0,433	87,4	1,33	17,7	28,2
13	DT3	29,71	6,45	200	0,416	66	1,58	20,9	27,1
14	SDT3	29,75	6,54	147	0,471	102	1,43	19	30,6
15	DT4	28,9	7,94	168	12,5	38,2	1,21	15,8	7,78
16	SDT4	29,04	7,03	149	11,6	507	0,45	6	7,21
17	STDT	28.21	7,21	92	23,6	46,7	1,04	13,5	14,6

Phụ lục 4: Bảng thông tin nồng độ và chất lượng 34 DNA tổng số bao gồm các mẫu nước, trầm tích đo bằng máy Nanodrop 2000 spectrophotometers (Thermo Fisher, Mỹ).

STT	Tên mẫu	Nồng độ (ng/ μ L)	OD 260/280
1	CT1-W	34,1	2
2	CT2-W	21	1,91
3	SCT2-W	45,1	1,9
4	CT3-W	23	1,87
5	SCT3-W	23,3	2,01
6	SCT4-W	49,8	1,9
7	CT4-W	38,6	2,01
8	CT5-W	29,2	1,89
9	SCT5-W	49,8	1,9
10	DT1-W	13,2	2,14
11	SDT1-W	70,1	1,95
12	DT2-W	28,9	1,94
13	DT3-W	22,6	1,93
14	SDT3-W	51,3	1,92
15	DT4-W	45	2
16	SDT4-W	71	2
17	STDT-W	96	2,02
18	CT1-S	231,4	2,01
19	CT2-S	370,6	1,9
20	SCT2-S	265,3	2,01
21	CT3-S	258,7	1,9
22	SCT3-S	362,8	1,87
23	SCT4-S	21,3	1,9
24	CT4-S	75,4	1,91
25	CT5-S	279,9	1,92
26	SCT5-S	190,9	1,98
27	DT1-S	334,5	1,91
28	SDT1-S	193,2	1,87

STT	Tên mẫu	Nồng độ (ng/μL)	OD 260/280
29	DT2-S	29,2	1,88
30	DT3-S	161,1	1,92
31	SDT3-S	380,9	1,93
32	DT4-S	296,4	1,92
33	SDT4-S	12,7	2
34	STDT-S	93,6	2

Phụ lục 5: Bảng đánh giá chất lượng đường chuẩn, được thực hiện trên máy *Quanstudio 5 Dx Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Mỹ)*.

STT	Tên gen	Độ dốc	Giá trị chặn Y	R²	Độ hiệu quả (%)
1	16S rRNA	-3,369	34,993	0,997	98,076
2	<i>sul1</i>	-3,546	37,643	0,996	91,436
3	<i>sul2</i>	-3,545	39,019	0,993	91,482
4	<i>tetX</i>	-3,244	36,115	0,943	103,340
5	<i>tetQ</i>	-3,674	39,599	0,988	87,134
6	<i>tetM</i>	-3,475	34,431	0,999	93,978
7	<i>NDM</i>	-3,246	35,046	0,986	103,287
8	<i>IMP</i>	-3,494	33,993	0,96	93,281
9	<i>KPC</i>	-3,125	33,892	0,994	108,954
10	<i>OXA</i>	-3,451	30,248	0,994	94,874
11	<i>VIM</i>	-3,431	32,029	0,998	95,630
12	<i>Mcr-1</i>	-3,429	37,481	0,999	95,722
13	<i>mecA</i>	-3,079	35,156	0,988	111,258
14	<i>vanA</i>	-3,891	38,892	0,972	80,716
15	<i>intl1</i>	-3,383	35,520	0,978	97,299

Phụ lục 6: Bảng biểu diễn số bản sao gen 16S rRNA tại Cần Thơ và Đồng Tháp.

Vị trí			Tên mẫu	Số bản sao 16S rRNA/ μ l
CẦN THƠ	Nước	Ao	CT1-W	$1,05 \times 10^5$
			CT2-W	$2,3 \times 10^6$
			CT3-W	$4,3 \times 10^7$
			CT4-W	$7,3 \times 10^6$
		CT5-W	$1,8 \times 10^5$	
		Sông	SCT2-W	$2,8 \times 10^6$
			SCT3-W	$8,6 \times 10^6$
			SCT4-W	$5,6 \times 10^5$
	SCT5-W		$3,9 \times 10^5$	
	Trầm Tích	Ao	CT1-S	$1,2 \times 10^6$
			CT2-S	$9,3 \times 10^5$
			CT3-S	$1,05 \times 10^6$
			CT4-S	$1,3 \times 10^6$
		Sông	SCT2-S	$9,2 \times 10^5$
SCT3-S			$5,3 \times 10^5$	
SCT4-S			$1,4 \times 10^6$	
SCT5-S			3×10^5	
ĐỒNG THÁP	Nước	Ao	DT1-W	$5,2 \times 10^5$
			DT2-W	$9,8 \times 10^5$
			DT3-W	$1,1 \times 10^6$
			DT4-W	$4,8 \times 10^6$
		Sông	SDT1-W	$8,7 \times 10^5$
			SDT3-W	$2,1 \times 10^5$
			SDT4-W	$1,6 \times 10^5$
			STDT-W	$3,2 \times 10^5$
	Trầm Tích	Ao	DT1-S	$5,6 \times 10^5$
			DT2-S	$7,9 \times 10^5$
			DT3-S	$7,4 \times 10^5$
			DT4-S	$9,9 \times 10^5$
		Sông	SDT1-S	$6,7 \times 10^5$
			SDT3-S	$2,9 \times 10^6$
SDT4-S			$1,2 \times 10^6$	
STDT-S			$9,4 \times 10^5$	

Phụ lục 8: Kết quả kháng sinh đồ của chủng vi khuẩn vi khuẩn phân lập được thuộc chi *Aeromonas*.

ID	Name	Céfépime 30ug	Cefoxitin 30ug	Cefazidime 10ug	Cefotaxime 5ug	Aztreonam 30 ug	Levofloxacin 5ug	Ciprofloxacin 5ug	Imipenem 10ug	Amikacin 30ug	Gentamicin 10ug	Tetracycline 30ug	Cotrimoxazole 25ug
Aero-DT1.2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Aero-DT3.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
Aero-STC3.2.2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
CA-TT-K2.2	<i>Aeromonas caviae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aero-TT-STC5.1	<i>Aeromonas jandaei</i>	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
CA-TT-TV2.1	<i>Aeromonas bestiarum</i>	I	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
CA-TT-TV2.3	<i>Aeromonas salmonicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
CA-TV2.1	<i>Aeromonas caviae</i>	R	S	R	R	R	I	I	I	S	S	S	S
CA-TV6.1	<i>Aeromonas jandaei</i>	R	I	R	R	R	I	I	S	S	S	S	S
Aero-TV6.1.1	<i>Aeromonas veronii</i>	S	S	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S

Phụ lục 11: Kiểm định thống kê về độ phong phú tương đối.

Statistical test for relative abundance (N: Nước, TT: Trâm Tích, R: Ruột Cá)

Comparison <chr>	Z <dbl>	P.unadj <dbl>	P.adj <dbl>	Comparison <chr>	Z <dbl>	P.unadj <dbl>	P.adj <dbl>	Comparison <chr>	Z <dbl>	P.unadj <dbl>	P.adj <dbl>
N - R	2.6914123	0.007115021	0.010672532	N - R	-2.3008997	0.02139730	0.03209595	N - R	2.473199	1.339096e-02	2.008644e-02
N - T	-0.4151763	0.678012823	0.678012823	N - T	-2.4194759	0.01554289	0.04662868	N - T	-2.234394	2.545718e-02	2.545718e-02
R - T	-3.0085084	0.002625335	0.007876006	R - T	0.4529945	0.65055269	0.65055269	R - T	-4.179745	2.918358e-05	8.755074e-05
SulI				VanA							
N - R	4.061507	4.875694e-05	0.0001462708	N - R	2.408807	0.0160047394	0.0240071091	N - R	3.8863805	0.0001017500	0.0003052499
N - T	1.453180	1.461737e-01	0.1461736562	N - T	-1.784588	0.0743281119	0.0743281119	N - T	0.7015048	0.4829880160	0.4829880160
R - T	-2.951622	3.161095e-03	0.0047416424	R - T	-3.771809	0.0001620681	0.0004862043	R - T	-3.3505974	0.0008063745	0.0012095618
Sul2				βII							
N - R	1.2625004	0.2067688	0.6203063	N - R	0.000000	1.00000000	1.00000000	N - R			
N - T	0.4086415	0.6828028	0.6828028	N - T	-1.949755	0.05120538	0.1536161	N - T			
R - T	-0.9503953	0.3419114	0.5128672	R - T	-1.489150	0.13644797	0.2046720	R - T			
TeX				bioAXA							
N - R	1.043449	0.296740186	0.29674019	N - R	2.8704254	0.004099199	0.006148799	N - R			
N - T	-2.047249	0.040633661	0.06095049	N - T	-0.3725517	0.709482111	0.709482111	N - T			
R - T	-2.607062	0.009132294	0.02739688	R - T	-3.1549664	0.001605166	0.004815497	R - T			
TeX2				bioVM							
N - R	0.5373452	0.5910292	0.5910292	N - R	2.784953	0.0053535535	0.008030330	N - R			
N - T	-0.7730870	0.4394709	0.6592064	N - T	3.646359	0.0002659823	0.000797947	N - T			
R - T	-1.1278001	0.2594043	0.7782130	R - T	0.000000	1.0000000000	1.000000000	R - T			
Tem				McrI							
N - R	2.552721	1.068851e-02	0.0160327694	N - R	-1.8524737	0.06395783	0.1918735	N - R			
N - T	-1.998012	4.571539e-02	0.0457153884	N - T	-0.3267895	0.74382707	0.7438271	N - T			
R - T	-4.078727	4.528288e-05	0.0001358486	R - T	1.6028841	0.10896025	0.1634404	R - T			
bioDM				Meca							

Statistical test for relative abundance (C: Cần Thơ, D: Đồng Tháp)

Su12	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.7269678	0.73	0.73	ns	ns	Wilcoxon
Su2	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.02140277	0.021	0.021	*	*	Wilcoxon
Te1X	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.684848	0.68	0.68	ns	ns	Wilcoxon
Te1Q	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.7859896	0.79	0.79	ns	ns	Wilcoxon
Te1M	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.9484674	0.95	0.95	ns	ns	Wilcoxon
biANDM	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	1	1	1	ns	ns	Wilcoxon
biAMP	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.02098788	0.021	0.021	*	*	Wilcoxon
biKPC	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.9058543	0.91	0.91	ns	ns	Wilcoxon
biAOXA	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.05988791	0.06	0.06	ns	ns	Wilcoxon
biAVM	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.06135181	0.061	0.061	ns	ns	Wilcoxon
Me1	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.002156502	0.0022	0.0022	**	**	Wilcoxon
MeCA	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.03797235	0.038	0.038	*	*	Wilcoxon
VaNA	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	1	1	1	ns	ns	Wilcoxon
Int1	.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.005386093	0.0054	0.0054	**	**	Wilcoxon

Phụ lục 12: Kết quả độ phong phú tuyệt đối của gen kháng bằng phương pháp qPCR nhắm đích.

	SuII	SuII	TeIX	TeIQ	TeIM	NDM	blaIMP	blaKPC	blaOXA	blaVIM	blaMcrI	MecA	VanA	Int1
CT1-W	519.6409203	0	0	5722.001028	97925.69747	541.5274654	0	30.02776379	633.70758	0	0	0	745.0793167	168096.2484
CT2-W	1188.907475	108744.1723	4365.166472	10756.12413	619.77307	881.815885	0	322.22463	35.87530625	0	138.1820298	0	0	333440.0475
SC12-W	20523.65475	938869.0621	60256.47614	125199.4792	5145.713063	11696.63617	1711100.089	156.2776637	342.0905657	0	2203.411339	0	8949.8695	2187391.116
CT3-W	2723.963025	40773.02968	3980.895572	1962.870983	141.944385	448.0682708	115844.3358	6.488800492	17.17652842	0	394.5562428	906.25543	621.4216667	170341.3158
SC13-W	68626.05308	9443943.379	0	863280.3003	86305.93775	56427.82544	22498.364	1212.353367	179.4637648	0	0	0	82203.53782	4058657.873
SC14-W	3974.686819	343620.4565	124083.4229	9466.29774	567.745232	2272.930225	191162.9233	98.88891525	84.6759858	0	392.0964326	0	8025.91325	263487.235
CT4-W	43829.55013	3514524.853	1599706.229	223783.4485	24674.01649	50283.11668	359421.539	494.2423452	246.5198007	0	1134.654974	512.310008	20403.73162	9423383.26
CT5-W	3657.56548	99183.1144	0	1241.538594	3949.31314	1116.615884	108431.8056	26.91029173	28.5837048	0	0	135.0716177	1064.3473	79780.62833
SC15-W	6624.02001	139808.7981	5389.137382	7367.700425	719.593866	1167.518919	72782.2435	195.8927322	0	0	681.7378022	0	5586.0743	588850.389
DT1-W	5925.55526	212699.52	31757.19799	8790.6148	73.0706086	1138.53795	102894.462	94.213031	97.7688991	0	293.6660254	512.228123	46423.1405	505556.733
SD1-W	12948.01736	760939.9747	39982.19172	53851.30486	2181.903976	8304.526185	974730.7444	570.8987533	0	0	942.1780043	1496.750431	17125.15544	2154497.563
DT2-W	40910.47634	895927.166	157037.4642	74217.89974	5416.173083	6979.713899	0	643.6588733	0	0	0	448.958718	16111.01546	2024271.745
DT3-W	7047.128422	650416.5117	57185.89857	71434.11202	3847.62288	4315.4022	1267697.92	309.7994817	3245.886768	0	0	370.7297357	10633.40547	1553392.732
SD13-W	5929.230488	170533.6574	5666.773232	41739.70635	1099.082322	1384.789892	642445.5465	103.524768	117.343791	0	394.5243363	0	2720.468925	6143311.2158
DT4-W	24132.27188	1949226.45	250896.5316	44955.39375	2985.453	12489.4995	1515206.25	647.84865	0	0	0	0	18834.66	2839251.75
SD14-W	455.7100447	89283.53542	8373.187596	4655.677675	828.2094383	5092.383292	2699776.302	345.0815544	196.9828319	0	0	0	6672.023833	93294.91708
SD15-W	2413.89016	245271.04	5594.946243	720.43	694.23872	4773.6304	58234068	389.33224	321.60608	0	0	2198.14896	0	405509.216
CT1-S	11336833.26	885080934.4	64868484.13	372182649.3	6298117.236	28652858.94	13093461238	3239111.746	1109453.316	0	0	0	100235676.8	24882868993
CT2-S	14297191.31	1411020276	146898807.9	1218662662	13727889.46	1606192523	2767402036	4996499.641	3118141.494	0	0	0	183977624.5	3796637997
CT3-S	9998662.61	832483020.2	30272499.39	125414380.3	403629.4465	25361386.78	4067113474	3939286.263	1216282.609	0	0	0	87200440.47	2887018767
SC12-S	15342253.88	1568948924	92879278.45	135537282.5	10902873.45	759458669.91	1807044368	5778133.205	2991796.728	0	0	8031931.336	95749125.62	3692963508
SC13-S	20302858.98	1045617693	54229232.15	168215397	8162432.988	44645795.35	1908827972	2374924.033	991023.6836	0	0	247997710.4	54274587.38	1597655946
SC14-S	8797740.068	619380419.8	35939701.24	202623732.4	8616950.256	25581075.62	1861346312	1399284.246	2171368748	0	0	4347873.629	140208790.2	1577920187
CT4-S	12630598.76	1313858424	66511594.43	494572261.3	25907967.46	39477263.46	29366519685	3110055.107	1538576.104	0	0	7079300.018	82190930.25	2001694808
CT5-S	861808.2265	180750832.5	0	66661775.64	13029020.97	0	345470018.4	55343.51338	304374.9659	0	0	2996699.956	5894880.57	4139870378
SC15-S	363604338.9	369581667	13761723.99	9138724.13	3667667.037	20047771.72	63191585535	821322.8296	2577556.169	0	0	532003.0976	36727807.16	1762001432
SD1-S	69808583.08	937780433.2	94230021.26	244123367	9502924.626	45302433.35	87686830689	6242579.289	1573209.971	0	0	9770794.51	369617249.9	2368761389
DT1-S	2859485931	515372344.5	34904246.42	34904246.42	10499597.81	63018360.65	5405169627	2533156.51	728494.8314	0	0	0	24826714.64	1058425683
DT2-S	26119961.1	671304127	0	653978028.9	12800107.36	15380017.3	1460974098	2406687.27	977029.0864	92949.62235	0	0	8411143.94	1865036794
DT3-S	38809397.94	763745013.9	46099588.59	138880714.8	7221751.03	32450645.11	2446126.508	7952961.114	0	0	0	143379.4562	42666576.1	1033570314
SD13-S	4621288508	1516490544	92731455.56	2133844918	19716456.67	368434605.6	0	5674202.209	4653224.879	0	0	4092759.858	329137335.5	1663678994
DT4-S	23883883.89	891179597.1	66417999.11	13941660.25	59544773.6	2258045.86	152321673	0	0	0	0	0	148060037.7	1424283777
SD14-S	73270487.9	1815796147	100652675.6	51701054.08	2624374.969	17486148.42	5370470734	537327.9683	1296310.622	2106644.695	0	15694333.01	36375030.9	10412296321
SD15-S	87516405.6	2165904231	418837138.7	294887251.1	5829403.693	8532939.792	743590941.6	157298.2574	981767.578	215726.0536	0	2635993.77	10230252.7	1137601807

Phụ lục 13: Kiểm định thống kê về độ phong phú tuyệt đối.

Statistical test for absolute abundance (N:Nước, TT: Trâm Tích, R: Ruột Cá)

Comparison <chr>	Z <dbl>	P.unadj <dbl>	P.adj <dbl>	Comparison <chr>	Z <dbl>	P.unadj <dbl>	P.adj <dbl>
C - D	-2.000574	0.04543830	0.06815745	C - D	-1.1436717	0.2527598	0.7582794
C - S	-2.535647	0.01122399	0.03367196	C - S	-0.9759086	0.3291098	0.4936646
D - S	-0.311221	0.75563259	0.75563259	D - S	0.2646392	0.7912874	0.7912874
Su1							
C - D	-1.1853279	0.2358782	0.3538317	C - D	-0.3161634	0.7518785	0.7518785
C - S	-1.6497698	0.09899003	0.2969701	C - S	-0.9714888	0.3313049	0.9939148
D - S	-0.3221339	0.74735128	0.7473513	D - S	-0.5824799	0.5602435	0.8403653
Su2							
C - D	-1.8729299	0.06107806	0.1832342	C - D	-0.3259436	0.7444670	0.7444670
C - S	-1.5512496	0.12084189	0.1812628	C - S	-0.8865211	0.3753368	1.0000000
D - S	0.4772474	0.63318593	0.6331859	D - S	-0.4930292	0.6219920	0.9329879
Te1							
C - D	-1.1973847	0.2311567	0.6934700	C - D	-0.8133483	0.4160184	0.6240276
C - S	-0.9307555	0.3519801	0.5279701	C - S	-1.3259800	0.1848463	0.5545390
D - S	0.3620821	0.7172907	0.7172907	D - S	-0.4022512	0.6874992	0.6874992
Te2							
C - D	-0.6982502	0.4850208	1.0000000	C - D	0.7809768	0.4348161	0.6522242
C - S	-0.4317728	0.6659066	0.9988598	C - S	-0.7352238	0.4622032	0.4622032
D - S	0.3148540	0.7528725	0.7528725	D - S	-1.4903410	0.1361346	0.4084038
TeM							
C - D	-0.7550849	0.45019805	0.45019805	C - D	-0.4618990	0.6441538	0.9662307
C - S	-2.1435044	0.03207262	0.09621785	C - S	-0.8987155	0.3688042	1.0000000
D - S	-1.2260427	0.22018262	0.33027393	D - S	-0.3645673	0.7154344	0.7154344
blADM							
C - D	-0.8959408	0.37028436	0.5554265	C - D	-0.75879208	0.4479769	0.6719654
C - S	-1.6894953	0.09112455	0.2733737	C - S	-0.92871883	0.3530348	1.0000000
D - S	-0.6569408	0.51121896	0.5112190	D - S	-0.08719033	0.9305202	0.9305202
blGMP							
C - D	-0.75879208	0.4479769	0.6719654	C - D	-0.75879208	0.4479769	0.6719654
C - S	-0.92871883	0.3530348	1.0000000	C - S	-0.92871883	0.3530348	1.0000000
D - S	-0.08719033	0.9305202	0.9305202	D - S	-0.08719033	0.9305202	0.9305202
blKPC							
C - D	-0.3259436	0.7444670	0.7444670	C - D	-0.3259436	0.7444670	0.7444670
C - S	-0.8865211	0.3753368	1.0000000	C - S	-0.8865211	0.3753368	1.0000000
D - S	-0.4930292	0.6219920	0.9329879	D - S	-0.4930292	0.6219920	0.9329879
blOXA							
C - D	-0.8133483	0.4160184	0.6240276	C - D	-0.8133483	0.4160184	0.6240276
C - S	-1.3259800	0.1848463	0.5545390	C - S	-1.3259800	0.1848463	0.5545390
D - S	-0.4022512	0.6874992	0.6874992	D - S	-0.4022512	0.6874992	0.6874992
blVIM							
C - D	0.7809768	0.4348161	0.6522242	C - D	0.7809768	0.4348161	0.6522242
C - S	-0.7352238	0.4622032	0.4622032	C - S	-0.7352238	0.4622032	0.4622032
D - S	-1.4903410	0.1361346	0.4084038	D - S	-1.4903410	0.1361346	0.4084038
Mcr1							
C - D	-0.4618990	0.6441538	0.9662307	C - D	-0.4618990	0.6441538	0.9662307
C - S	-0.8987155	0.3688042	1.0000000	C - S	-0.8987155	0.3688042	1.0000000
D - S	-0.3645673	0.7154344	0.7154344	D - S	-0.3645673	0.7154344	0.7154344
Meca							

Statistical test for absolute abundance (C: Cần Thơ, D: Đồng Tháp)

.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.133866	0.13	0.13	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.5919706	0.59	0.59	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.1161692	0.12	0.12	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.707622	0.71	0.71	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.9484674	0.95	0.95	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.6471497	0.65	0.65	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.4010784	0.4	0.4	ns	Wilcoxon

.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.7859896	0.79	0.79	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.9267082	0.93	0.93	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.05988791	0.06	0.06	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.3573971	0.36	0.36	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.4265158	0.43	0.43	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.8647315	0.86	0.86	ns	Wilcoxon
.y. <chr>	group1 <chr>	group2 <chr>	p <dbl>	p.adj <dbl>	p.format <chr>	p.signif <chr>	method <chr>
Abundance	C	D	0.7859896	0.79	0.79	ns	Wilcoxon



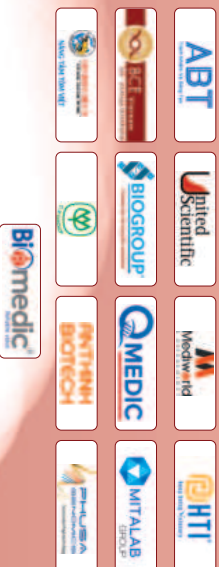
BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

TÀI TRỢ KIM CƯƠNG



TÀI TRỢ VÀNG



TÀI TRỢ BẠC



ĐẠI HỌC HUẾ
NHIỀU TÁC GIẢ

BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào; Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường;
Công nghệ sinh học nông nghiệp; Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trí liệu tế bào

NXB ĐẠI HỌC HUẾ



ĐẠI HỌC HUẾ
NHIỀU TÁC GIẢ

BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

Thành phố Huế, ngày 25 - 26 tháng 9 năm 2024

Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào;
Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp;
Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trí liệu tế bào



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ



33. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Colletotrichum gloeosporioides* GÂY BỆNH THÂN THỤ TRÊN TRÁI XOÀI CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM MEN. Trần Thị Thu Hà, Trương Quang Toàn, Nguyễn Thị Vân Khanh, Vũ Ngọc Khánh Như, Lê Ngọc Tường An, Nguyễn Thị Thu Ngân, Bành Hữu Tĩnh, Trương Phước Thiên Hoàng, Đào Uyên Trân Đa..... 1037
34. ẢNH HƯỞNG CỦA TẠ CHẤT ĐÈN KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH KHÁNG THỂ VÀ HIỆU QUẢ BẢO HỘ CỦA VACCINE VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH LỖI MẮT DO *Streptococcus iniae* Ở CÁ CHÈM *Lates calcarifer*. Nguyễn Thị Thanh Thủy, Nguyễn Thị Quế Chi, Lê Hồng Tuấn, Nguyễn Văn Hùng 1044
35. PHÂN TÍCH DI TRUYỀN SRI LANKAN CASSAVA MOSAIC VIRUS TRÊN CÂY SẴN BỊ BỆNH KHẢM LÁ TẠI MIỀN TRUNG VIỆT NAM. Nguyễn Lê Quý Bảo, Trương Thị Hồng Hải, Hồ Ngọc Hân 1050
36. EVALUATION OF THE INHIBITORY ABILITY OF *Piper nigrum* AND *Piper divaricatum* LEAF WATER EXTRACTS ON *Phytophthora capsici* IN/IN-VITRO. Lê Hoàng Duy Minh, Nguyễn Tiên Long, Trương Thị Hồng Hải..... 1056
37. NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH KHÁNG NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT CỦA CHỦNG XA KHUẨN NỘI SINH *Streptomyces xylanilyticus* MC5. Quách Ngọc Tùng, Nguyễn Trần Khánh Chi, Lê Hoàng Nguyệt Minh, Phạm Thủy Dương, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Phi Quyết Tiến 1062
38. ĐA HÌNH GEN CALPASTATIN (CAST) LIÊN QUAN ĐẾN ĐỘ MỀM THỊT Ở BÒ VÀNG NUÔI TẠI CÁC TỈNH MIỀN TRUNG VÀ TÂY NAM VIỆT NAM. Lê Nữ Anh Thư, Dương Thị Hương, Nguyễn Bình Nguyên, Nguyễn Bá Trung, Lê Đình Phùng..... 1068
39. ANTAGONISTIC EVALUATION OF *Chaetomium* sp. FOR FUNGI CAUSING TUBER ROT DISEASE ON NGOC LINH GINSENG (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Phung T. N. Han, Dao U. T. Da, Tran T. T. Ha, Cao T. T. Loan..... 1074
40. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐÔI KHÁNG CỦA VI KHUẨN *Bacillus* sp. VỚI NẤM *Fusarium* sp. ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ CÂY QUýt HỒNG *Citrus Reticulata* Blanco BỊ BỆNH VÀNG LÁ THỐI RỀ TẠI HUYỆN LAI VUNG, TỈNH ĐỒNG THÁP. Phạm Thị Ái Niệm, Nguyễn Xuân Đồng, Trần Tuấn Anh, Võ Thị Minh Thảo, Nguyễn Minh Khánh, Nguyễn Ngọc Phi, Trần Ngọc Quốc Tường, Nguyễn Lê Huy Khanh, Phan Thị Hồng Thanh, Nguyễn Tử Minh 1081
41. NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG VI KHUẨN KHÁNG KHÁNG SINH VÀ SỰ PHÓ BIẾN GEN KHÁNG KHÁNG SINH Ở MỘT SỐ AO NUÔI CÁ TRÁ TẠI CÁN THƠ VÀ ĐỒNG THÁP. Vũ Đặng Hải Long, Nguyễn Đăng Quang, Nguyễn Quang Huy 1089
42. XÁC ĐỊNH SỰ HIỆN DIỆN CỦA *Salmonella* VÀ GEN ĐỘC TÔ ĐƯỜNG RUỘT (Stn) PHÂN LẬP TỪ TRỨNG GÀ. Nguyễn Thị Đông Phương, Đặng Ngọc Phương Uyên, Tạ Đặng Ý Vi, Huỳnh Văn Chương 1095
43. PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT THỂ THỰC KHUẨN ĐẶC HIỆU CHO VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TRÊN TÔM. Nguyễn Thành Thắng, Mai Thị Hồng Nhung, Nguyễn Thành Trung, Nguyễn Thanh Hòa, Trương Quốc Phong..... 1102
44. ẢNH HƯỞNG CỦA TÔ HỢP PHẦN BÓN ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG, NĂNG SUẤT VÀ PHẨM CHẤT CỦA CÂY THỦ LÚ NAM MỸ (*Physalis philadelphica*) TRỒNG TẠI AN GIANG. Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Nguyễn Minh Thắng, Nguyễn Thị Hoàng Mỹ, Nguyễn Minh Trang 1108
45. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ NÂNG CAO TÍNH CHỊU MẠN Ở CÂY LÚA CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Enterobacter mori* RS1. Lê Văn Mạnh, Hồ Mạnh Tường, Nguyễn Thị Hồng Hà, Phan Quyền, Bùi Phương Thảo, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát..... 1115
46. NGHIÊN CỨU NUÔI TRỒNG VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÀNH PHẦN DINH DƯỠNG CỦA NẤM LÁ SEN *Pleurotus giganteus* V5-9M NUÔI TRỒNG TẠI HÀ NỘI. Lê Thị Hoàng Yến, Đồng Thị Hoàng Anh, Trần Huyền Thanh, Nguyễn Mỹ Linh, Nguyễn Thị Anh Đào, Lê Hồng Anh, Phạm Thị Bích Đào, Trịnh Tam Kiệt..... 1121
47. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN NUÔI CÂY VÀ CÁC CHẤT BẢO VỆ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG NẤM SỢI SAU BẢO QUẢN ĐỒNG KHỔ. Nguyễn Thị Hiếu Thu, Trần Khánh Linh, Nguyễn Thị Kim Thanh, Ngô Cao Cường 1128
48. MOLECULAR PHYLOGENY OF *Lasiodiplodia theobromae* ASSOCIATED WITH *Nelumbo nucifera* IN THUA THIEN HUE, VIETNAM AND THEIR SENSITIVITY TO SILVER NANOPARTICLES. Vu Quang Hoang Nguyen, Quang Tan Hoang, Lan Thuy Tran, Tram Tran Thi Ngoc, Hoang Thi Kim Hong 1135

CÔNG NGHỆ SINH HỌC Y DƯỢC

1. THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH TIỂU CHÁY CỦA TINH DẦU QUẢ MĂNG TANG (*Litsea cubeba*). Chu Thanh Bình, Trương Thị Chiên, Đào Ngọc Ánh, Nguyễn Hữu Thắng 1144

NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG VI KHUẨN KHÁNG KHÁNG SINH VÀ SỰ PHỔ BIẾN GEN KHÁNG KHÁNG SINH Ở MỘT SỐ AO NUÔI CÁ TRA TẠI CẦN THƠ VÀ ĐỒNG THÁP

Vũ Đặng Hải Long^{1,2}, Nguyễn Đăng Quang², Nguyễn Quang Huy^{2*}

¹ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

² MICH, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

TÓM TẮT

Kháng kháng sinh (KKS) là một mối đe dọa nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng và môi trường, tác động trực tiếp đến thực hiện các mục tiêu phát triển bền vững của Liên Hợp Quốc. Có rất nhiều nghiên cứu về KKS trong lĩnh vực y tế, tuy nhiên nghiên cứu về KKS trong môi trường lại chưa được nghiên cứu ở Việt Nam. Sông Mekong, với vai trò quan trọng trong phát triển kinh tế và an ninh lương thực, đang đối mặt với sự ô nhiễm nghiêm trọng từ các hoạt động của con người. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định tình trạng vi khuẩn KKS và sự phổ biến gen KKS tại một số ao nuôi cá tra ở Cần Thơ và Đồng Tháp. Tổng cộng 105 chủng vi khuẩn đã được định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS, trong đó xác định được 24 loài gây bệnh ở người và động vật, phổ biến nhất gồm *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas jandaei* và *Aeromonas veronii*. Các chủng vi khuẩn gây bệnh đã kháng với ít nhất một loại kháng sinh được thử nghiệm. Tỷ lệ KKS cao nhất đối với Amoxicillin-Clavulanic acid (64.3%), Cefepime (32.4%), Cefoxitin (55.4%), Azetronam (31.7%) và Cefprozidime (30%). Bên cạnh đó, các gen KKS gồm *Sul1*, *Sul2*, *TetM*, *TetQ*, *TetX* và *blaNDM* đã được phát hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu (100%). Kết quả nghiên cứu này nhấn mạnh sự cần thiết của việc giám sát và quản lý chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh trong nuôi thủy sản để giảm thiểu sự chọn lọc và lây lan vi khuẩn kháng thuốc trong môi trường sông và chuỗi thực phẩm, tiềm ẩn rủi ro sức khỏe con người.

Từ khóa: Cá tra, Gen kháng thuốc, Kháng kháng sinh, Sông Mekong, Vi khuẩn gây bệnh.

MỞ ĐẦU

Sự xuất hiện và phổ biến của tình trạng kháng thuốc kháng sinh (KKS) đã trở thành mối đe dọa nghiêm trọng tới sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Ngày nay, hầu hết tất cả các nhóm kháng sinh cùng với nhiều loại vi khuẩn KKS và gen KKS đã được ghi nhận trong môi trường sông. *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* và *Vibrionaceae* là những họ vi khuẩn thường gặp trong môi trường thủy sinh nhưng trong đó có nhiều loài là những tác nhân gây bệnh ở người và động vật (Rico *et al.*, 2013). Đáng lưu ý, chúng vừa là vật chủ và có khả năng trao đổi, tiếp nhận gen KKS với nhau và với các loài khác (kể cả loài gây bệnh và không gây bệnh), dẫn đến bùng phát nhanh chóng các loài VK đa kháng thuốc (VKĐKT) (Van Boeckel *et al.*, 2019).

Sông Mekong là con sông lớn nhất khu vực Đông Nam Á, lớn thứ 7 tại Châu Á và thứ 12 trên thế giới, là nguồn sống, là nơi lưu trú và nuôi dưỡng trên 100 triệu người (tương đương dân số cả Việt Nam) của 06 quốc gia gồm Trung Quốc, Myanmar, Thái Lan, Lào, Campuchia và Việt Nam. Các nghiên cứu từ Việt Nam cho thấy 70% kháng sinh được sử dụng thường xuyên trong hệ thống nuôi trồng thủy sản cùng loại và hoặc cùng nhóm kháng sinh sử dụng ở người, trong đó gồm cả những nhóm kháng sinh cực kỳ quan trọng, kháng sinh dự phòng trong điều trị. Do đó, sông Mekong có thể là một điểm nóng môi trường quan trọng, thúc đẩy sự chọn lọc và phát tán vi khuẩn KKS trên phạm vi rộng lớn của các quốc gia sông Mekong. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm xác định thực trạng tình hình ô nhiễm vi khuẩn gây bệnh KKS và gen KKS tại khu vực nhánh sông Mekong (nơi cấp nước và thải nước cho ao nuôi cá tra) và trong ao nuôi cá tra ven bờ sông. Kết quả của nghiên cứu này sẽ góp phần cảnh báo, kiểm soát và đưa ra những biện pháp quản lý kịp thời góp phần giảm thiểu tối đa tác động đến cộng đồng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Tổng cộng 17 mẫu nước và 17 mẫu bùn trầm tích đã được thu thập từ các ao nuôi cá tra tại Cần Thơ, Đồng Tháp và khu vực cấp nước/thải nước từ sông Mekong vào ao nuôi cá. Các mẫu nghiên cứu được bảo quản trong các thùng đá lạnh và được vận chuyển về phòng thí nghiệm cho các phân tích tiếp theo.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và định dạng các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh

Đối với các mẫu nước, 30 mL nước được lọc qua màng lọc vô trùng kích thước 0.22 µL với sự hỗ trợ của bơm hút chân không. Sau đó, màng lọc được đặt trực tiếp lên bề mặt các đĩa môi trường chọn lọc Coliform CHROMAgar Orientation Medium (Merck, Đức) và *Aeromonas* (Merck, Đức). Đối với mẫu trầm tích, 10 g mẫu được trộn với 9 mL nước khử trùng, lắc đều trong 10 phút, sau đó thực hiện chuỗi pha loãng (10^0-10^4). Tại mỗi độ pha loãng, 100 µL dịch huyền phù sẽ được dàn trải trên bề mặt đĩa môi trường chọn lọc Coliform và *Aeromonas*. Các đĩa nuôi vi khuẩn được ủ ở điều kiện nhiệt độ 35°C trong vòng 18 – 24h. Sau đó, các chủng vi khuẩn được phân lập, cấy ria trên môi trường chọn lọc tương ứng. Khuẩn lạc thuần được định danh bằng hệ thống MALDI-TOF MS (Bruker, Đức) sử dụng bộ kit IVD Matrix HCCA-portioned (Bruker, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kháng sinh đồ

Vi khuẩn đã định danh được xác định kháng sinh đồ bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa môi trường Mueller Hinton Agar (MHA, Sigma, Đức) theo hướng dẫn M100 của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng thí nghiệm (CLSI), Mỹ (CLSI 2020). Cụ thể, các loài vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* được xác định kháng sinh đồ với 18 loại kháng sinh và các loại vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* được xác định kháng sinh đồ với 12 loại kháng sinh (Bảng 1). Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm làm đối chứng dương.

Bảng 1. Danh sách kháng sinh đồ của các loài vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* (A) và các loài vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* (B)

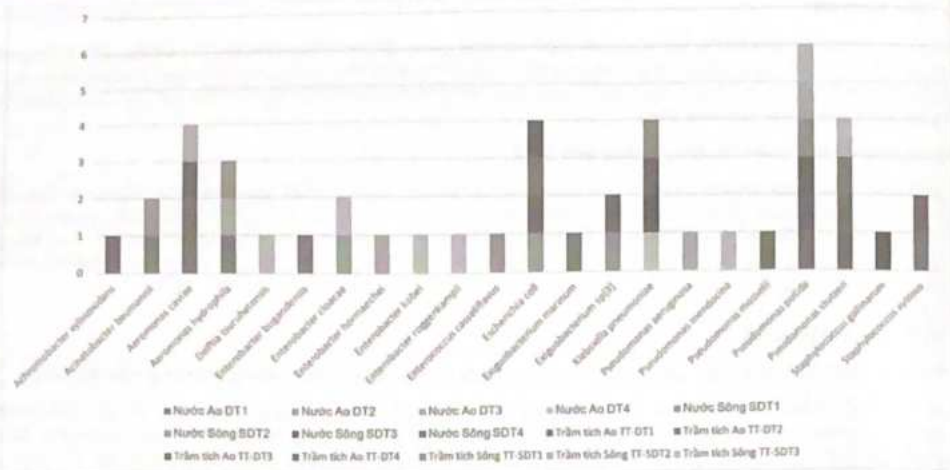
A				B					
Nhóm kháng sinh sử dụng cho loài vi khuẩn chi <i>Aeromonas</i>	Kháng sinh	Nồng độ	Ngưỡng đường kính vùng ức chế (mm)	Nhóm kháng sinh sử dụng cho loài vi khuẩn chi <i>Pseudomonas</i>	Kháng sinh	Nồng độ	Ngưỡng đường kính vùng ức chế (mm)		
Aminoglycoside	Amikacin	30 µg	S ≥ 17 R ≤ 14	Carbapenems	Meropenem	10 µg	S ≥ 18, R ≤ 14		
	Tobramycin	10 µg	S ≥ 15 R ≤ 12		Imipenem	10 µg	S ≥ 23, R ≤ 19		
	Gentamicin	10 µg	S ≥ 15 R ≤ 12	Penicillin	Piperacillin	30 µg	S ≥ 14, R ≤ 14		
Beta-lactam	Amoxicillin-clavulanate	20 µg + 10 µg	S ≥ 18 R ≤ 13		Ticarcillin	75 µg	S ≥ 23, R ≤ 20		
	Ticarcillin-clavulanate	75 µg + 10 µg	S ≥ 20 R ≤ 14		Ticarcillin-clavulanate	75 µg + 10 µg	S ≥ 20, R ≤ 14		
	Piperacillin-tazobactam	36 µg	S ≥ 21 R ≤ 17		Piperacillin-tazobactam	36 µg	S ≥ 20, R ≤ 20		
Penicillin	Ticarcillin	75 µg	S ≥ 23, R ≤ 20	Quinolone	Nalidixic acid	30 µg	S ≥ 19, R ≤ 13		
	Piperacillin	30 µg	S ≥ 21 R ≤ 17		Ciprofloxacin	5 µg	S ≥ 26, R ≤ 21		
Cephalosporin	Cefoxitin	30 µg	S ≥ 18 R ≤ 14		Levofloxacin	5 µg	S ≥ 21, R ≤ 16		
	Cefepime	30 µg	S ≥ 25 R ≤ 18	Cephalosporin	Cefepime	30 µg	S ≥ 25, R ≤ 18		
Carbapenems	Ertapenem	10 µg	S ≥ 22 R ≤ 16		Monobactam	Aztreonam	30 µg	S ≥ 21, R ≤ 17	
	Imipenem	10 µg	S ≥ 23 R ≤ 19	Quinolone	Aminoglycoside	Gentamicin	10 µg	S ≥ 15, R ≤ 12	
Quinolone	Nalidixic acid	30 µg	S ≥ 19 R ≤ 13			Folate Pathway Antagonist	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25 µg + 23.75 µg	S ≥ 16 R ≤ 10
	Ciprofloxacin	5 µg	S ≥ 26 R ≤ 21					Phosphonic acid	Fosfomycin
	Levofloxacin	5 µg	S ≥ 21 R ≤ 16	Monobactam	Aztreonam				
Monobactam	Aztreonam	30 µg	S ≥ 21 R ≤ 17			Phosphonic acid	Fosfomycin	200 µg	S ≥ 16 R ≤ 12
Folate Pathway Antagonist	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25 µg + 23.75 µg	S ≥ 16 R ≤ 10	Phosphonic acid	Fosfomycin			200 µg	S ≥ 16 R ≤ 12

S: Nhạy cảm với kháng sinh; R: Kháng với kháng sinh.

Sự đa dạng của kháng sinh được sử dụng cho phép nghiên cứu này có cái nhìn toàn diện về khả năng kháng thuốc của vi khuẩn đối với nhiều loại kháng sinh khác nhau, giúp xác định mức độ kháng kháng sinh một cách chi tiết hơn. Các kháng sinh được chọn đều có phổ kháng khuẩn rộng, bao gồm cả kháng sinh có tác dụng đối với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Ngoài ra, các kháng sinh này thường được sử dụng trong thực hành lâm sàng để điều trị các nhiễm trùng do vi khuẩn gây ra.

Trong ngành nuôi trồng thủy sản, việc sử dụng kháng sinh để phòng và trị bệnh cho cá là khá phổ biến. Những kháng sinh được chọn trong nghiên cứu này đều có khả năng đã được sử dụng trong thực tiễn nuôi trồng thủy sản, nên việc nghiên cứu sự kháng thuốc của vi khuẩn trong môi trường này sẽ cung cấp dữ liệu quan trọng để quản lý và kiểm soát sử dụng kháng sinh, giúp cung cấp dữ liệu toàn diện và hữu ích cho cả khoa học và ứng dụng thực tế.

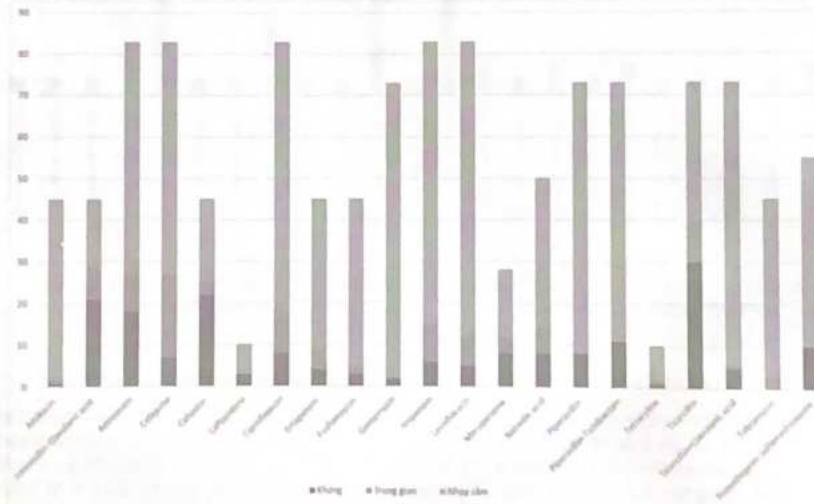
CÔNG NGHỆ SINH HỌC NÔNG NGHIỆP



Hình 2. Phân bố của các vi khuẩn được lấy từ mẫu nước và mẫu trầm tích tại tỉnh Đồng Tháp

Nghiên cứu này cho thấy có sự hiện diện của một số loài vi khuẩn gây bệnh ở người và động vật đang lưu hành trong nước sông Mekong và trong ao nuôi cá tra như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas jandaei* và *Aeromonas veronii*. Các loài này có thể gây ra các bệnh nhiễm trùng đường tiêu hoá, nhiễm trùng da và mô mềm (Pineda-Reyes *et al.*, 2024). Đáng lưu ý, sự xuất hiện của một số loài vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ở nhiều khu vực nghiên cứu tại Cần Thơ và Đồng Tháp cho thấy mức độ ô nhiễm coliform, vi khuẩn đường ruột ở mức cảnh báo.

Hiện trạng vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh



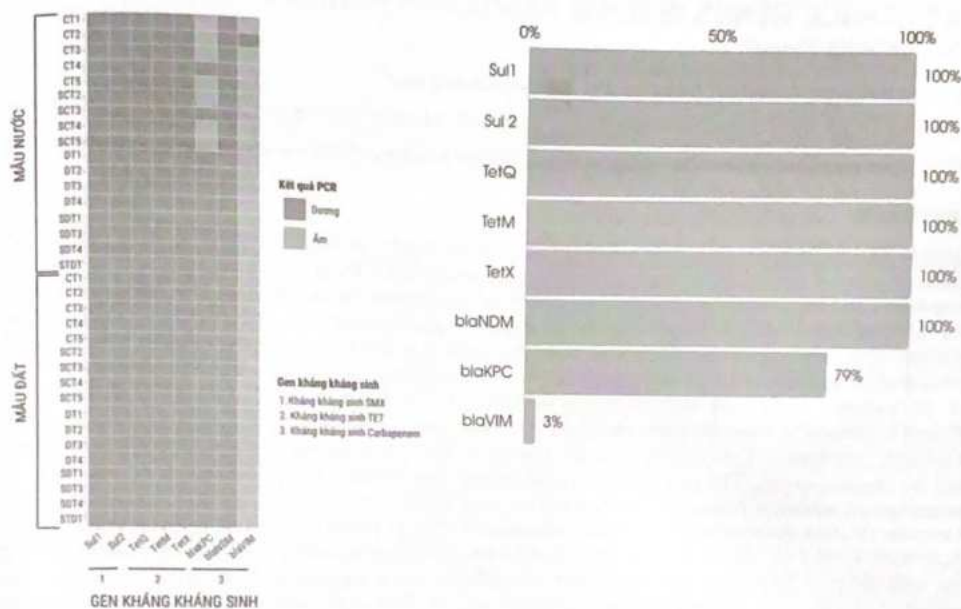
Hình 3. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh trong nước và trầm tích tại hai tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp

Nhìn chung, các chủng vi khuẩn kháng với ít nhất 1 loại kháng sinh với tỷ lệ KKS được xác định từ 4.4% đến 64.3%, tùy thuộc loại kháng sinh thử nghiệm (Hình 3). Cụ thể, kháng Amoxicillin-Clavulanic acid (64.3%) chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp theo là Cefepime (32.4%), Cefoxitin (55.4%), Azetronam (31.7%) và Ceftazidime (30%). Điều này cho thấy vi khuẩn trong ao nuôi cá và khu vực sông Mekong đã kháng với nhiều loại thuốc thường được sử dụng trong điều trị nhiễm khuẩn ở người và động vật (Paterson *et al.*, 2004). Như vậy, việc sử dụng Cefoxitin, Amoxicillin-Clavulanic acid, và Ticarcillin trong nuôi trồng thủy hải sản có thể là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến thúc đẩy và chọn lọc các vi khuẩn kháng thuốc trong môi trường ao nuôi cá và trong sông Mekong. Mặc dù vậy, vi khuẩn có tỷ lệ nhạy cảm rất cao đối với Gentamycin (97.26%), Amikacin (95.6%), và Tobramycin (93.33%), tiếp theo là Fosfomycin (88.89%), Levofloxacin (85.54%), Impipem (81.92%), Ertapenem (80%) và Ciprofloxacin

(78.31%). Đây là các thuốc thuộc nhóm kháng sinh mạnh, thế hệ sau, nên tỷ lệ kháng thuốc còn thấp ở nhiều loài vi khuẩn gây bệnh. Những kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu ở các khu nuôi thủy hải sản và ở các dòng sông trên thế giới, nơi mà tình trạng KKS đang gia tăng và diễn biến hết sức phức tạp, tiềm ẩn nguy cơ ảnh hưởng sức khỏe người, động vật và hệ sinh thái thủy sinh.

Tỷ lệ và phân bố của gen KKS

Trong nghiên cứu này, các gen KKS gồm *Sul1*, *Sul2*, *TetM*, *TetQ*, *TetX* và *blaNDM* đã được phát hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu (100%) (Hình 4). Trong khi đó, gen *blaKPC* được phát hiện trong 27/34 (79%) mẫu nghiên cứu, thấy duy nhất ở một mẫu nước thu thập tại Đồng Tháp. Tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện gen *blaVIM* rất thấp (3%), được tìm của các gen KKS phổ biến như *Sul1*, *Sul2*, *TetA*... Trong khi đó khá ít nghiên cứu xác định được sự có mặt của biến KKS trong lưu vực sông Mekong đang diễn ra hết sức phức tạp. Tỷ lệ xuất hiện gen KKS rất cao và phân bố ở hầu hết các khu vực nghiên cứu cho thấy nguy cơ phát tán và lây truyền nhanh các gen KKS trong hệ sinh thái này.



Hình 4. Tỷ lệ và phân bố gen KKS trong môi trường ao nuôi cá và trong sông Mekong

KẾT LUẬN

Mặc dù tỷ lệ vi khuẩn gây bệnh KKS trong ao nuôi cá tra và trong sông Mekong còn thấp, tuy nhiên đã phát hiện được những chủng vi khuẩn kháng với một số kháng sinh dự phòng, kháng sinh mạnh dùng trong điều trị lâm sàng như Carbapenems (Imipenem, Ertapenem), Levofloxacin. Bên cạnh đó, tỷ lệ rất cao (100%) và sự phân bố rộng của gen KKS nhất là *blaNDM*, *TetM* và *TetQ* sẽ thúc đẩy quá trình trao đổi gen ngang làm bùng phát nhanh chóng các chủng vi khuẩn KKS. Kết quả này nhấn mạnh sự cần thiết của việc giám sát và quản lý chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy hải sản để hạn chế việc chọn lọc và lây nhiễm các chủng vi khuẩn gây bệnh KKS dự phòng tới người dân thông qua tiếp xúc trực tiếp với môi trường sông và chuỗi thức ăn.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Dự án MOHIP – Đại Học Michigan – Mỹ và Chương trình phát triển Nhóm nghiên cứu tiềm năng của USTH giai đoạn 2024 – 2026 dành cho Nhóm nghiên cứu MICH.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Giebel R, Worden C, Rust SM, et al. (2010). Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Advances in Applied Microbiology*, 71: 149-184.
 Karungamye P, Rugaika A, Mtei K, Machunda R. (2023). Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater. *Applied Microbiology*, 3(3): 867-882.
 Neu HC. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257(5073): 1064-1073.

- Paterson DL, Bonomo RA. (2004). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4) 657-686.
- Pineda-Reyes R, Neil BH, Omdorff J, Williams-Bouyer N, Netherland M, Hasan NA, Tahashilder MI, Sha J, Chopra AK, Reynoso D (2024). Clinical presentation, antimicrobial resistance, and treatment outcomes of *Aeromonas* human infections: A 14-year retrospective study and comparative genomics of 2 isolates from fatal cases. *Clinical Infectious Diseases*, 2024, ciae272.
- Rico A, Tran M P, Satapornvanit K, Min J, Shahabuddin A M, Henriksson P J G, Murray F J, Little D C, Dalsgaard A, Brink P J V D (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412-413: 231-243.
- Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo N G, Gibert M, Bonhoeffer S, Laxminarayan R (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*, 365(6459).

STUDY ON ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN SOME PANGASIU PONDS IN CAN THO AND DONG THAP

Vu Dang Hai Long^{1,2}, Nguyen Dang Quang², Nguyen Quang Huy^{2*}

¹ Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

² MICH University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is a serious threat to public health and the environment, directly impacting the implementation of the United Nations' sustainable development goals. Many studies on AMR in the medical area have been conducted, nevertheless research on AMR in the environment has not been well studied in Vietnam. The Mekong River, with its important role in economic development and food security, is facing serious pollution from human activities. The objective of this study is to determine antibiotic-resistant bacteria and the prevalence of antibiotic resistant genes in some *Pangasius* ponds in Can Tho and Dong Thap provinces. A total of 105 bacterial strains were identified using the MALDI-TOF MS method, of which 24 species that cause disease in humans and animals were identified. The most common bacterial species include *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii*. The pathogenic bacterial strains were resistant to at least one tested antibiotic. The proportion of antibiotic resistance was highest for Amoxicillin-Clavulanic acid (64.3%), Cefepime (32.4%), Cefoxitin (55.4%), Azetronam (31.7%) and Cefazidime (30%). In addition, antibiotic-resistant genes including *Sul1*, *Sul2*, *TetM*, *TetQ*, *TetX* and *blaNDM* were detected in all research samples (100%). Our findings highlight the need for strict monitoring and management of antibiotic use in aquaculture to minimize the selection and spread of drug-resistant bacteria in river ecosystems and the food chain which could pose potential risks to human health.

Keywords: Antibiotic resistance, Antibiotic-resistant bacteria, Antibiotic resistant genes, *Pangasius*, Mekong river.

* Corresponding author: Tel: +84-2432121576; Email: nguyen-quang.huy@usth.edu.vn