

**HIỆN TRẠNG KHÁNG THUỐC KHÁNG SINH TRÊN HAI LOÀI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* VÀ *Aeromonas hydrophila* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

Quách Văn Cao Thi<sup>1</sup>, Từ Thanh Dung<sup>2</sup> và Đặng Phạm Hòa Hiệp<sup>3</sup>

<sup>1</sup> NCS ngành Vi sinh vật học, Trường Cao đẳng Cộng đồng Vĩnh Long

<sup>2</sup> Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup> Sinh viên ngành Bệnh học Thủy sản K36, Trường Đại học Cần Thơ

**Thông tin chung:**

Ngày nhận: 10/6/2014  
Ngày chấp nhận: 04/8/2014

**Title:**

The current status antimicrobial resistance in *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila* cause disease on the striped catfish farmed in the Mekong Delta

**Từ khóa:**

*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, kháng thuốc kháng sinh, *Pangasianodon hypophthalmus*

**Keywords:**

*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, antibiotic resistance, *Pangasianodon hypophthalmus*

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to assess the antibiotic resistance in 60 *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila* isolates. All bacteria were isolated from diseased striped catfish in the Mekong Delta during January 1013 to March 2014. The isolates were screened against 15 antibiotics by disk diffusion method. The results showed that *E. ictaluri* isolates were still sensitive to ampicillin and amoxicillin; highly resistant to tetracyclin, enrofloxacin, streptomycin, fenicol group antibiotics; and completely resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole. On the contrary, *A. hydrophila* isolates were sensitive to doxycycline, cefotaxime and ciprofloxacin; highly resistant to tetracycline, florfenicol and all *A. hydrophila* isolates were completely resistant to trimethoprim/ sulfamethoxazole, cefalexin, penicillin group antibiotics. In particular, all 60 isolates in this study displayed multi-drug resistance. Besides, tetracyclin and florfenicol antibiotics were also used to determine minimal inhibitory concentration (MIC) by using dilution method.

**TÓM TẮT**

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiện trạng kháng thuốc của 60 dòng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*. Tất cả các dòng vi khuẩn trong nghiên cứu này được phân lập từ cá tra bệnh từ ao nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long từ tháng 1/2013 đến 3/2014. Nghiên cứu thực hiện kháng sinh đồ với 15 loại kháng sinh bằng phương pháp đĩa khuếch tán. Kết quả kháng sinh đồ cho thấy đa số các dòng vi khuẩn *E. ictaluri* nhạy cao với kháng sinh ampicillin và amoxicillin; kháng cao với các kháng sinh tetracyclin, enrofloxacin, streptomycin và kháng sinh nhóm fenicol; kháng hoàn toàn với trimethoprim/sulfamethoxazol. Trái lại, vi khuẩn *A. hydrophila* nhạy cao với các kháng sinh doxycyclin, cefotaxim và ciprofloxacin; kháng cao với các kháng sinh tetracyclin, florfenicol và kháng hoàn toàn với kháng sinh nhóm penicillin, cefalexin và trimethoprim/sulfamethoxazol. Đặc biệt, toàn bộ 60 dòng vi khuẩn nghiên cứu đều thể hiện sự đa kháng thuốc. Ngoài ra, tetracyclin và florfenicol cũng được xác định nồng độ ức chế tối thiểu bằng phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng.

**1 GIỚI THIỆU**

Ngành công nghiệp nuôi cá tra đã phát triển mạnh trong nhiều năm qua, đưa cá tra trở thành sản

phẩm thủy sản xuất khẩu chủ lực của nước ta. Để đáp ứng nhu cầu của thị trường ngày càng gia tăng, mức độ thâm canh hóa ngày càng cao dẫn đến tình

trạng dịch bệnh xảy ra thường xuyên và đem lại nhiều hậu quả nghiêm trọng. Trong đó, 2 bệnh phổ biến và gây thiệt hại lớn cho nghề nuôi cá tra ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *E. ictaluri* (Crumlish *et al.*, 2002) và bệnh xuất huyết do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra. Hiện nay, thuốc kháng sinh vẫn còn là biện pháp điều trị bệnh vi khuẩn phổ biến, nhiều loại kháng sinh đã được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam. Trước tình hình diễn biến bệnh ngày càng phức tạp, việc sử dụng kháng sinh không đúng qui định, không kiểm soát dẫn đến tình trạng vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh và đa kháng thuốc (Phuong *et al.*, 2005; Dung *et al.*, 2008)

Bên cạnh đó, vi khuẩn còn có khả năng truyền ngang các gen kháng thuốc giữa các dòng cùng loài và khác loài với nhau thông qua tiếp hợp (Aoki và Takahashi, 1987; Prescott *et al.*, 2000 và Dung *et al.*, 2009), nguy cơ truyền gen kháng thuốc sang vi khuẩn gây bệnh ở người rất cao, đây là mối đe dọa rất lớn đối với cộng đồng. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là xác định hiện trạng kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*, cũng như việc định loại kháng sinh thích hợp để điều trị bệnh gan thận mũ và bệnh xuất huyết có hiệu quả hơn, góp phần giảm thiệt hại cho người nuôi.

**2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1 Nguồn vi khuẩn**

Các dòng vi khuẩn kiểm tra kháng sinh đồ được phân lập trên cá tra bị bệnh xuất huyết và gan thận mũ từ các tỉnh nuôi cá tra thâm canh ở ĐBSCL như Đồng Tháp, An Giang, Vĩnh Long và Tiền Giang. Thời gian thu thập vi khuẩn được thực hiện từ tháng 1/2013 đến 3/2014, kết quả phân lập vi khuẩn được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1: Số dòng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập từ cá tra bị gan thận mũ và xuất huyết ở ĐBSCL**

Địa điểm thu mẫu	Số dòng <i>E. ictaluri</i>	Số dòng <i>A. hydrophila</i>
An Giang	7	7
Đồng Tháp	6	7
Vĩnh Long	10	8
Tiền Giang	7	8
<b>Tổng cộng</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

**2.2 Phương pháp định danh vi khuẩn**

Vi khuẩn được phân lập trên môi trường TSA (Merck, Darmstadt, Germany); định danh theo tài

liệu hướng dẫn của Frerichs và Millar (1993). Vi khuẩn được kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản (nhuộm Gram, di động, oxidase, catalase, O-F test) trước khi định danh bằng bộ kit API 20E (bioMerieux, France). Kết quả định danh được kiểm tra lại bằng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) theo Panangala *et al.* (2007) và Sakai *et al.* (2009).

**2.3 Phương pháp thực hiện kháng sinh đồ**

Phương pháp kháng sinh đồ được thực hiện theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012, trên môi trường Mueller-Hinton Agar (MHA, Meck, Darmstadt, Germany) với 15 loại kháng sinh sau: amoxicillin (AML/10µg), ampicillin (AMP/10µg), cefotaxime (CTX/30µg), chloramfenicol (C/30µg), florfenicol (FFC/30µg), ciprofloxacin (CIP/5µg), enrofloxacin (ENR/5µg), norfloxacin (NOR/5µg), doxycyclin (DO/30µg), tetracyclin (TE/30µg), gentamycin (GM/10µg), streptomycin (S/10µg), neomycin (CN/30µg) và trimethoprim/sulfamethoxazol (SXT/1,25/23,75 µg) (Oxoid, UK). Đường kính vòng vô khuẩn (mm) được đo và đánh giá theo tiêu chuẩn của CLSI (2012) để xác định tính kháng nhạy của vi khuẩn đối với các loại kháng sinh.

**Chỉ số đa kháng MAR (multiple antibiotic resistance index):** Chỉ số đa kháng của vi khuẩn ở các tỉnh được xác định dựa trên công thức của Krumperman (1983). Giá trị MAR ≥ 0,2 cho thấy kháng sinh được sử dụng thường xuyên, nếu giá trị MAR ≤ 0,2 cho thấy kháng sinh ít hoặc không bao giờ được sử dụng trong ao nuôi cá tra. Công thức xác định chỉ số đa kháng (MAR) như sau:

$$MAR = X / (Y \times Z)$$

Trong đó: X = tổng số kháng sinh vi khuẩn kháng;

Y = tổng số kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu;

Z = tổng số dòng vi khuẩn ở mỗi tỉnh.

**2.4 Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC - Minimum Inhibitory Concentration)**

Giá trị MIC được xác định bằng phương pháp pha loãng thuốc kháng sinh trong môi trường lỏng (Phương pháp Broth, theo tiêu chuẩn của CLSI, 2012) với 2 loại kháng sinh là florfenicol và tetracyclin (Sigma Aldrich NV, Bornem, Belgium). Bốn dòng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* có tính kháng thuốc đáp ứng với 2 loại kháng sinh florfenicol và tetracyclin được sử dụng để xác định giá trị MIC.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Kết quả kháng sinh đồ**

Tỷ lệ (%) các dòng vi khuẩn *E. ictaluri* và

*A. hydrophila* nhạy, nhạy trung bình và kháng đối với 15 loại thuốc kháng sinh được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2: Tỷ lệ phần trăm (%) kháng, nhạy và nhạy trung bình của các dòng *E. ictaluri* (*E.i*) và *A. hydrophila* (*A.h*) trên 15 loại kháng sinh**

Thuốc kháng sinh	Kháng (%)		Nhạy (%)		Nhạy trung bình (%)	
	<i>E.i</i>	<i>A.h</i>	<i>E.i</i>	<i>A.h</i>	<i>E.i</i>	<i>A.h</i>
Ampicillin	26,7	100	70	0	3,33	0
Amoxicillin	30	100	66,7	0	3,33	0
Cefalexin	46,7	100	46,7	0	6,67	0
Cefotaxim	43,3	6,67	40	80	16,7	13,3
Ciprofloxacin	30,3	10	36,7	80	30	10
Enrofloxacin	80	20	13,3	46,7	6,67	33,3
Norfloxacin	46,7	20	23,3	66,7	30	13,3
Doxycyclin	26,7	6,67	50	83,3	23,3	10
Tetracyclin	26,7	93,3	6,67	6,67	10	0
Florfenicol	93,3	63,3	6,67	36,7	0	0
Chloramfenicol	90	40	6,67	36,7	3,33	23,3
Neomycin	43,3	30	33,3	26,7	23,3	43,3
Gentamycin	46,7	10	40	46,7	13,3	43,3
Streptomycin	80	16,7	13,3	26,7	6,67	56,7
Trimethoprim/sunfamethoxazol	100	100	0	0	0	0

Kết quả kháng sinh đồ cho thấy đa số các dòng vi khuẩn *E. ictaluri* vẫn còn nhạy cao với 2 kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$ -lactam: ampicillin (70%) và amoxicillin (66,7%); kháng rất cao với 2 kháng sinh thuộc nhóm fennicol: florfenicol và chloramfenicol (>90%); đồng thời kháng khá cao với các kháng sinh tetracycline, enrofloxacin và streptomycin (>80%); kháng hoàn toàn với trimethoprim/sunfamethoxazol.

Vi khuẩn *A. hydrophila* nhạy cao với kháng sinh doxycyclin, cefotaxim và ciprofloxacin (>80%) và norfloxacin (66,7%). Tuy nhiên, vi

khẩn này kháng cao với các kháng sinh tetracyclin (93,3%), florfenicol (63,3%) và kháng hoàn toàn với kháng sinh trimethoprim/sunfamethoxazol, cefalexin và các kháng sinh thuộc nhóm penicillin.

**3.2 Giá trị MIC**

Kết quả MIC của 2 dòng vi khuẩn *E. ictaluri* đối với kháng sinh tetracyclin là 16  $\mu$ g/ml, ngược lại giá trị MIC của 2 dòng vi khuẩn *A. hydrophila* được kiểm tra thì có sự chênh lệch rất lớn. Đối với florfenicol, giá trị MIC của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều chênh lệch rất lớn (Bảng 3).

**Bảng 3: Kết quả MIC của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên 2 loại kháng sinh florfeciol (FFC) và tetracyclin (TE)**

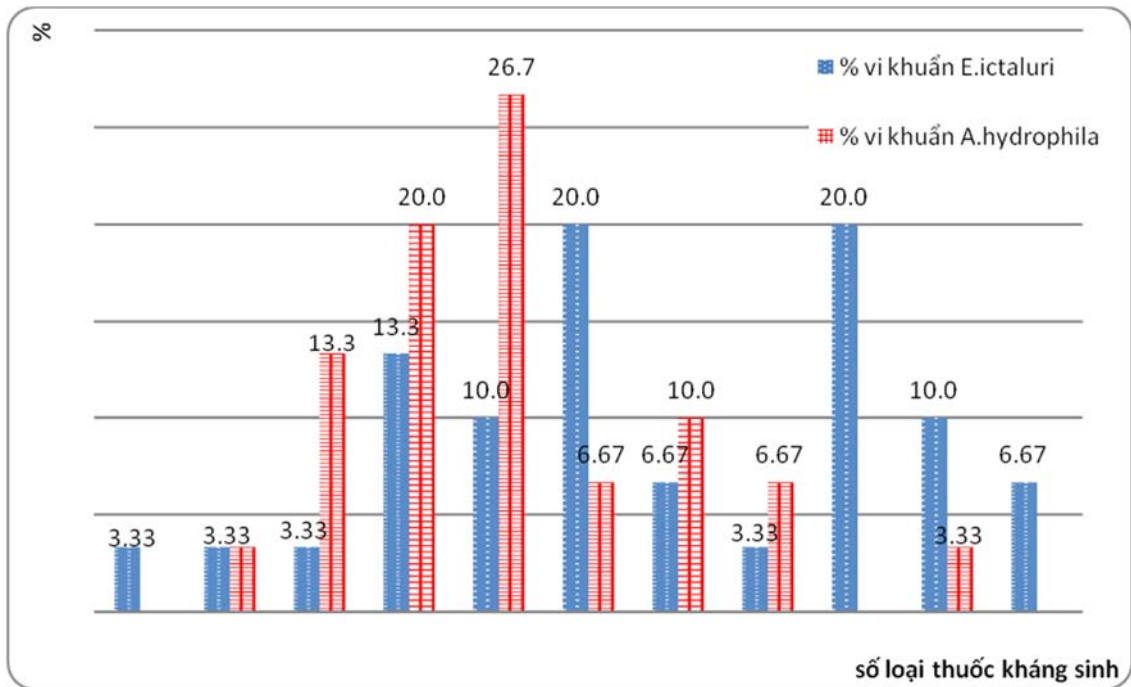
Thuốc kháng sinh	Kết quả MIC ( $\mu$ g/ml)				Điểm tới hạn CLSI, 2012 (M100-S22)	
	<i>E. ictaluri</i>		<i>A. hydrophila</i>		Nhạy	kháng
	20	NT16	TB7	TA3		
Florfenicol	64	1	>128	0.5	$\leq 2$	$\geq 8$
Tetracyclin	16	16	128	2	$\leq 4$	$\geq 16$

**3.3 Hiện tượng đa kháng thuốc của vi khuẩn**

Tỷ lệ (%) các dòng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đa kháng được trình bày ở Hình 1.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy toàn bộ 30 dòng vi khuẩn *E. ictaluri* và 30 dòng *A. hydrophila* đều đa kháng thuốc. Vi khuẩn *E. ictaluri* đa kháng ít nhất 3 loại kháng sinh (3,33%) và nhiều nhất 13 loại kháng sinh (6,67%), trong đó

đa kháng 11 loại kháng sinh và 8 loại kháng sinh chiếm tỷ lệ cao nhất (20%) và kiểu hình đa kháng (SXT+FFC+C+TE+ENR+S...) thì phổ biến nhất (50%). Vi khuẩn *A. hydrophila* đa kháng ít nhất 4 loại kháng sinh và nhiều nhất 12 loại kháng sinh (3,33%), trong đó đa kháng 6 loại kháng sinh và 7 loại kháng sinh có tỷ lệ cao nhất (20% và 26,7%) với kiểu hình đa kháng (AMP + AML + CL + SXT + TE + FFC...) thì phổ biến nhất (63,3%).



Hình 1: Tỷ lệ (%) vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đa kháng

**Chỉ số đa kháng (MAR) của vi khuẩn ở 4 tỉnh:** Chỉ số đa kháng của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở 4 tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Tiền Giang và Vĩnh Long được trình bày trong Bảng 4. Chỉ số MAR của 4 tỉnh đều cao hơn 0,2 cho thấy 15 kháng sinh trong nghiên cứu này đã được sử dụng thường xuyên để điều trị bệnh cho cá tra nuôi ở 4 tỉnh trên.

**Bảng 4: Chỉ số đa kháng MAR của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

Vi khuẩn	An Giang	Đồng Tháp	Tiền Giang	Vĩnh Long
<i>E. ictaluri</i>	0,58	0,68	0,58	0,58
<i>A. hydrophila</i>	0,5	0,5	0,49	0,43

### 3.4 Thảo luận

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy toàn bộ vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* kháng hoàn toàn với kháng sinh trimethoprim/sufamethoxazol. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Dung *et al.*, (2008), Phạm Thanh Hương *et al.* (2010). Theo Sarter *et al.* (2007), có 61% vi khuẩn Gram âm phân lập từ cá da trơn kháng với trimethoprim/sufamethoxazol. Vì vậy, không nên sử dụng kháng sinh này để điều trị bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây ra trên cá tra.

Vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này vẫn còn nhạy cao với kháng sinh cefotaxim (80%) nhưng lại kháng hoàn toàn với 3 kháng sinh còn lại cùng nhóm  $\beta$ -lactam là ampicillin, amoxicillin và cefalexin. Theo Wen-Chen *et al.* (1998) vi khuẩn *A. hydrophila* là nhóm vi khuẩn kháng thuốc tự nhiên với nhóm  $\beta$ -lactam, chúng tiết ra enzyme  $\beta$ -lactamase phá vỡ vòng  $\beta$ -lactam làm thuốc mất tác dụng. Tuy nhiên, cefotaxim là kháng sinh thuộc thế hệ thứ 3 của nhóm cefalosporin được nghiên cứu để chống lại tác động phân hủy enzyme  $\beta$ -lactamase của vi khuẩn (Treves-Brown, 2000). Vì vậy, trong nhóm kháng sinh này chỉ có thể sử dụng cefotaxim để điều trị bệnh xuất huyết trên cá tra. Đồng thời, có thể mở rộng hoạt phổ của kháng sinh nhóm penicillin bằng cách kết hợp ampicillin + sulbalactam hoặc amoxicillin + clavulanic để ức chế enzyme  $\beta$ -lactamase trong việc điều trị bệnh xuất huyết vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra (Bùi Kim Tùng, 2000 và Prescott *et al.*, 2000).

Ngược lại, vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này vẫn còn nhạy với các kháng sinh ampicillin và amoxicillin (70 và 66,7%). Trong khi đó, cefalexin và cefotaxim lại có tỷ lệ nhạy thấp hơn 2 kháng sinh cùng nhóm (46,7 và 40%). Theo Stock và Wiedemann (2001) giống vi khuẩn *Edwardsiella* nhạy tự nhiên với kháng sinh  $\beta$ -lactam do chúng không có khả năng tiết ra enzyme  $\beta$ -lactamase nên vi khuẩn *E. ictaluri* còn

nhạy với kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam. Tuy nhiên, tỷ lệ nhạy với ampicillin, amoxicillin và cefalexin trên vi khuẩn *E. ictaluri* đã giảm so với nghiên cứu của Phạm Thanh Hương và ctv. (2010) là 85,7; 84,1 và 86,5%. Với kết quả nghiên cứu này, có thể sử dụng ampicillin và amoxicillin để trị bệnh gan thận mũ trên cá tra nhưng cần phải khắc phục đặc tính dễ hòa tan trong nước và thủy phân ở nhiệt độ cao của kháng sinh nhóm penicillin để đạt được hiệu quả trong điều trị bệnh (Bùi Kim Tùng, 2001).

Florfenicol là kháng sinh thuộc nhóm fenicol, có phổ kháng khuẩn rộng, được sử dụng để trị bệnh ESC (Enteric Septicemia of Catfish) do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) với đường kính vòng vô khuẩn dao động trong khoảng 31-51 mm, giá trị MIC là 0,25  $\mu\text{g/ml}$  (McGinnis *et al.*, 2003). Tuy nhiên, hầu hết vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này thể hiện tính kháng cao đối với kháng sinh florfenicol. Tương tự, tính kháng của vi khuẩn *A. hydrophila* trên florfenicol cũng gia tăng so với báo cáo của Phạm Thanh Hương và ctv. (2010) 63,3%. Sự gia tăng tính kháng kháng sinh nhóm fenicol là do vi khuẩn đề kháng thông qua nhiều cơ chế khác nhau như đào thải thuốc kháng sinh ra khỏi tế bào thông qua kênh protein (efflux protein) có trên thành tế bào vi khuẩn (CloECKaert *et al.*, 2000); mã hóa gen liên qua đến intergron và thông qua plasmid (Keys *et al.*, 2000) (trích dẫn bởi Miranda và Zemelman, 2002). Vì vậy, không nên sử dụng florfenicol để trị bệnh gan thận mũ và bệnh xuất huyết trên cá tra vì tỷ lệ kháng kháng sinh đã vượt quá 50%.

Chloramfenicol là kháng sinh nằm trong danh mục cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản từ năm 2012 (Thông tư 03/2012/TT BNNPTNT). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ kháng chloramfenicol của vi khuẩn *E. ictaluri* 90%, trong vòng 4 năm tính kháng chloramfenicol đã tăng cao so với báo cáo của Phạm Thanh Hương và ctv (2010). Hiện trạng kháng chloramfenicol cũng được ghi nhận ở vi khuẩn *E. coli*, *Aeromonas* spp và *Pseudomonas* spp phân lập trong môi trường nước và trên cá tra ở ĐBSCL (30, 25 và 89%) (Nguyễn Hoàng Nam Kha, 2012). Mặc dù bị cấm sử dụng nhưng tính kháng của chloramfenicol vẫn gia tăng có thể liên quan đến việc sử dụng thuốc bừa bãi, không rõ nguồn gốc của người dân. Vì vậy, cần kiểm soát chặt chẽ các loại thuốc lưu hành trên thị trường nhằm ngăn chặn việc sử dụng chloramfenicol trái phép, tránh tình trạng tồn lưu kháng sinh trong các sản phẩm thủy sản, gây ảnh hưởng xấu tới sức khỏe người tiêu dùng.

Tương tự chloramphenicol, enrofloxacin cũng nằm trong danh mục cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Tỷ lệ kháng enrofloxacin của vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này là 80%, cao hơn nhiều so với 2 kháng sinh cùng nhóm: ciprofloxacin và norfloxacin. Trong khi đó, hầu hết vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ 2005 đều nhạy cao với enrofloxacin, giá trị MIC cao nhất được ghi nhận 2  $\mu\text{g/ml}$  (Dung *et al.*, 2008), chứng tỏ vi khuẩn *E. ictaluri* đã tăng tính kháng đáp ứng trên enrofloxacin, có lẽ do việc sử dụng thuốc trong nuôi trồng thủy sản còn phổ biến. Theo Cục kiểm định thuốc Châu Âu (EMA, 2006), quinolone là nhóm kháng sinh quan trọng dùng điều trị bệnh nhiễm trùng nguy hiểm cho con người và động vật, nếu lạm dụng những kháng sinh trong nhóm quinolone có thể tạo ra các dòng kháng thuốc vĩnh viễn do đột biến nhiễm sắc thể. Do đó, cần phải kiểm soát chặt chẽ việc lưu hành thuốc enrofloxacin trong nuôi trồng thủy sản và thận trọng hơn khi sử dụng ciprofloxacin và norfloxacin để tránh tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn gây nên nhiều hậu quả nghiêm trọng.

Doxycyclin là kháng sinh thuộc thế hệ mới của nhóm tetracyclines. Kết quả nghiên cứu này, các dòng vi khuẩn *A. hydrophila* nhạy khá cao với kháng sinh doxycyclin (93,3%) tương tự với nghiên cứu của Phạm Thanh Hương và ctv. (2010). Tuy nhiên, hầu hết vi khuẩn *A. hydrophila* kháng cao với tetracyclin là kháng sinh cùng nhóm. Tương tự, vi khuẩn *E. ictaluri* cũng thể hiện tính kháng cao với tetracyclin (83,3%). Theo Dung *et al.* (2008), tỷ lệ kháng oxytetracyclin của vi khuẩn *E. ictaluri* là 81,3%. Sự kháng kháng sinh nhóm Tetracyclines chủ yếu qua 2 cơ chế: qua các protein bảo vệ ribosome (RPPs-ribosomal protection proteins) và hệ thống bơm thải tetracyclin phụ thuộc năng lượng (energy-dependent efflux pumps) (Theo Roberts (1996). Theo Bùi Kim Tùng (2001), tetracyclin là nhóm kháng sinh thường dùng để trị các bệnh hô hấp ở người, brucella, mycolasma. Với kết quả trên, không nên sử dụng tetracyclin để trị bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây ra, có thể sử dụng doxycyclin để trị bệnh xuất huyết trên cá tra nhưng chỉ nên sử dụng khi thật cần thiết để hạn chế sự kháng thuốc.

Streptomycin, gentamycin và neomycin là 3 kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside với cơ chế tác dụng vào quá trình tổng hợp protein ở ribosome. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* có tỷ lệ kháng streptomycin cao

hơn vi khuẩn *A. hydrophila*. Kết quả nghiên cứu của Phạm Thanh Hương và ctv. (2010) cũng cho thấy tỷ lệ kháng streptomycin cao của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (84,1 và 55,7%). Theo Bùi Kim Tùng (2000), streptomycin, gentamycin và neomycin không hấp thụ qua đường ruột nên chỉ có thể sử dụng qua đường tiêm trong y học và thú y, vì vậy chúng rất ít được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Theo Tolmasky (2000), vi khuẩn lớn với một kháng sinh trong nhóm aminoglycoside này có thể nhạy cảm với một kháng sinh khác cùng nhóm, vi khuẩn kháng nhanh với streptomycin có thể là do các plasmid trung gian. Vì vậy, có thể giải thích tại sao tỷ lệ kháng giữa các kháng sinh trong nhóm là khác nhau và mặc dù ít sử dụng trong nuôi trồng thủy sản nhưng tỷ lệ kháng streptomycin của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* lại được báo cáo khá cao.

Trong nghiên cứu này, giá trị MIC của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên 2 loại thuốc kháng sinh florfenicol và tetracyclin thể hiện sự kháng thuốc đáp ứng. Kết quả này có thể liên quan đến việc sử dụng 2 loại thuốc kháng sinh này để điều trị bệnh gan thận mù và xuất huyết trên cá tra trong thời gian dài làm tăng tỷ lệ kháng thuốc đáp ứng của vi khuẩn. Điển hình, từ năm 2005 một số tác giả đã tìm thấy, hầu hết vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra có giá trị MIC trên florfenicol rất thấp ( $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ ) (Dung et al., 2008). Tuy nhiên, giá trị MIC của 64 dòng vi khuẩn *E. ictaluri* trên oxytetracyclin là kháng sinh cùng nhóm tetracyclin, ghi nhận chỉ 2 dòng có giá trị MIC  $<0,12\mu\text{g/ml}$  và 49 dòng là  $\geq 16\mu\text{g/ml}$  (Dung et al., 2008). Gần đây, nghiên cứu của Nutcharnart et al. (2012) trên 55 dòng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá rô phi nhiễm xuất huyết ở Thái Lan ghi nhận giá trị MIC của florfenicol trong khoảng 0,25-1  $\mu\text{g/ml}$ . Điều đó chứng tỏ vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra ở ĐBSCL hiện nay đã kháng cao với florfenicol ( $>128\mu\text{g/ml}$ ).

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy hầu hết các dòng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều thể hiện sự đa kháng thuốc. Sự đa kháng của vi khuẩn gây bệnh trên cá tra ở ĐBSCL đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu trong vài năm qua. Theo Dung et al. (2008) trên 70% vi khuẩn *E. ictaluri* đa kháng; nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Nam Kha (2012) cũng ghi nhận 92,4% vi khuẩn *Aeromonas* spp phân lập từ cá tra ở ĐBSCL đa kháng thuốc. Sự kháng thuốc của vi khuẩn có hai loại là đề kháng tự nhiên và đề kháng đáp ứng (Bùi Kim Tùng, 2000; Prescott et al., 2000). Nhiều

nghiên cứu cho thấy, plasmid được xem là nhân tố quan trọng gây nên hiện tượng đa kháng thuốc ở vi khuẩn do chúng mang các gen mã hóa cho việc kháng lại nhiều nhóm kháng sinh như  $\beta$ -lactam, macrolide, trimethoprim/ sulfamethoxazole, aminoglycosides, tetracyclin và fenicol (Nikaido, 2009; Prescott et al., 2000). Gần đây, nghiên cứu của Nutcharnart et al. (2012) cũng đã tìm thấy R-plasmid đa kháng ampicillin, chloramfenicol, trimethoprim/sulfamethoxazol và tetracyclin của vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập trên cá rô phi ở Thái Lan. Hiện tượng kháng thuốc qua plasmid ở vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ được phát hiện lần đầu tiên vào đầu những năm 1990 (Starliper et al., 1993). Plasmid này có kích thước khoảng 55 kb và mang gen kháng kháng sinh tetracyclin, oxytetracyclin, trimethoprim và trimethoprim/sulfamethoxazol. Đặc biệt, lần đầu tiên nghiên cứu của Dung et al. (2009) đã phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra ở ĐBSCL có plasmid IncK (kích thước khoảng 140 kb) chứa gen kháng tetracyclin, streptomycin, trimethoprim và sulfonamide. Tình trạng kháng thuốc sẽ trở nên nghiêm trọng khi giữa các vi khuẩn cùng loài và khác loài trong môi trường có khả năng trao đổi plasmid thông qua tiếp hợp. Nhiều nghiên cứu đã xác định có sự trao đổi plasmid kháng thuốc kháng sinh trên một số loài vi khuẩn gây bệnh trên cá ở môi trường nước biển và nước ngọt như *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* và *Edwardsiella tarda* (Aoki và Takahashi, 1987; Depaola et al., 1988).

Sự kháng thuốc và khả năng kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đang diễn biến rất phức tạp và ảnh hưởng đến hiệu quả việc điều trị bệnh vi khuẩn trên cá tra nói riêng và trong nuôi trồng thủy sản nói chung. Hơn nữa, sự kháng thuốc trên vi khuẩn trong thủy sản còn là một mối đe dọa lớn đối với cộng đồng vì chúng có thể truyền gen kháng thuốc sang vi khuẩn gây bệnh ở người thông qua tiếp hợp (Dung et al., 2009; Phạm Thanh Hương và ctv., 2010).

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này chỉ còn nhạy với các kháng sinh nhóm penicillin (ampicillin và amoxicillin); kháng cao với các kháng sinh tetracyclin, enrofloxacin, streptomycin và kháng sinh nhóm fenicol; kháng hoàn toàn với trimethoprim/sulfamethoxazol. Vi khuẩn *A. hydrophila* nhạy cao với các kháng sinh doxycyclin, cefotaxim và ciprofloxacin; kháng cao

với các kháng sinh tetracyclin, florfenicol và kháng hoàn toàn với kháng sinh nhóm penicillin, cefalexin và trimethoprim/sulfamethoxazol. Đặc biệt, toàn bộ 60 dòng vi khuẩn nghiên cứu đều thể hiện sự đa kháng thuốc.

Với kết quả của nghiên cứu này có thể sử dụng ampicillin và amoxicillin để điều bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *E. ictaluri* và sử dụng cefotaxime, ciprofloxacin và doxycyclin để trị bệnh xuất huyết do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra trên cá tra. Đồng thời, cần có những nghiên cứu sâu hơn về sự hình thành, cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn và cần nghiên cứu ứng dụng các giải pháp phòng và trị bệnh vi khuẩn khác như vắc xin, chất kháng khuẩn chiết xuất từ thực vật để hạn chế sử dụng kháng sinh, đem lại lợi ích lâu dài cho cộng đồng.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aoki, T and A. Takahashi, 1987. Class D tetracyclin resistance determinants of R-plasmids from fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pasteurella piscicida*. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 31:1278-1280.
2. Bùi Kim Tùng, Bùi Kim Hoàng và Bùi Kim Tân, 2001. Thuốc kháng sinh. Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu. 255 trang.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition, M07-A9, Vol. 32 No. 2, Replaces M07-A8, Vol. 29 No. 2. . Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087, 2012.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second information supplement, M100-S22, Vol. 32 No. 3, Replaces M100-S21, Vol. 31 No. 1. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087, 2012.
5. CrumLish, M. Thanh, P.C., Koesling, J., Tung, V., T. and Gravingen, K., 2006. Antibiotic sensitivity profiles for bacteria from natural outbreaks *Edwardsiellosis* and motile *Aeromonas* septicemia in Vietnamese *Pangasianodon hypophthalmus*. www.pharmaq.no/Posters/DAAVI\_2008-poster.
6. Crumlish, M., T.T. Dung, J.F. Turnbull, N.T.N Ngoc and H.W. Ferguson, 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Fish Diseases. 25:733-736.
7. Dung T.T., F. Haesebrouck, Nguyễn Anh Tuấn, P. Sorgeloos, M. Baele và A. Decostere, 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. Microbial Drug Resistance. 14:311-316.
8. Dung, T. T., F. Haesebrouck, P. Sorgeloos, Nguyen Anh Tuan and F. Pasmans, 2009. IncK plasmid-mediated tetracycline resistance in *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish in Vietnam. Aquaculture. 295:157-159.
9. European Medicines Agency (EMA), 2006. Refection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health.
10. Frerichs, G. N., and S. D. Millar, 1993. Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland. 60 pp.
11. Keyes, K., C. Hudson and J.J. Maurer, 2000. Detection of florphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44:421-424.
12. 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. 46:165-170.
13. McGinnis, A., Gaunt, P., Santucci, T., Simmons, R. and Endris R., 2003. In vitro evaluation of the susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to florphenicol. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 15:576-9.

14. Miranda, C.D and R. Zemelman, 2002. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *The Science of the Total Environment*. 293:207-208.
15. Nguyen Hoang Nam Kha, 2012. Molecular characterization of antibiotic resistant bacteria isolated from farmed catfish and humans in Vietnam, PhD thesis. RMIT University, Melbourne, Victoria, Australia.
16. Nguyen Thanh Phuong, Dang Thi Hoang Oanh, Tu Thanh Dung, and Le Xuan Sinh. 2005. Bacterial Resistance to Antimicrobials Use in Shrimp and Fish Farms in the Mekong delta, Vietnam. *Journal: Proceeding of the international workshop on: Antibiotic Resistance in Asian Aquaculture Environments*.
17. Nikaïdo, H, 2009. Multidrug resistance bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 78:119-146.
18. Nutcharnart, T., C.S Castillo, J. Hikima, T.S. Jung, H. Kondo, I. Hirono and T. Aoki, 2012. Multiple Drug-resistance strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from Tilapia farm in Thailand. *Fish Pathology*. 47:56-63.
19. Panangala, V.S., C.A. Shoemaker, V.L. van Santen, K. Dybvig and P.H. Klesius, 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 74:199-208.
20. Phạm Thanh Hương, 2010. Nghiên cứu sự kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. Luận văn tốt nghiệp Cao học, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.
21. Prescott, J.F., J.D. Baggot and R.D. Walker, 2000. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Iowa State University Press/Ames. 795 pp.
22. Roberts, M.C, 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. *FEMS Microbial Reviews*, 19:1-24.
23. Sakai, T., K. Yuasa, M. Sano and T. Iida, 2009. Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by Species-Specific Polymerase Chain Reaction Targeted to the Upstream Region of the Fimbrial Gene. *Journal of Aquatic Animal Health*. 21: 124-132.
24. Sarter, S., N.H. Kha, L.T. Hung, J. Lazard and D. Montet, 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food control*. 18: 1391-1396.
25. Starliper, C.E., R.K. Cooper, E.B. Shotts and P.W. Taylor, 1993. Plasmid-mediated tetracycline resistance of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5: 1-8.
26. Stock, I. and B. Wiedemann, 2001. Natural antibiotic susceptibilities of *E. tarda*, *E. ictaluri* and *E. hoshinae*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 45:2245-2255.
27. Tolmasky, M.E., 2000. Bacterial resistance to aminoglycosides and  $\beta$ -lactams: The Tn1331 transposon paradigm. *Frontiers in Biology Science*. 5:20-29
28. Treves-Brown, K.M., 2000. *Applied fish pharmacology*. Kluwer Academic publishers. 309 pp.
29. Wen-Chen K., W. Hsiu-Mei, C. Tsung-Chain, Y. Jing-Jou and W. Jiunn-Jong, 1998. Inducible beta-lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*. *Therapeutic Challenges for Antimicrobial Therapy*. 36:3188-3192.