



## KHẢ NĂNG NHẠY VỚI KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG NỘI TẠNG TRÊN CÁ LÓC (*Channa striata*) Ở TRÀ VINH

Đoàn Thị Minh Châu<sup>1</sup>, Lưu Hồng Mai<sup>2</sup> và Từ Thanh Dung<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Sinh viên ngành Bệnh học Thủy sản (Khóa 40), Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Sinh viên ngành Bệnh học Thủy sản (Khóa 39), Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Bộ môn Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Từ Thanh Dung (email: [ttdung@ctu.edu.vn](mailto:ttdung@ctu.edu.vn))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 20/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

### Title:

Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogen causing internal white spot disease in snakehead fish (*Channa striata*) in Tra Vinh province

### Từ khóa:

*Aeromonas schubertii*, cá lóc, *Channa striata*, kháng sinh đồ, MIC, Trà Vinh

### Keywords:

*Aeromonas schubertii*, antibiotic susceptibility, *Channa striata*, MIC, snakehead, Tra Vinh

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the susceptibility of bacterial pathogens *Aeromonas schubertii* causing white spot disease on snakehead fish (*Channa striata*) in intensive ponds in Tra Vinh province. All 24 isolates were tested for physiological, biochemical indicators before proceeding antibiotic susceptibility with 15 antimicrobial agents. Then 4 representative isolates were chosen to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) with 4 antibiotics (colistin, doxycycline, erythromycin, amoxicillin) by method with broth dilution. The results showed that *A. schubertii* was highly susceptible with doxycycline (83,33%) and colistin (79,17%), highly resistance to oxytetracycline (79,17%), florfenicol (79,17%), erythromycin (70,83%) and novobiocin (62,5%). *A. schubertii* isolates showed fully resistant to ampicillin, amoxicillin and rifampicin. The results from determining the MIC values showed that 4 isolates were highly susceptible to colistin (MIC = 0,25-0,5 µg/mL) and doxycycline (MIC = 4 µg/mL), resistant to erythromycin (MIC = 8 µg/mL) and fully resistant to amoxicillin (MIC = 512 µg/mL).

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Aeromonas schubertii* gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*) nuôi thâm canh ở tỉnh Trà Vinh. Tất cả 24 chủng vi khuẩn được kiểm tra các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa trước khi tiến hành làm kháng sinh đồ với 15 loại kháng sinh. Sau đó 4 chủng đại diện được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) với 4 loại kháng sinh (colistin, doxycycline, erythromycin, amoxicillin) bằng phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng. Kết quả cho thấy đa số vi khuẩn *A. schubertii* nhạy cảm cao với kháng sinh doxycycline (83,33%) và colistin (79,17%); kháng cao với oxytetracycline (79,17%), florfenicol (79,17%), erythromycin (70,83%) và novobiocin (62,5%); và kháng hoàn toàn với ampicillin, amoxicillin và rifampicin. Kết quả xác định MIC cho thấy 4 chủng vi khuẩn *A. schubertii* nhạy cao với colistin (MIC = 0,25-0,5 µg/mL) và doxycycline (MIC = 4 µg/mL), kháng với erythromycin (MIC = 8 µg/mL) và kháng hoàn toàn với amoxicillin (MIC = 512 µg/mL).

Trích dẫn: Đoàn Thị Minh Châu, Lưu Hồng Mai và Từ Thanh Dung, 2018. Khả năng nhạy với kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*) ở Trà Vinh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 108-115.

## 1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là vùng trọng điểm sản xuất thủy sản, hàng năm cung cấp trên 52% sản lượng thủy sản cả nước. Năm 2016, vùng ĐBSCL có diện tích nuôi thủy sản ước tính đạt 772 nghìn ha, trong đó sản lượng cá nuôi đạt trên 2,5 triệu tấn, tăng 65,1 nghìn tấn so với cùng kỳ năm trước (Tổng cục Thống kê, 2016). Điều đó cho thấy nghề nuôi trồng thủy sản ở ĐBSCL đang tăng trưởng khá mạnh. Cá lóc là loài động vật thủy sản được nuôi phổ biến ở ĐBSCL do thịt cá lóc thơm ngon và có giá trị dinh dưỡng cao. Tuy nhiên nghề nuôi cá lóc chủ yếu là tự phát, theo mô hình thâm canh với mật độ cao, không tuân thủ đúng qui trình kỹ thuật nuôi và quản lý dịch bệnh thủy sản. Chính vì vậy, tình hình dịch bệnh thường xảy ra là điều khó tránh khỏi gây ảnh hưởng rất lớn đến sản lượng cũng như hiệu quả kinh tế của nghề nuôi cá lóc ở ĐBSCL.

Vi khuẩn *Aeromonas schubertii* lần đầu tiên được phát hiện gây bệnh trên người bởi Hickman-Brenner *et al.* (1988). Tuy nhiên, có rất ít thông tin liên quan đến khả năng gây bệnh của vi khuẩn *A. schubertii* trên các loài cá (Yu *et al.*, 2009). Năm 2010, *A. schubertii* gây bệnh trên cá lóc bông (*Channa maculata*) với tỉ lệ chết cao gây thiệt hại nghiêm trọng đối với kinh tế nghề cá ở Trung Quốc (Chen *et al.*, 2012). Vài năm gần đây, một tác nhân gây bệnh trên cá lóc nuôi ở ĐBSCL nói chung và Trà Vinh nói riêng với dấu hiệu bệnh lí là đốm trắng trên gan, thận, tỷ tạng được xác định là do vi khuẩn *A. schubertii* (Dung *et al.*, 2018) tương tự nghiên cứu của Chen *et al.* (2012). Mặc dù bệnh mới xuất hiện nhưng có tỉ lệ chết cao và khó điều trị gây thiệt hại lớn cho hộ nuôi. Bên cạnh đó, người nuôi thường sử dụng hóa chất và kháng sinh không đúng qui định để điều trị bệnh dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh trong các loài vi khuẩn gây bệnh trên cá (Dung *et al.*, 2009). Theo Liu and Li (2012) *A. schubertii* gây bệnh trên cá lóc tại Trung Quốc (*Ophiocephalus argus*) nhạy với kháng sinh sulfamethoxazole/trimethoprim, oxytetracycline, nhóm phenicol, aminoglycoside, quinolones; kháng với ampicillin, clindamycin, rifampicin, vancomycin,... Yano *et al.* (2015) cho biết vi khuẩn *A. schubertii* trên tôm nhạy với gentamicin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim/sulphamethoxazole, nhóm cephalosporin, beta-lactam, quinolon; kháng với ampicillin, ampicillin-sulbactam, clindamycin, erythromycin. Hiện tượng giảm tính nhạy với thuốc làm cho việc điều trị trở nên khó khăn và tốn kém hơn.

Cho đến nay, việc nghiên cứu tính nhạy cảm với thuốc kháng sinh của vi khuẩn *A. schubertii* gây

bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*) ở Trà Vinh chưa được thực hiện. Vì vậy, kết quả của nghiên cứu này nhằm cung cấp thông tin mới nhất về tính nhạy của vi khuẩn *A. schubertii* với các loại kháng sinh, góp phần đánh giá được các loại kháng sinh thích hợp để điều trị bệnh khi cần thiết đảm bảo cho sự phát triển bền vững của nghề.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Kiểm tra bệnh cá

Mẫu cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng được thu từ 27 ao nuôi thâm canh ở tỉnh Trà Vinh (từ tháng 9 năm 2016 đến tháng 2 năm 2018). Tổng số mẫu bao gồm 120 mẫu cá lóc có biểu hiện bệnh đốm trắng nội tạng và 15 mẫu cá khỏe, trọng lượng 50-700 g. Mẫu cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng được tiến hành thu mẫu phân lập vi sinh dựa theo cẩm nang của Frerichs and Millar (1993). Các mẫu gan, thận, tỷ tạng được cấy trên môi trường tryptic soy agar (TSA, Merck) trực tiếp tại địa điểm thu mẫu, sau đó, được ủ ở 28°C trong 24-48 giờ và được phân tích tại Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phân lập và định danh vi khuẩn

Chủng vi khuẩn thuần được phân lập và phát triển trên môi trường TSA được kiểm tra các đặc điểm cơ bản như: nhuộm Gram, tính di động, oxidase, catalase và phản ứng O/F.

*Phương pháp định danh vi khuẩn:* so sánh được dựa vào các chỉ tiêu hình thái, sinh lý, sinh hóa theo cẩm nang của Frerichs and Millar (1993) và Buller (2004) và ứng dụng phương pháp sinh học phân tử giải trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn, tra cứu trên ngân hàng Gen bằng chương trình Blast Search.

### 2.3 Phương pháp lập kháng sinh đồ

Phương pháp làm kháng sinh đồ được thực hiện theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). Mười lăm loại kháng sinh thường được sử dụng trong các nghiên cứu được chọn gồm: colistin (COL/10µg), doxycycline (DO/30µg), erythromycin (ERY/15µg), flumequine (FLQ/30µg), rifampicin (RIF/30µg), amoxicillin (AML/25µg), ampicillin (AMP/10µg), cefalexin (CL/30µg), ceftazidime (CAZ/30µg), chloramfenicol (C/30µg), florfenicol (FFC/30µg), novobiocin (NV/5µg), oxytetracycline (OT/30µg), tetracycline (TE/30µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT/1,25/23,75µg) (Oxoid, UK) để thực hiện thí nghiệm này.

Tổng cộng 24 chủng vi khuẩn kiểm tra kháng sinh đồ trên 15 loại thuốc kháng sinh. Dùng que cấy tiết trùng lấy khuẩn lạc trên đĩa thạch TSA, cho vào ống nghiệm chứa 5 mL nước muối sinh lý (0,85%) đã tiết trùng. Trộn và so sánh độ đục với ống

McFarland số 3 (9,7 mL 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và 0,3 mL 1% BaCl<sub>2</sub>), mật độ vi khuẩn khoảng 9x10<sup>8</sup> cfu/mL. Dùng tăm bông tiết trùng nhúng vào dung dịch vi khuẩn, quét đều lên mặt thạch TSA. Sau đó dùng pel đã tiết trùng lấy đĩa kháng sinh đặt trên môi trường thạch và đặt đĩa vào tủ ẩm ở 28°C. Đo đường kính vòng tròn vô trùng (mm) dựa vào chuẩn đường kính vòng tròn vô trùng theo tiêu chuẩn của CLSI (2014) nhằm xác định loại kháng sinh nhạy, trung bình và kháng.

**2.4 Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC - Minimum Inhibitory Concentration) của thuốc kháng sinh lên vi khuẩn**

Giá trị MIC được xác định bằng phương pháp pha loãng thuốc kháng sinh theo tiêu chuẩn của Ruangpan and Eleonor (2004) với 4 loại kháng sinh gồm 2 loại nhạy cao (colistin, doxycycline) và 2 loại kháng cao (erythromycin, amoxicillin) (Sigma-Aldrich, Merck KgaA). Chọn 4 chủng vi khuẩn phân lập thu được tại địa điểm khác nhau từ 24 chủng vi khuẩn đã kiểm tra kháng sinh đồ (Bảng 1).

**Bảng 1: Vi khuẩn phân lập từ gan, thận, tỷ tạng của cá lóc bị đốm trắng nội tạng ở Trà Vinh năm 2017**

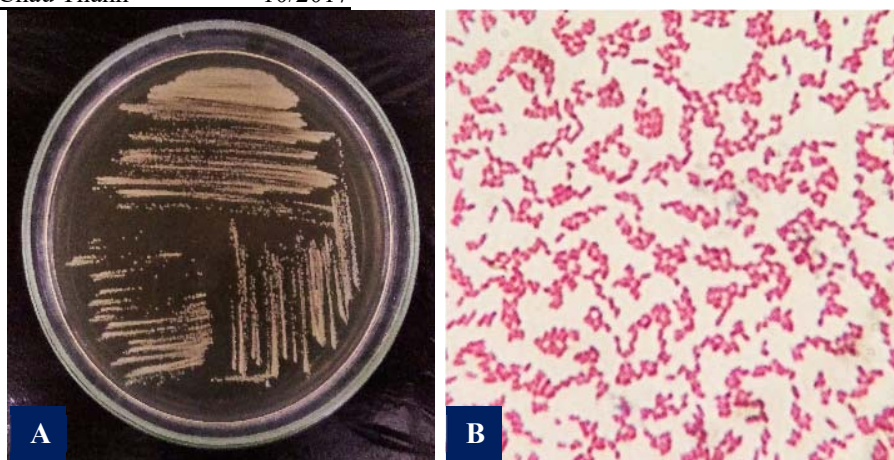
Chủng vi khuẩn phân lập	Địa điểm thu mẫu	Thời gian thu mẫu
STC30	Trà Cú	07/2017
STC56	Càng Long	07/2017
STC94	Cầu Ngang	10/2017
STC98	Châu Thành	10/2017

Vi khuẩn được nuôi trên môi trường TSA trong 24-36 giờ ở nhiệt độ 28°C. Năm khuẩn lạc trên đĩa TSA được chọn cho vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường giàu dinh dưỡng brain heart infusion broth (BHI-B, Merck), ủ ở 28°C trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn được đo bằng máy quang phổ OD<sub>625</sub> = 0,1±0,02 (khoảng 10<sup>8</sup> cfu/mL). Vi khuẩn được pha loãng bằng môi trường BHI-B với độ pha loãng 1:10. Mật độ vi khuẩn sử dụng thực hiện thí nghiệm xác định MIC là 10<sup>5</sup> cfu/mL. Cho 2 mL vi khuẩn vào mỗi ống nghiệm chứa 2 mL thuốc có hàm lượng 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512; 1024 µg/mL và không lặp lại. Tất cả các ống nghiệm được ủ ở 28°C trong 24 giờ. Đọc kết quả bằng cách so sánh độ đục của mỗi ống MIC với ống đối chứng âm (2 mL BHI-B + 2 mL nước cất), đối chứng dương (2 mL vi khuẩn + 2 mL nước cất). Giá trị của MIC được xác định là hàm lượng thấp nhất của thuốc kháng sinh trong ống nghiệm không có vi khuẩn phát triển.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Kết quả phân lập và định danh tác nhân gây bệnh**

Tất cả 24 chủng vi khuẩn được phân lập từ gan, thận, tỷ tạng của cá bệnh đốm trắng nội tạng trên môi trường TSA. Các chủng vi khuẩn phân lập đều có các khuẩn lạc nhỏ li ti, có dạng tròn, kích thước khá nhỏ từ 0,5-1 mm, sau 36-48 giờ ở nhiệt độ 28°C, hơi lồi, rìa nhẵn, bóng, màu vàng nhạt, hơi trong (Hình 1).



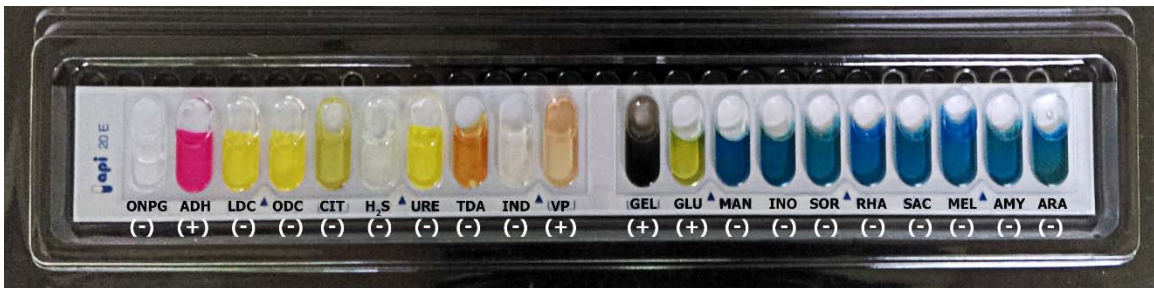
**Hình 1: (A) Vi khuẩn phân lập trên TSA, (B) Kết quả nhuộm Gram vi khuẩn (100X)**

Các chủng vi khuẩn phân lập có hình que ngắn tròn về 2 đầu, Gram âm, có khả năng di động phản ứng dương tính với catalase, oxidase, có khả năng lên men và oxy hóa đường glucose (O/F). Sáu chủng vi khuẩn được chọn để tiến hành định danh loài bằng bộ kit API 20E. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn

cho phản ứng dương tính với các chỉ tiêu arginine dihydrolase, voges droskauer, gelatinase, glucose; các chỉ tiêu beta-galactopyranoside, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, H<sub>2</sub>S production, urease, tryptophane, indole droduction, manniton, inositol, sorbitol,

rhamnose, saccharose, melibiose, amygdalin, arabinose cho ra phản ứng âm tính. Tuy nhiên, sử dụng bộ kit API 20E không định danh được đến loài của vi khuẩn *A. schubertii* (Hình 2). Nhiều nghiên cứu đã tìm thấy, cả 2 vi khuẩn *A. schubertii* và *A.*

*jandaei* có nhiều đặc điểm sinh học tương đồng với *A. hydrophila*. Do đó, chỉ dựa vào đặc điểm sinh lý, sinh hóa và kit API 20E sẽ rất dễ gây ra sự nhầm lẫn và sai sót khi định danh nhóm vi khuẩn này (Carnahan *et al.*, 1989; Carnahan *et al.*, 1991).



Hình 2: Kết quả kiểm tra vi khuẩn phân lập bằng bộ kit API 20E

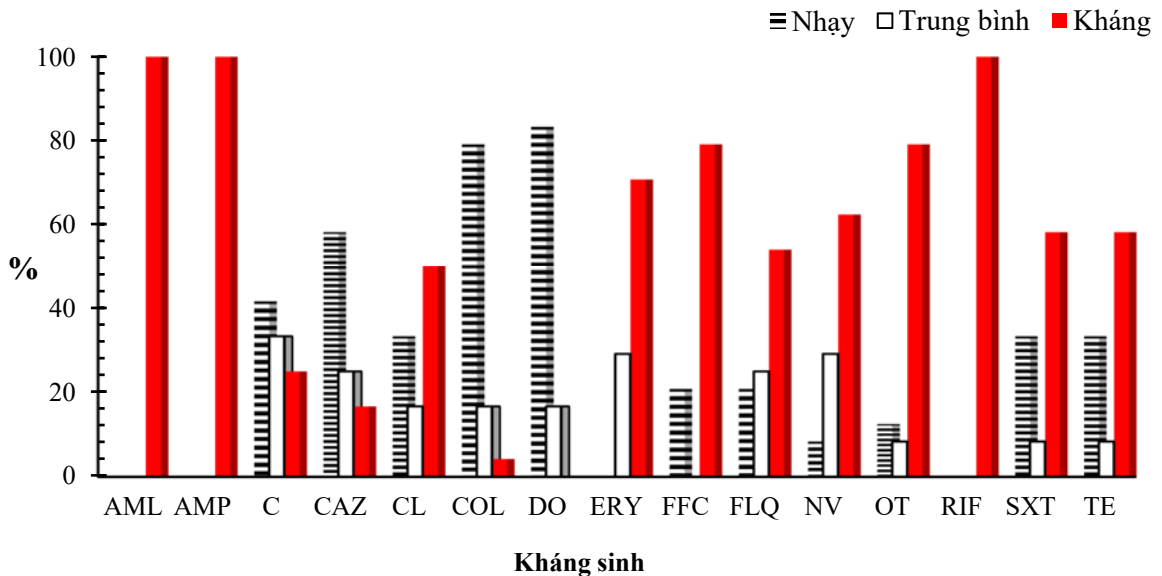
Chính vì thế, nghiên cứu này đã ứng dụng giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA được tra cứu trên ngân hàng Gen bằng chương trình Blast Search và đã xác định được cả 6 chủng vi khuẩn phân lập được chọn đại diện (STC94, STC98, STC30, STC56, STC07 và STC23). Kết quả đã xác định các chủng phân lập trong nghiên cứu này có trình tự gen tương đồng là 99% với chủng vi khuẩn chuẩn *A. schubertii* ATCC 43700T<sup>a</sup> khi so sánh trên ngân hàng gen. Các nghiên cứu trước đây cũng đã sử dụng phương pháp này để định danh loài vi khuẩn *A. schubertii* với tỉ lệ tương đồng là 99% (Chen *et al.*, 2012; Liu and Li, 2012). Như vậy, kết quả kiểm tra các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và giải trình tự gen 16S rRNA đã xác định được vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này là *Aeromonas schubertii*.

### 3.2 Kết quả kháng sinh đồ

Kết quả kháng sinh đồ của 24 chủng vi khuẩn cho thấy các chủng *A. schubertii* nhạy với doxycycline (83,33%), colistin (79,17%), ceftazidime (58,33%) và chloramfenicol (41,67%). Tuy nhiên, vi khuẩn này kháng cao với oxytetracycline (79,17%), florfenicol (79,17%), erythromycin (70,83%), novobiocin (62,5%),

tetracycline (58,33%), sulfamethoxazole/trimethoprim (58,33%), flumequine (54,17%), cefalexin (50%) và kháng hoàn toàn với ampicillin, amoxicillin, rifampicin (Hình 3).

Trong nghiên cứu này, các chủng *A. schubertii* đều kháng hoàn toàn với kháng sinh ampicillin, amoxicillin và cefalexin. Quách Văn Cao Thi và *ctv.* (2014) cũng báo cáo ghi nhận vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá tra kháng hoàn toàn với ampicillin, amoxicillin và cefalexin. Vi khuẩn *Aeromonas* spp. gây bệnh trên cá tra đã kháng tự nhiên với ampicillin (kháng 100%). Theo các nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *A. schubertii* gây bệnh trên người, tôm và cá lóc ở Trung Quốc đều kháng với kháng sinh ampicillin (Hickman-Brenner *et al.*, 1988; Liu and Li., 2012; Yano *et al.*, 2015). Do vi khuẩn nhóm *Aeromonas* là nhóm kháng thuốc tự nhiên với nhóm  $\beta$ -lactam, chúng tiết ra enzyme  $\beta$ -lactamase phá vỡ vòng  $\beta$ -lactam nên làm mất tác dụng của thuốc (Chien *et al.*, 1998). Tuy nhiên, vi khuẩn *A. schubertii* vẫn còn nhạy với ceftazidime (58,33%) kết quả này tương tự nghiên cứu của Chen *et al.* (2012). Do ceftazidime là kháng sinh nhóm cephalosporin thuộc thế hệ thứ 3, được nghiên cứu để chống lại tác động phân hủy enzyme  $\beta$ -lactamase của vi khuẩn (Brown, 2000).



**Hình 3: Tỷ lệ (%) nhạy cảm của các chủng vi khuẩn *A. schubertii* với 15 loại kháng sinh**

Tetracycline, oxytetracycline, doxycycline là các kháng sinh thuộc nhóm tetracyclines có phổ hoạt động rộng (Prescott *et al.*, 2000). Vi khuẩn *A. schubertii* nhạy cao với doxycycline (83,33%) do doxycycline là kháng sinh thuộc thể hệ mới của nhóm tetracyclines. Kết quả của nghiên cứu cho thấy *A. schubertii* kháng với tetracycline (58,33%) và oxytetracycline (79,17%). Ngược lại với nghiên cứu của Chen *et al.* (2012) vi khuẩn *A. schubertii* gây bệnh trên cá lóc bông (*Channa maculata*) nhạy với tetracycline và kết quả của Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2011) cho thấy *A. hydrophila* phân lập trên cá tra nhạy với tetracycline (75,4%). Sự kháng kháng sinh của nhóm tetracyclines chủ yếu qua 2 cơ chế: các protein bảo vệ ribosome (RPPs-ribosomal protection proteins) và hệ thống bơm thải tetracycline phụ thuộc năng lượng (energydependent efflux pumps) (Roberts, 1996). Nhiều nhà khoa học cho rằng các chủng vi khuẩn kháng cao với nhóm thuốc tetracyclines liên quan đến việc sử dụng thuốc kháng sinh này quá rộng rãi và phổ biến trong nuôi trồng thủy sản, chúng có khả năng truyền gen kháng thuốc này sang vi khuẩn khác thông qua R-plasmid (Alderman and Hasting, 1998; Reimschuessel and Miller, 2006). Kháng sinh thuộc nhóm phenicol là chloramfenicol, florfenicol có phổ kháng khuẩn rộng, tác dụng lên vi khuẩn bằng cách ngăn cản quá trình tổng hợp protein do kết hợp với tiêu đơn vị ribosome 50S đồng thời ức chế transferase nên acid amin được mã hoá không gắn được vào polypeptid. Vi khuẩn *A. schubertii* kháng với florfenicol (79,17%) trong khi đó báo cáo của Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2011) cho biết *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra kháng rất thấp với florfenicol là 4,92%. Tương tự 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*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio cholerae* và *Salmonella* spp. phân lập ra được trên các loài vật nuôi thủy sản ở Đài Loan. Sự giảm tính nhạy của vi khuẩn với nhóm chloramphenicol là do vi khuẩn có enzyme chloramphenicol acetyltransferase. Kết quả nghiên cứu này cảnh báo nên thận trọng trong quá trình sử dụng florfenicol trong nuôi trồng thủy sản. Kháng sinh chloramphenicol nằm trong danh mục cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Mặc dù đã bị cấm sử dụng từ năm 2005 nhưng kết quả của nghiên cứu này cho thấy vi khuẩn *A. schubertii* kháng với chloramfenicol (25%), trong khi báo cáo của Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2011) cho biết *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra kháng kháng sinh này với tỉ lệ là 3,28%.

Sulfamethoxazole/trimethoprim là kháng sinh phổ rộng có tác dụng ức chế sự tổng hợp acid folic của vi khuẩn (Prescott *et al.*, 2000). Đối với nghiên cứu này, *A. schubertii* chỉ nhạy với sulfamethoxazol/trimethoprim tỉ lệ là 33,33% và đã kháng với tỉ lệ 58,33%, trong khi vi khuẩn này cho kết quả nhạy với kháng sinh sulfamethoxazole trên cá lóc tại Trung Quốc (*Ophiocephalus argus*) theo nghiên cứu của Liu and Li (2012). Trong nuôi trồng thủy sản, từ lâu kháng sinh sulfamethoxazole/trimethoprim được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh do vi khuẩn Gram âm gây ra ở nhiều nước trên thế giới (Prescott *et al.*, 2000; Serrano, 2005; Dung *et al.*, 2008). Kết quả trên cho thấy vi khuẩn *A. schubertii* đã giảm tính nhạy với loại kháng sinh này.

Vi khuẩn *A. schubertii* trong nghiên cứu này nhạy cao với colistin với tỉ lệ là 79,17%. Theo nghiên cứu của Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2011) cho thấy *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra nhạy với colistin tỉ lệ là 1,64%.

Trong nghiên cứu này, *A. schubertii* kháng với rifampicin (100%) tương tự nghiên cứu của Liu and Li (2012) vi khuẩn này cũng kháng với rifampicin. Vi khuẩn *A. schubertii* kháng với erythromycin (70,83%), ngược lại kết quả của Chen *et al.* (2012) cho rằng *A. schubertii* gây bệnh trên cá lóc bông (*Channa maculata*), nhạy với kháng sinh erythromycin và nghiên cứu của Liu and Li (2012) vi khuẩn này nhạy trung bình với erythromycin. Như vậy, vi khuẩn này đã giảm tính nhạy với 2 loại kháng sinh trên. Vi khuẩn *A. schubertii* kháng với novobiocin (62,5%). Trong khi nghiên cứu của Orozval *et al.* (2008), vi khuẩn *A. hydrophila* ở cá tra kháng novobiocin (87%) nhưng theo Laith and Najiah (2013) vi khuẩn này trên cá trê phi (*Clarias gariepinus*) nhạy với kháng sinh novobiocin đến 90,91%. Do đó, cần thật thận trọng trong việc sử dụng kháng sinh này trong điều trị bệnh do vi khuẩn *A. schubertii* gây ra.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy hầu hết 24 chủng vi khuẩn *A. schubertii* đều đa kháng thuốc (vi khuẩn kháng ít nhất là 3 loại kháng sinh). Với 15 loại thuốc kháng sinh vi khuẩn *A. schubertii* đa kháng ít nhất 3 loại kháng sinh và nhiều nhất 9 loại kháng sinh, trong đó đa kháng 6 loại kháng sinh chiếm tỷ lệ cao nhất là 29,17% và kiểu hình đa

**Bảng 3: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh trên vi khuẩn**

Kháng sinh	Chỉ tiêu MIC (µg/mL) (CLSI, 2014)		Kết quả MIC (µg/mL)			
	Nhạy	Kháng	STC30	STC56	STC94	STC98
Amoxicillin	≤ 4	≥ 16	512	512	512	512
Colistin	≤ 2	≥ 8	1	1	0,25	0,5
Doxycycline	≤ 4	≥ 16	8	4	4	4
Erythromycin	≤ 0,5	≥ 8	8	8	8	8

Kết quả Bảng 3 cho thấy vi khuẩn *A. schubertii* nhạy với colistin (MIC = 0,25-1 µg/mL) thấp hơn so với điểm nhạy của colistin là ≤ 2 µg/mL, cụ thể 2/4 chủng ở giá trị MIC = 1 µg/mL, 1/4 chủng ở giá trị MIC = 0,5 µg/mL và 1/4 chủng ở giá trị MIC = 0,25 µg/mL. Doxycycline có 1/4 chủng ở giá trị MIC = 8 µg/mL thuộc khoảng giữa của điểm tới hạn MIC và 3/4 chủng ở giá trị MIC = 4 µg/mL trong khoảng nhạy của doxycycline MIC ≤ 4 µg/mL. Tuy nhiên, tất cả 4 chủng vi khuẩn này đều có giá trị MIC của erythromycin ở 8 µg/mL là giá trị kháng thấp nhất so với điểm tới hạn MIC ≥ 8 µg/mL và kháng hoàn toàn với amoxicillin ở giá trị là 512 µg/mL rất cao so với điểm tới hạn MIC là ≥ 16 µg/mL. Kết quả này cho thấy vi khuẩn *A. schubertii* gây bệnh trên cá lóc đen (*Channa striata*) ở tỉnh Trà Vinh hiện nay đã

kháng AMP+AML+FLQ+RIF+ERY+NV và AMP+AML+FFC+RIF+NV+OT là phổ biến nhất. Quách Văn Cao Thi và *ctv.* (2014) cũng cho thấy *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra trong nghiên cứu đều đa kháng với ít nhất là 4 loại kháng sinh và nhiều nhất là 12 loại kháng sinh. Tình trạng kháng thuốc ở vi khuẩn trở nên nghiêm trọng hơn khi giữa các vi khuẩn cùng loài và khác loài trong môi trường có khả năng tiếp hợp trao đổi plasmid. Do plasmid được xem là yếu tố quan trọng gây hiện tượng đa kháng thuốc ở vi khuẩn vì chúng mang các gen mã hóa cho việc kháng lại nhiều nhóm kháng sinh như β-lactam, macrolide, trimethoprim/sulfamethoxazole, aminoglycosides, tetracyclin và phenicol (Prescott *et al.*, 2000; Nikaido, 2009). Ngoài ra, sự kháng thuốc của vi khuẩn trên động vật thủy sản còn là một mối đe dọa lớn vì chúng có thể truyền gen kháng thuốc sang các chủng vi khuẩn gây bệnh ở người thông qua tiếp hợp (Dung *et al.*, 2009; Phạm Thanh Hương và *ctv.*, 2011), điều này đặc biệt nguy hiểm đối với vi khuẩn *A. schubertii* do vi khuẩn này có khả năng gây bệnh trên người (Hickman-Brenner *et al.*, 1988).

**3.3 Kết quả xác định MIC của thuốc kháng sinh đến vi khuẩn**

Kết quả xác định MIC của 4 loại kháng sinh gồm 2 loại kháng sinh nhạy cao (colistin, doxycycline) và 2 loại kháng sinh kháng cao (amoxicillin, erythromycin) đến vi khuẩn *A. schubertii* được trình bày qua Bảng 3.

kháng ở mức độ rất cao với amoxicillin. Tương tự kết quả của Orozval *et al.* (2008) tất cả các chủng *Aeromonas* spp. kháng ampicillin (100%) (MIC > 16 mg/L), penicilline (100%), amoxicillin (96,1%, MIC > 8 mg/L) và penicilline G (95%, MIC > 1 mg/L). Kết quả cho thấy nhóm kháng sinh β-lactam không nên sử dụng trong điều trị bệnh đốm trắng nội tạng do *A. schubertii* gây ra.

Từ kết quả kháng sinh đồ và xác định MIC cho thấy, có thể sử dụng các kháng sinh doxycycline và colistin để điều trị bệnh do *A. schubertii* gây ra trên cá lóc (*Channa striata*). Tuy nhiên, colistin là kháng sinh thuộc nhóm polymyxin, một chọn lựa thay thế quan trọng trong điều trị bệnh gây ra bởi các vi khuẩn Gram âm đa kháng nhưng sau vài năm được đưa vào sử dụng đã có nhiều báo cáo về độc tính đối

với thận, thần kinh ở người và động vật trên cạn. Mặc dù chưa có nhiều nghiên cứu độc tính của colistin đối với động vật thủy sản nhưng cần thận trọng khi sử dụng kháng sinh này để điều trị bệnh đốm trắng nội tạng gây ra do vi khuẩn *A. schubertii*.

Bên cạnh đó, vi khuẩn *A. schubertii* có khả năng kháng với nhiều loại thuốc kháng sinh, ảnh hưởng đến hiệu quả việc điều trị bệnh do vi khuẩn gây bệnh trên cá lóc. Vì vậy, việc sử dụng thuốc kháng sinh trong việc trị bệnh cần phải thận trọng để đạt hiệu quả cao và bảo vệ sức khỏe cho con người.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Kết quả kháng sinh đồ cho thấy 24 chủng vi khuẩn *A. schubertii* trong nghiên cứu đã giảm tính nhạy với nhiều loại kháng sinh được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản. Vi khuẩn *A. schubertii* còn nhạy tương đối cao với các kháng sinh doxycycline, colistin, ceftazidime và chloramfenicol; kháng khá cao với oxytetracycline, florfenicol, erythromycin, novobiocin, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, flumequine và cefalexin; kháng hoàn toàn với ampicillin, amoxicillin và rifampicin.

Theo kết quả xác định MIC, 4 chủng *A. schubertii* đều nhạy với colistin ở mức giá trị MIC thấp ( $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ) và nhạy với doxycycline ở mức MIC từ 4-8  $\mu\text{g/mL}$ , kháng với erythromycin và amoxicillin ở giá trị MIC lần lượt là 8  $\mu\text{g/mL}$  và 512  $\mu\text{g/mL}$ .

### 4.2 Đề xuất

Cần tiếp tục thử nghiệm sử dụng một số loại thuốc kháng sinh có kết quả tốt trong nghiên cứu trong điều kiện ao nuôi thực tế.

Vi khuẩn *A. schubertii* phân lập trên cá lóc bị đốm trắng nội tạng đã kháng với nhiều loại kháng sinh, do đó cần có những nghiên cứu về cơ chế kháng thuốc của nhóm vi khuẩn này nhằm tìm ra các biện pháp phòng trị bệnh hiệu quả hơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alderman, D.J. and Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*. 33(2): 139-155.

Brown, T.K.M., 2000. *Applied fish pharmacology*. Kluwer Academic publishers. Dordrecht, Boston, 309 pages.

Buller, B.N., 2004. *Bacteria from fish and other aquatic animals-a practical identification manual*. 244 pages.

Carnahan, A.M., Marii, M.A., Fanning, G.R., Pass, M.A. and Joseph, S.W., 1989. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 27(8): 1826-1830.

Carnahan, A.M., Fanning, G.R. and Joseph, S.W., 1991. *Aeromonas jandaei* (formerly *genospecies DNA group 9 A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(3): 560-564.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014. *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals, Approved Guideline VET-03A*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, NJ. 26 (03).

Chen, Y.F., Liang, R.S., Zhuo, X.L., Wu, X.T. and Zou, J.X., 2012. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède). *Journal of Fish Diseases*. 35: 421-430.

Chien, W.K., Wu, M.H., Chang, C.T., Yan, J.J. and Wu, J.J., 1998. Inducible beta-lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: Therapeutic Challenge for Antimicrobial Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(11): 3188-3192.

Dung, T.T., Haesebrouck, F., Tuan, N.A., Sorgeloos, P., Baelen, M. and Decostere, A., 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolate from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microbial Drug Resistance*. 14: 311-316.

Dung, T.T., Haesebrouck, F., Sorgeloos, P., Tuan, N.A. and Pasmans, F., 2009. IncK plasmid-mediated tetracycline resistance in *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish in Vietnam. *Aquaculture*. 295: 157-159.

Dung, T.T., Trung, N.B., Khoi, L.M., Chau, D.T.M., Cheng, C.J., Le, Q.B., and Haibin, H., 2018. Identification and characteristics of agent causing internal white spot disease in snakehead fish *Channa striata* in commercial farm at the Mekong Delta, Vietnam. *Asian-Pacific Aquaculture, Taiwan April 24-26*.

Frerichs, N.G and Millar, S.D., 1993. *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Pisces Press. U.K. 55 pages.

Hickman-Brenner, F.W., Fanning, G.R., Arduino, M.J., Brenner, D.J. and Farmer, J.J., 1988. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 26: 1561-1564.

Ho, S.P., Hsu, T.Y., Chen, M.H. and Wang, W.S., 2000. Antibacterial effects of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *The Journal of Veterinary Medical Science* 62: 479-485.

- Laith, A.R. and Najiah, M., 2013. *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial Susceptibility and Histopathology of Isolates from Diseased Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture Research and Development*. 5: 215-222.
- Liu, J.Y. and Li, A.H., 2012. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *Journal of Fish Diseases*. 35: 335-342.
- Nikaido, H., 2009. Multidrug resistance bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 78: 119-146.
- Orozoval, P., Chikova, V., Kolarova, V., Nenova, R., Konovska, M. and Najdenskil, H., 2008. Antibiotic resistance of potentially pathogenic *Aeromonas* strains. *Trakia journal of sciences*. 6: 71-77.
- Prescott, J.F., Baggot, J.D. and Walker, R.D., 2000. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Iowa State University Press/Ames. 795 pages.
- Phạm Thanh Hương, Nguyễn Thiện Nam, Từ Thanh Dung và Nguyễn Anh Tuấn, 2011. Sự kháng kháng sinh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản lần 4*: 250-261.
- Quách Văn Cao Thi, Từ Thanh Dung và Đặng Phạm Hòa Hiệp, 2014. 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. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*. 2: 7-14.
- Reimschuessel, R. and Miller, R.A., 2006. Antimicrobial drug use in aquaculture. In: Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, D., Walker, R.D. and Dowling, P.M. (Eds). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, pp. 241-248.
- Roberts, M.C., 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. *FEMS Microbial Reviews*. 19: 1-24.
- Ruangpan, L. and Eleonor, T.A., 2004. *Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity test for bacteria isolated from aquatic animals and environment*. Southeast Asian fisheries development center, Aquaculture department. Philippines. 50 pages.
- Serrano, P.H., 2005. *Responsible use of antibiotics in aquaculture*, FAO fisheries technical paper. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Tổng cục Thống kê, 2016. Sản lượng cá nuôi phân theo địa phương, ngày truy cập 20/11/2017. Địa chỉ <http://www.gso.gov.vn/default.aspx?tabid=717>.
- Yano, Y., Hamano, K., Tsutsui, I., Aue-Umneoy, D., Ban, M. and Satomi, M., 2015. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Food Microbiol*. 47: 21-27.
- Yu, H., He, Z., Yan, Y., Yang, G., Hu, J. and Zhou, M., 2009. Identification of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas schubertii* from doctor fish and antibiotic sensitivity. *Chinese Journal of Animal Health Inspection*. 26(7): 37-39.