

HIỆN TRẠNG KHÁNG THUỐC KHÁNG SINH TRÊN VI KHUẨN EDWARDSIELLA ICTALURI GÂY BỆNH GAN, THẬN MŨ TRÊN CÁ TRA (PANGASIANODON HYPOPHthalmus) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Từ Thanh Dung¹, Freddy Haesebrouck², Nguyễn Anh Tuấn¹, Partrick Sorgeloos³, Margo Baele² và Annemie Decostere²

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the in vitro susceptibility of 64 Vietnamese isolates of *Edwardsiella ictaluri*, the causal agent of the infectious disease *Bacillus Necrosis Pangasius* (BNP) in *Pangasianodon hypophthalmus*, using the agar dilution technique. None of the isolates displayed acquired resistance to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, chloramphenicol, florfenicol, gentamicin, kanamycin, neomycin and nitrofurantoin. Acquired resistance to streptomycin was detected in 83%, to oxytetracycline in 81% and to trimethoprim in 71% of the isolates. The MICs of enrofloxacin displayed indicating reduced susceptibility of a minority of isolates (3 out of the 64). For the quinolone antimicrobial agents flumequin and oxolinic acid, acquired resistance was encountered in 8 and 6% of the strains, respectively. All strains were intrinsically resistant to the polypeptide antimicrobial agent colistin. Resistance phenotypes of the *E. ictaluri* isolates were shown highly (73%) acquired resistance to at least three antimicrobial agents. The results of this study emphasize the strict need to control both the prophylactic and curative use of antimicrobial agents in Vietnamese aquaculture.

Keywords: Antimicrobial susceptibility testing, *Edwardsiella ictaluri*, *Pangasianodon hypophthalmus*, the Mekong Delta

Title: Antimicrobial resistance of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus*

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá sự kháng thuốc kháng sinh trên 64 chủng vi khuẩn *E. ictaluri*, là tác nhân gây bệnh gan, thận mù (BNP) trên cá tra *Pangasianodon hypophthalmus*. Nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp pha loãng thuốc trên môi trường thạch. Kết quả không tìm thấy sự kháng thuốc của vi khuẩn với thuốc kháng sinh amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, chloramphenicol, florfenicol, gentamicin, kanamycin, neomycin và nitrofurantoin. Tuy nhiên, đa số vi khuẩn *E. ictaluri* đã kháng với streptomycin (83% chủng vi khuẩn), oxytetracycline (81%), trimethoprim (71%) và kháng với nhóm quinolone như: flumequin (8%), oxolinic acid (6%) và enrofloxacin (5%). Trong khi đó, hầu hết vi khuẩn đã kháng thuốc tự nhiên đối với kháng sinh colistin (polypeptide). Đặc biệt, kết quả đã xác định trên 73 % chủng vi khuẩn *E. ictaluri* biểu hiện sự đa kháng thuốc (kháng ít nhất 3 loại thuốc). Kết quả nghiên cứu đã cảnh báo sự cần thiết kiểm soát nghiêm ngặt việc dùng thuốc kháng sinh để phòng trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam.

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Thú y, Trường Đại học Ghent, Vương Quốc Bỉ

³ Phòng thí nghiệm trung tâm nghiên cứu Thủy Sản và Artemria, Trường Đại học Ghent, Vương Quốc Bỉ

Từ khóa: Kháng thuốc kháng sinh, *Edwardsiella ictaluri*, *Pangasianodon hypophthalmus*, Đồng bằng sông Cửu Long

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), vùng sản xuất thủy sản chính của Việt Nam, cung cấp hơn 80% tổng sản phẩm thủy sản của cả nước. Hiện nay, cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng cá nuôi nước ngọt chủ lực, cung cấp thực phẩm trong nước và là mặt hàng xuất khẩu thủy sản quan trọng của Việt Nam. Diễn hình năm 2007, tổng sản lượng cá tra và cá ba sa đã đạt mức 1,2 triệu tấn, vượt mức kế hoạch của năm 2010 (FAO Globefish, 2007). Tuy nhiên, do nhu cầu cao của thị trường, nghề nuôi cá tra phát triển ngày càng mạnh, mức độ thâm canh hóa ngày càng cao dẫn đến nhiều loại bệnh truyền nhiễm thường xuyên xảy ra và gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho nghề nuôi cá tra công nghiệp ở ĐBSCL. Đặc biệt, bệnh mù gan do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* là tác nhân chính gây bệnh trên cá tra *Pangasianodon hypophthalmus* đã làm thiệt hại lớn cho người nuôi, tăng tỉ lệ hao hụt và chi phí do việc điều trị (Ferguson *et al.*, 2001; Dung *et al.*, 2004). Đây là loại vi khuẩn đặc thù gây bệnh chủ yếu trên cá da trơn nuôi công nghiệp. Theo Mitchell (1997) vi khuẩn *E. ictaluri* cũng là tác nhân gây bệnh nhiễm trùng máu ở cá nheo mỹ, gây hao hụt trên 60% và hàng năm thiệt hại trên 50 triệu USD. Ngoài ra, vi khuẩn này cũng làm thiệt hại kinh tế trong nuôi cá da trơn ở Indonesia và Trung Quốc.

Cho đến nay, thuốc kháng sinh vẫn còn sử dụng một cách phổ biến để phòng trị bệnh vi khuẩn trong nuôi thủy sản ở Việt Nam và nhiều nước khác trên thế giới. Do đó, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu và tìm thấy sự kháng thuốc kháng sinh trên nhiều loại vi khuẩn gây bệnh trên cá, tôm và môi trường nuôi thủy sản (Holmström *et al.*, 2003; Dung *et al.*, 1997; Phuong *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2005 và Sarter *et al.*, 2007). Riêng đối với vi khuẩn gây bệnh *E. ictaluri* phân lập được từ cá nheo mỹ, một số tác giả cũng đã kiểm tra sự kháng thuốc của loại vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm này. Hawke (1979) là nhà khoa học đầu tiên, đã làm kháng sinh đồ trên 10 chủng vi khuẩn *E. ictaluri*. Sau đó, Waltman và Shotts (1986) kiểm tra sự kháng thuốc trên 118 *E. ictaluri* phân lập được ở Hoa Kỳ với 37 loại thuốc kháng sinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đa số vi khuẩn Gram âm nhạy với hầu hết các loại thuốc đã thí nghiệm. Tuy nhiên, hơn 90% số chủng vi khuẩn kháng với colistin và sulfamids. Reger *et al.* (1993) cũng xác định các chủng *E. ictaluri* ở Hoa kỳ đều nhạy với enrofloxacin, gentamicin và doxycycline. Nửa thập kỷ sau đó, Stock và Wiedemann (2001) đã xác định nồng độ ức chế tối thiểu của 41 chủng *E. ictaluri* đối với 71 loại kháng sinh. Cho đến thời điểm này, chưa có tác giả nào công bố vi khuẩn *E. ictaluri* có hiện tượng kháng thuốc đáp ứng (acquired resistance) trên thuốc kháng sinh.

Chính vì thế nghiên cứu này thực hiện nhằm mục đích xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra nuôi công nghiệp ở ĐBSCL trên một số loại thuốc kháng sinh để đánh giá sự kháng thuốc của vi khuẩn này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Chứng vi khuẩn

Nghiên cứu sử dụng 64 chủng *E. ictaluri* được phân lập từ cá tra bệnh gan, thận mù ở 3 tỉnh nuôi cá tra công nghiệp ở ĐBSCL là An Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ, trong khoảng thời gian từ năm 2002-2005. Định danh vi khuẩn bao gồm kiểm tra một số chỉ tiêu cơ bản như: Nhuộm Gram, hình dạng, tính di động, oxydase và sử dụng bộ kit API 20E (MicrobankTM, PRO-LAB Diagnostics, K), môi trường đặc trưng EIA (*Edwardsiella ictaluri* agar).

Tính đồng dạng của vi khuẩn *E. ictaluri* được xác định bằng kỹ thuật tDNA-PCR (Baele *et al.*, 2000). Quy trình thực hiện gồm các bước như sau: (i) Tách chiết DNA: Lấy 1 khuẩn lạc cho vào 20 µl dung dịch tách chiết (0,25% SDS, 0,05M NaOH). Sau khi đun ở 95°C trong 5 phút, ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút, trong 20 giây. Sau đó, thêm vào 180 µl nước cất vô trùng và ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút, trong 5 phút. Đoạn gen nằm giữa gen tRNA được khuếch đại bằng đoạn mồi T5B (5'AGTCCGGTGCTCTAACCAACTGAG3') và đoạn mồi được đánh dấu huỳnh quang T3B (5'AGGTCGCGGGTTCGAATCC3'). (ii) Thành phần hóa chất và điều kiện phản ứng PCR được tiến hành theo quy trình của Baele *et al.* (2000). (iii) Quy trình điện di được thực hiện với hệ thống ABI Prism TM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California). Điện di phân tích theo phần mềm Genescan và so sánh với các dữ liệu sẵn có (Baele *et al.*, 2000). Trong quá trình nghiên cứu, sử dụng 2 dòng vi khuẩn chuẩn: *E. ictaluri* (CCUG 18764) và *E. tarda* (LMG2793T).

2.2 Thuốc kháng sinh

Tổng cộng 15 loại thuốc kháng sinh tinh được sử dụng trong thí nghiệm này, bao gồm: amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid, florfenicol, gentamicin, kanamycin, treptomycin, neomycin, enrofloxacin, oxolinic acid, flumequin, oxytetracycline, trimethoprim và colistin. Hầu hết, những thuốc kháng sinh này có nguồn gốc từ Sigma Aldrich N.V, Bornem, Belgium, ngoại trừ enrofloxacin là từ Bayer AG, Brussels, Belgium; treptomycin từ Certa, L'Alleud, Belgium và colistin từ VMD, Arendonk, Belgium. Thuốc kháng sinh được hòa tan trong dung môi với một lượng thích hợp tạo thành dung dịch gốc, sau đó pha loãng với nước cất theo phương pháp chuẩn (Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI M49-A). Dòng vi khuẩn chuẩn *Escherichia coli* (ATCC 25922) được sử dụng trong thí nghiệm này.

2.3 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) xác định bằng phương pháp pha loãng thuốc kháng sinh trong môi trường thạch Mueller-Hinton II (Becton Dickinson, Cokeysville, USA), theo phương pháp của Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006 (CLSI M49-A). Nồng độ kháng sinh khác nhau từ 0,12 µg/ml đến 128 µg/ml, và những đĩa thạch không có thuốc kháng sinh được xem như là lô đối chứng âm.

Các chủng vi khuẩn *Edwardsiella* được cấy trên môi trường thạch máu (Difco, Wesel, Germany) và được ủ ở 26°C, trong 48 giờ. Riêng dòng vi khuẩn *E. coli*

ATCC 25922 cũng được cấy trên môi trường thạch máu nhưng ủ ở 37°C, trong 24 giờ. Cho vài khuẩn lạc vào ống nghiệm chứa nước muối sinh lý (PBS), để tạo dung dịch vi khuẩn có độ đục 0.5 tính theo thang đo chuẩn McFarland. Sau đó, sử dụng phương pháp pha loãng đi 10 lần, để có dung dịch vi khuẩn mật độ 1×10^5 CFU/ml. Dung dịch vi khuẩn được cấy trên các đĩa thạch có kháng sinh cũng như các đĩa không có kháng sinh (đối chứng) bằng cách sử dụng dụng cụ cấy đa đầu (Denley multipoint inoculator) (Mast, Sussex, U.K). Sau đó, đĩa cấy được ủ ở 26°C. Với chủng vi khuẩn *Edwardsiella*, các nồng độ ức chế tối thiểu (MICs) được ghi nhận sau 48 giờ. Đối với dòng vi khuẩn *E. coli* được ghi nhận 2 thời điểm sau 24 và 48 giờ. Nồng độ ức chế tối thiểu được xác định là nồng độ thấp nhất của thuốc kháng sinh, ở đó không có sự phát triển của vi khuẩn.

3 KẾT QUẢ

Kết quả giá trị MIC của vi khuẩn chuẩn *E. coli* không có gì khác biệt khi được ủ trong thời gian 24 hoặc 48 giờ với những loại kháng sinh có trong tài liệu CLSI M49-A. Kết quả giá trị MIC của 64 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được trình bày ở Bảng 1. Các giá trị MIC₅₀, MIC₉₀ và tỷ lệ phần trăm của vi khuẩn kháng thuốc đáp ứng (acquired resistance) cũng được trình bày ở bảng 1.

Kết quả không tìm thấy sự kháng thuốc xảy ra đối với nhóm kháng sinh beta-lactam như amoxicillin, kết hợp amoxicillin và acid clavulanic, cũng như chloramphenicol, florfenicol, nitrofurantoin và nhóm kháng sinh aminoglycoside như gentamicin, kanamycin và neomycin. Theo tiêu chuẩn về vi sinh vật học, các chủng vi khuẩn cao hơn giá trị MIC được coi như có khả năng kháng thuốc theo tài liệu của CLSI M31-A3 (2008) và Turnidge và Paterson, (2007). Đa số vi khuẩn *E. ictaluri* kháng thuốc đáp ứng với streptomycin (83% chủng vi khuẩn), với oxytetracycline (81%) và trimethoprim (71%). Ngoài ra, hiện tượng kháng thuốc kháng sinh trên nhóm flourquinolone lần đầu tiên tìm thấy trên vi khuẩn *E. ictaluri* như flumequin (8% chủng vi khuẩn), acid oxolinic (6%) và enrofloxacin (5%).

Đặc biệt, hầu hết các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* thể hiện sự kháng thuốc tự nhiên đối với colistin (100% chủng vi khuẩn) với giá trị MIC bằng hoặc lớn hơn 128 µg/ml. Điều đáng lưu ý là hiện tượng đa kháng thuốc (kháng ít nhất là 3 loại thuốc) của vi khuẩn *E. ictaluri* là 73 % chủng vi khuẩn.

Bảng 1: Sự phân bố nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các loại kháng sinh khác nhau có nồng độ thuốc từ 0.12 đến 128 µg/ml trên 64 chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra *Pangasianodon hypophthalmus* bệnh gan, thận mũ

| Thuốc kháng sinh | Số chủng vi khuẩn với giá trị MIC (µg/ml): | | | | | | | | | | | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | % kháng * |
|------------------|--|------|-----|----|----|----|----|----|----|----|------|-------------------|-------------------|----------------------|
| | ≤0,12 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | ≥128 | | | |
| Amoxicillin | 3 | 19 | 42 | | | | | | | | | 0,5 | 0,5 | 0 |
| Amox + Clav | 42 | 22 | | | | | | | | | | 0,12 | 0,25 | 0 |
| Chloramphenicol | 13 | 28 | 23 | | | | | | | | | 0,25 | 0,5 | 0 |
| Florfenicol | 31 | 33 | | | | | | | | | | 0,25 | 0,25 | 0 |
| Gentamicin | | | | 15 | 34 | 15 | | | | | | 2 | 4 | 0 |
| Kanamycin | | | | | 18 | 39 | 7 | | | | | 4 | 8 | 0 |
| Streptomycin | | | | | | 2 | 9 | | 1 | 1 | 51 | ≥128 | ≥128 | 82,8 |
| Neomycin | | | | | 2 | 52 | 10 | | | | | 4 | 8 | 0 |
| Enrofloxacin | 9 | 27 | 11 | 14 | 3 | | | | | | | 0,25 | 1 | 4,7 |
| Oxolinic Acid | | | | 1 | 9 | 21 | 27 | 2 | | 4 | | 8 | 8 | 6,3 |
| Flumequin | | 1 | | 3 | 9 | 46 | | | 2 | 3 | | 4 | 4 | 7,8 |
| Oxytetracycline | 2 | | 8 | 1 | 1 | | | 3 | 26 | 23 | | 32 | 64 | 81,3 |
| Trimethoprim | 9 | | | | 8 | | | | | 13 | 34 | ≥128 | ≥128 | 73,4 |
| Nitrofurantoin | | 8 | 8 | 5 | 34 | 9 | | | | | | 2 | 4 | 0 |
| Colistin | | | | | | | | | | 3 | 61 | ≥128 | ≥128 | Kháng thuốc tự nhiên |

* Theo tiêu chuẩn vi sinh học, các chủng *E. ictaluri* được in đậm thể hiện kháng thuốc đáp ứng.

4 THẢO LUẬN

Ở Việt Nam, thuốc kháng sinh chloramphenicol hiện đang bị nghiêm cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản vì có độc tính rất mạnh và là nguyên nhân gây ra hiện tượng thoái hóa tủy xương (MoFi, 2004; Dowling, 2006). Tuy nhiên, dẫn xuất florinated của kháng sinh này, đã được thay thế là florfenicol và nhanh chóng được phổ biến trong một số ngành chăn nuôi công nghiệp làm thực phẩm, bao gồm ngành nuôi trồng thủy sản (Dowling, 2006; Michel *et al.*, 2003; Gaunt *et al.*, 2003; Wrzesinsk *et al.*, 2005). Hầu hết chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra nhạy với florfenicol ở mức giá trị MIC rất thấp ($\leq 0,25$ µg/ml). Kết quả tương tự cũng đã phát hiện trên các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* ở cá nheo Mỹ (McGinnis, 2003). Ngược lại, theo kết quả nghiên cứu của Ho *et al.* (2000) xác định tính nhạy của florfenicol đã giảm trên các loại vi khuẩn như *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas Fluorescens*, *Vibrio cholerae* và *Salmonella* spp phân lập ra được trên các loài vật nuôi thủy sản ở Đài Loan. Kết quả nghiên cứu này cảnh báo nên thận trọng trong quá trình sử dụng florfenicol trong nuôi trồng thủy sản.

Trong nghiên cứu này, chưa tìm thấy sự kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* trên nhóm kháng sinh aminoglycoside như: gentamicin, kanamycin và neomycin. Tuy nhiên, kết quả cho thấy có đến 83% vi khuẩn *E. ictaluri* kháng với streptomycin

trong nhóm thuốc này. Có thể nói, đây là lần đầu tiên phát hiện *E. ictaluri* kháng với streptomycin ở tỉ lệ rất cao. Trong khi đó, một số nghiên cứu trước đây cho rằng vi khuẩn *E. ictaluri* và *E. tarda* hoàn toàn nhạy với streptomycin (Muyembe *et al.*, 1973; Hawke, 1979; Waltman và Shotts, 1986; Stock và Wiedemann, 2001). Gần đây ở Úc, Akinbowale *et al.* (2007) tìm thấy vi khuẩn *Aeromonas* sp. phân lập được từ cá hồi lưng đỏ (*Oncorhynchus mykiss*) kháng với cả tetracycline và streptomycin.

Kết quả nghiên cứu cho thấy 100% vi khuẩn kháng với thuốc kháng sinh colistin. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Muyembe *et al.* (1973) đã công bố vi khuẩn *E. tarda* hoàn toàn kháng với colistin. Ở Hoa Kỳ cách đây hơn 2 thập kỷ, Waltman và Shotts (1986) đã làm kháng sinh đồ trên 118 chủng *E. ictaluri* phân từ lập từ cá nheo mỹ (*Ictalurus punctatus*) bệnh nhiễm trùng máu. Nghiên cứu cho thấy đa số vi khuẩn (hơn 90%) kháng với colistin. Ứng dụng đặc điểm kháng thuốc này, colistin được nhiều nhà khoa học chọn để chuẩn bị môi trường đặc trưng phân lập vi khuẩn nhóm *Edwardsiella*, cụ thể là *E. ictaluri*.

Nghiên cứu tìm thấy 3 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đã giảm tính nhạy với enrofloxacin, thuộc nhóm kháng sinh (flour)quinolone, ở giá trị MIC bằng (hoặc lớn hơn) 2 µg/ml. (Flour) quinolone có khả năng ức chế hoạt động của enzym tổng hợp DNA và hầu hết các vi khuẩn kháng thuốc là do đột biến gen enzym gyrase hoặc enzym topoisomerase. Đối với nhóm vi khuẩn *Enterobacteriaceae* kháng với (flour) quinolones thường trải qua 2 bước: Bước thứ nhất biến dị gen enzym gyrA kháng với nhóm kháng sinh thế hệ I của quinolones như: nalidixic acid và flumequin và làm giảm tính nhạy của những kháng sinh khác thuộc nhóm fluoroquinolones. Bước thứ hai, gây biến đổi gen cả 2 loại enzym gyrA và gyrB làm kháng hoàn toàn nhóm kháng sinh fluoroquinolones (Barnes *et al.*, 1991 và Sørum, 2006). Kết quả nghiên cứu này, phát hiện 3 chủng vi khuẩn đã giảm đi tính nhạy đối với kháng sinh enrofloxacin (5% chủng vi khuẩn) và dẫn đến kháng với flumequin (8%) và oxilic acid (6%). Trong khi đó, theo nghiên cứu trước đây của Stock và Wiedemann (2001) xác định vi khuẩn thuộc giống *Edwardsiella*, kể cả vi khuẩn *E. ictaluri* nhạy với các kháng sinh thuộc nhóm quinolones. Theo báo cáo của Cục kiểm định thuốc ở Châu Âu (EMA), (fluoro) quinolones là nhóm thuốc kháng sinh rất quan trọng chuyên dùng trị các bệnh nhiễm trùng nguy hiểm cho người và động vật. Do đó, việc dùng thuốc kháng sinh này trong thủy sản cần hết sức thận trọng và cần được kiểm soát chặt chẽ bởi các cơ quan có thẩm quyền về thuốc và thực phẩm (EMA, 2006). Ở Việt Nam, nhóm (fluoro) quinolones bị cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản ngoại trừ oxilic acid chỉ được sử dụng khi cần thiết. Chính vì thế, việc nghiên cứu cơ chế kháng thuốc này cần được chú ý trong các nghiên cứu sau.

Đối với kháng sinh oxytetracycline, đa số vi khuẩn *E. ictaluri* (81% chủng vi khuẩn) trong nghiên cứu này kháng với oxytetracycline ở liều lượng cao gấp 3-4 lần giá trị MIC (16 µg/ml). Nhiều tác giả cho rằng sự kháng thuốc oxytetracycline có liên quan đến việc sử dụng thuốc kháng sinh trước đây quá rộng rãi và phổ biến để phòng trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản (Alderman và Hastings, 1998; Van, 2005; DePaola *et al.*, 1988; Reimschuessel và Miller, 2006). Trước đây, một số nhà khoa học đã phát hiện các gen kháng thuốc tetracycline trên các vi khuẩn gây bệnh cá.

Tuy nhiên, đa số tập trung trên vi khuẩn *E.tarda* (Aoki *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2004; Jun *et al.*, 2004; Roberts, 2005). Cho đến nay, các thông tin về gen kháng thuốc trên vi khuẩn *E. ictaluri* chưa được tác giả nào nghiên cứu. Vì thế, nghiên cứu cơ chế kháng thuốc oxytetracycline trên vi khuẩn *E. ictaluri* cũng là vấn đề rất bức thiết cho các đề tài nghiên cứu sau này.

Tương tự với oxytetracycline, có đến 73% vi khuẩn *E. ictaluri* kháng với trimethoprim. Ở Hoa kỳ, theo Hawke (1979); Waltman và Shotts (1986), oxytetracycline and trimethoprim được khuyến cáo sử dụng trị bệnh nhiễm trùng máu trên cá nheo mỹ (ESC) do vi khuẩn *E. ictaluri*. Từ lâu, 2 loại thuốc kháng sinh này được sử dụng rất phổ biến để phòng trị bệnh cá, tôm ở Việt Nam (Dung *et al.*, 1997; Van, 2005; Phuong *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2005 và Sarter *et al.*, 2007).

Điểm nổi bật của kết quả nghiên cứu cho thấy, hiện tượng đa kháng thuốc (kháng ít nhất 3 loại thuốc) có đến 73,4% vi khuẩn. Những chủng vi khuẩn này khi gây bệnh sẽ gặp nhiều khó khăn trong điều trị. Hiện tượng kháng thuốc càng trở nên nghiêm trọng hơn, khi trong môi trường nuôi thủy sản sự kháng thuốc hình thành gián tiếp thông qua thể R-plasmid (R-plasmid-mediated-resistance). Các R-Plasmid có thể làm trung gian cho sự kháng một hay nhiều loại thuốc kháng sinh thông qua các gen mã hoá theo cơ chế bất hoạt hoá một hay nhiều loại kháng sinh (Aoki, 1988). Điển hình, một số nhà nghiên cứu trước đây đã phát hiện trên một số vi khuẩn gây bệnh trên cá chứa plasmid kháng thuốc kháng sinh chloramphenicol, trimethoprim, sulphonamides và tetracyclines (Mcpherson *et al.*, 1991). Ngoài ra, một số tác giả khác đã xác định sự trao đổi plasmid kháng thuốc đến 5 loại kháng sinh trên các vi khuẩn gây bệnh cá ở cả môi trường nước biển và nước ngọt như: *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *Aeromonas Salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda* và *Yersinia ruckeni* (Aoki và Takahashi, 1987; DePaola 1988, 1995).

Tóm lại, một số loại kháng sinh nhạy có thể sử dụng để trị bệnh gan thận mũ trên cá tra như amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, florfenicol và neomycin. Tuy nhiên, phần lớn các chủng vi khuẩn đều kháng với các loại kháng sinh như streptomycin, trimethoprim và một số chủng đã kháng với nhóm quinolones. Hiện tượng đa kháng cũng được ghi nhận rất cao (hơn 71% số chủng vi khuẩn). Nhằm hạn chế những rủi ro có thể xảy ra, chúng ta cần thực hiện nghiên cứu này sâu hơn để xác định bản chất của cơ chế kháng thuốc, từ đó đưa ra những giải pháp khống chế tình trạng kháng thuốc một cách có hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahne, W., Winton, J.R. and Kimura, T. 1989. Prevention of infectious diseases in aquaculture. J. Vet.Med. B.36: 561-567
- Akinbowale, O.L., H. Peng, P. Grant, and M.D. Barton. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile *Aeromonads* and *Pseudomonads* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. Int. J. Antimicrob. Agents 30:177-182.
- Alderman, D.J., and T.S. Hastings. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. Int. J. Food Sci. Tech. 33:139-155.
- Aoki, T. 1988. Drug resistance plasmids from fish pathogens. Microbiol. Sci. 5:219-223.

- Aoki, T., and A.Takahashi. 1987. Class D tetracycline resistance determinants of R plasmids from the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, and *Pasteurella piscicida*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 31: 1278-1280.
- Baele, M., P., Baele, M.Vaneechoutte, V. Storms, P.Butaye, L.A. Devriese, G. Verschraegen, M. Gillis, and F. Haesebrouck. 2000. Application of tDNA-PCR for the identification of *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 38:4201-4207.
- Barnes, A.C., C.S. Lewin, T.S. Hastings, and S.G.B. Amyes. 1991. Fluorquinolones display rapid bactericidal activity and low mutation frequencies against *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.* 14:661-667.
- Cabello, F.C. 2004. Antibiotics and aquaculture. An analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. *Fundacion Terram. Analisis de Politicas Publicas.* 17:11–16.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; informational supplement, M49-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard, third edition, M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.
- DePaola, A., J. T. Peeler and G.E. Rodrick. 1995. Effect of oxytetracycline –medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2335-2340.
- DePaola, A., P.A. Flynn, R.M. McPhearson, and S.W. Levy. 1988. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline- and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1861–1863.
- Dowling, P.M. 2006. Chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol. In: S. Giguère, J. F. Prescott, D. Baggot, R D. Walker and P.M. Dowling (ed.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 241-248.
- Dung, T.T., Z. Galina, D.T.H. Oanh, Z. Jeney, and N.A. Tuan. 1997. Results of the baseline survey on fish health management in freshwater aquaculture of the Mekong Delta, Vietnam. *WEST-EAST-SOUTH (WES) Newsletter* No.6.
- Dung T.T., M.Crumlish, N.T.N.Ngoc, N.Q.Thịnh và Đ.T.M.Thy. 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*: 137-142
- European Medicines Agency. Veterinary Medicines and Inspections (EMA). 2006. Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: Development of resistance and impact on human and animal health, 23 pp.
- FAO Globefish 2007. *Pangasius market Report* May, 2007.
<http://w.w.w.cfish.com/index.php?act=changepage&code=new&id=33>
- Ferguson, H.W., J.F. Turnbull, A. Shinn, K. Thompson, T.T. Dung, and M. Crumlish. 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.* 24:509-513.
- Gaunt, P., R. Endris, L. Khoo, T. Leard, S. Jack, T. Santucci, T. Katz, S.V.Radecki, and R. Simmons. 2003. Preliminary assessment of the tolerance and efficacy of florfenicol against *E. ictaluri* administered in feed to channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health.* 15:239-247.
- Hawke, J. 1979. A bacterium associated with disease of pond cultured catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish. Res. Board. Can.* 36:508-1512.

- Ho, S.P., T.Y. Hsu, M.H. Chen, and W.S. Wang. 2000. Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *J. Vet. Med. Sci.* 62:479-485.
- Jun, L.J., J.B. Jeong, M.D. Huh, J.K. Chung, D.L. Choi, C.H. Lee, and H.D. Jeong. 2004. Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture*. 240:89-100.
- Kim, S.R., L. Nonaka and S. Suzuki. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiol. Letters*. 237:147-156.
- Le, T.X., Y. Munekage, S.I. Kato. 2005. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Sci. Total Environ.* 349:95-105.
- McGinnis, A., P. Gaunt, T. Santucci, R. Simmons, and R. Endris. 2003. *In vitro* evaluation of the susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to florfenicol. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:576-9.
- McPhearson, R.M., A. DePaola, S.R. Zywno, M.L. Motes, and A.M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*. 99:203-211.
- Michel, C., B. Kerouault, and C. Martin. 2003. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *J. appl. Microbiol.* 95:1008-1015.
- Ministry of Fisheries. 2005. Vietnam Fisheries Sector Programme Support, Phase II 2006 - 2010. Project ref.104.Vietnam:803-200.
- Mitchell, A.J. 1997. Fish disease summaries for the southeastern United States from 1976-1995. *Aquacult. Mag.* 23:87-93.
- MoFi. 2004. Ministry of Fisheries in Vietnam. Department of legislation - Fisheries law project. <http://www.mofi.gov.vn/law/default.aspx?tabid=288&ID=578>
- Muyembe, T., J. Vandepitte, and J. Desmyter. 1973. Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4:521-524
- Phuong, N.T., D.T.H. Oanh, T.T. Dung, and L.X. Sinh. 2005. Bacterial resistance to antimicrobials use in shrimps and fish farms in the Mekong Delta, Vietnam. In *Proceedings of the International Workshop on antibiotic resistance in Asian Aquaculture Environments*. Chiang Mai, Thailand. ISBN 88-901344-3-7
- Reger, P.J., D.F. Mockler, and M.A. Miller. 1993. Comparison of antimicrobial susceptibility, beta-lactamase production, plasmid analysis and serum bactericidal activity in *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* and *E. hoshinae*. *J. Med. Microbiol.* 39: 273-281
- Reimschuessel, R., and R.A. Miller. 2006. Antimicrobial drug use in aquaculture. In: S. Giguère, J. F. Prescott, D. Baggot, R D. Walker and P.M. Dowling (ed.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 593-606.
- Roberts, M.C. 2005. MiniReview: Update on acquired tetracycline resistance. *FEMS Microbiol. Letters*. 245:195-203
- Sorum, H. 2006. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In F.M. Aarestrup (ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA, pp. 213-238.
- Stock, I., and B. Wiedemann. 2001. Natural antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* and *E. hoshinae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2245-2255.
- Sarter, S., Kha, N. H. N., Hung, L.T., Jérôme Lazard, J. & Montet, D. 2007 Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18: 1391-1396

- Turnidge, J., and D.L. Paterson. 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin. Microbiol. Reviews.* 20:391-408.
- Van, P.T. 2005. Current status of aquaculture veterinary drugs usage for aquaculture in Vietnam. In Proceedings of the international workshop on antibiotic resistance in Asian aquaculture environments. Chiang Mai, Thailand. ISBN 88-901344-3-7.
- Waltman, W. D., and E.B. Shotts. 1986. Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*. *J. Wildlife Dis.* 22:173-177.
- Wang, H., J.L. Dzink-Fox, M. Chen, and S.B. Levy. 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1515-1521.
- Wrzesinski, C., L. Crouch, P. Gaunt, D. Holifield, N. Bertrand, and R. Endris. 2005. Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Aquaculture.* 253:309-316.