

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM KHÁNG KHÁNG SINH CỦA *Edwardsiella ictaluri* GÂY BỆNH GAN THẬN MỦ TRÊN CÁ TRA, *Pangasius hypophthalmus*, NUÔI THÂM CANH

ISOLATION AND INVESTGATION FOR ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *Edwardsiella ictaluri* FROM INTENSIVELY FARMED TRA CATFISH, *Pangasius Hypophthalmus*

Nguyễn Hữu Thịnh (*), Trương Thanh Loan (**)

(*) Khoa Thủy Sản, Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh;

E-mail: thinhfishery@yahoo.com

(**) Bộ môn Công Nghệ Sinh Học, Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

ABSTRACT

Bacillary necrosis occurs very often in intensive farming of Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) in the Mekong delta. Causative bacterium was identified as *Edwardsiella ictaluri*. Diseased fish with typical focal necrosis in the liver, kidney and spleen were sampled from 17 fish farms in Can Tho, Dong Thap, Vinh Long, An Giang and Ben Tre Province for bacterial isolation and identification. Among 97 isolates, 47 (48 %) were identified as *E. ictaluri*. Bacterial strains were tested for the resistance to six kinds of antibiotic as Sulfamethoxazole/Trimethoprim (SXT), Amoxicillin (AML), Doxycycline (DX), colistin (CLT), Oxytetracycline (OT) and Florfenicol (FFC). All 47 strains resisted to SXT and 46 (97,8 %) to CLT. Numbers (percentages) of strains showed different levels of resistantce to FFC, AML, OT and DX which were 20 (42,5 %), 19 (40,4 %), 15 (31,9 %) and 13 (27,7 %), respectively. The results of this study suggest that appropriate use of antibiotic for treatment of the disease should rely on tested antibiograms to isolates.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Edwardsiella ictaluri, trực khuẩn Gram âm, là nguyên nhân gây bệnh viêm ruột mhiễm khuẩn huyết trên cá nheo, *Ictalurus punctatus*, tại Hoa Kỳ. Vi khuẩn lần đầu tiên được phân lập và định danh vào năm 1976 (Hawke, 1979). Từ đó đến nay, vi khuẩn luôn được xem là nguyên nhân gây bệnh với tỷ lệ chết rất cao trên cá nheo nuôi công nghiệp.

Nghề nuôi cá tra, *Pangasius hypophthalmus*, thâm canh tại nước ta phát triển rất nhanh trong 10 năm trở lại đây. Sản lượng cá tra nuôi ước đạt 800 ngàn tấn vào năm 2006. Song song với sự phát triển của nghề nuôi, vấn đề dịch bệnh trên cá tra nuôi ngày càng trở nên trầm trọng. Một trong những bệnh quan trọng, nông dân nuôi cá tra thường gọi, là bệnh gan thận mủ gây thiệt hại rất lớn cho nghề nuôi. Cao điểm dịch bệnh thường xảy ra từ tháng 9 đến tháng 12 hằng năm vào thời kỳ thời tiết chuyển mát. Thiệt hại do bệnh cũng rất

lớn, tỷ lệ cá chết có thể lên đến 90 % trên cá tra giống và 50 % trên cá nuôi thương phẩm.

Fugerson và ctv (2001) đã có công trình nghiên cứu đầu tiên mô tả về bệnh mủ gan trên cá tra nuôi tại Việt Nam. Tuy nhiên, nguyên nhân gây bệnh chỉ được xác định sau đó một năm chính do vi khuẩn *E. ictaluri* (Crumlish và ctv, 2002).

Khi bệnh xảy ra trong ao, nông dân thường xử dụng sản phẩm thuốc thú y – thủy sản chứa kháng sinh hoặc kháng sinh nguyên liệu để điều trị cho cá. Việc sử dụng kháng sinh còn tùy tiện, không đúng về liều lượng và liệu trình điều trị. Nông dân cũng thường dùng kháng sinh liều thấp để phòng bệnh cho cá. Các nguyên nhân này đưa đến hiệu quả điều trị của kháng sinh ngày càng giảm theo thời gian sử dụng. Hơn nữa, việc hình thành các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đề kháng kháng sinh trở thành trở ngại chính trong điều trị và hạn chế tác hại của dịch bệnh.

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm bước đầu khảo sát tính đề kháng của *E. ictaluri* đối với các loại kháng sinh sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh trên cá tra nuôi thâm canh tại Đồng bằng sông Cửu Long.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 4 đến tháng 6 năm 2007. Cá tra bệnh trong ao nuôi thâm canh được thu từ Cần Thơ, Đồng Tháp, Vĩnh Long, An Giang và Bến Tre.

Mẫu cá bệnh: 55 mẫu cá tra bệnh, trọng lượng 0,1 – 0,5 kg, có biểu hiện lơ đờ, bỏ ăn trong ao nuôi thương phẩm được thu ngẫu nhiên. Tiến hành ghi nhận triệu chứng và mổ khám bệnh tích.

Phân lập vi khuẩn: Phân lập vi khuẩn bằng cách cấy ria từ các mẫu gan, thận lách trên môi trường Brain Heart Infusion Agar (BHIA), ủ ở 30°C trong 48 h. 97 khuẩn lạc nghi ngờ được cấy chuyển sang cùng loại môi trường và ủ trong điều kiện tương tự.

Định danh vi khuẩn: Chủng vi khuẩn phân lập thuần được nhuộm Gram, quan sát hình thái và thử đặc điểm sinh hóa bằng bộ thử nghiệm 14 phản ứng sinh hóa định danh trực khuẩn Gram âm IDS 14GNR (Công ty Nam Khoa). Cách tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất với thay đổi nhỏ là ủ bộ phản ứng ở 30°C và đọc kết quả sau 24 h. Mã số định danh của *E. ictaluri* là 60001.

Kháng sinh đồ: Áp dụng phương pháp kháng sinh khuếch tán trên mặt thạch. Các đĩa kháng sinh sử dụng gồm Sulphamethoxazole/Trimethoprim (SXT), Amoxicillin (AML), Doxycycline (DX), colistin (CLT), Oxytetracyclin (OT) và Florfenicol (FFC). Hàm lượng kháng sinh tương ứng /đĩa và mức độ đánh giá trình bày trong bảng 1.

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn trong nước muối sinh lý ở độ đục tương đương với ống chuẩn McFarland 0.5. Trang đều 0,1 ml huyền phù vi khuẩn trên mặt đĩa thạch Muller-Hinton và để khô tự nhiên, đặt đĩa kháng sinh, sau đó ủ ở nhiệt độ 30°C trong 48h. Đo đường kính vòng vô khuẩn bằng thước đo với sai số 1 mm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Triệu chứng và bệnh tích của cá bệnh

Cá bệnh có biểu hiện kém ăn hoặc bỏ ăn. Bụng hơi trương to, xuất huyết điểm quanh vùng miệng. Một số cá có mắt lồi, đục một hay cả hai bên mắt.

Giải phẫu quan sát nội quan cho thấy trên bề mặt gan, thận, lách có những đốm hoại tử trắng với đường kính 0,5 – 2 mm. Đây là bệnh tích điển hình của cá tra bệnh gan thận mủ. Cá bệnh nặng có tích dịch mủ trắng trong xoang bụng. Bệnh tích quan sát được trên cá tương tự với kết quả mô tả của Ferguson và ctv, 2001.

Phân lập và định danh vi khuẩn

Đa số đĩa cấy từ gan thận, lách xuất hiện khuẩn lạc đồng nhất về hình dạng và màu sắc. Khuẩn lạc sau 24 h ủ trong suốt và nhỏ li ti. Sau 48 h ủ, khuẩn lạc phát triển rõ hơn, có màu trắng hơi trong, lồi, tròn với đường kính 0,5 – 2 mm (Hình 1). Kết quả nhuộm Gram cho thấy đa số trực khuẩn ngắn đứng riêng lẻ, một số tạo thành chuỗi 2 – 3 tế bào và bắt màu hồng nhạt.

Kết quả định danh vi khuẩn bằng kit IDS 14GNR (Bảng 2) cho thấy 47 trong số 97 chủng vi khuẩn được định danh là *Edwardsiella ictaluri*. Vi khuẩn có đặc điểm sinh hóa cơ bản như oxidase âm tính, lên men glucose, H₂S và Indol âm tính (Hawke và ctv, 1998). Kết quả khảo sát phản ứng sinh hóa bằng kit IDS 14GNR hoàn toàn đồng nhất với kết quả định danh bằng kit API 20E đối với *E. ictaluri* phân lập từ cá tra (*P. hypophthalmus*) (Crumlish và ctv, 2002) và cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) (Keskin và ctv, 2004). Điều này khẳng định kit IDS 14GNR có thể sử dụng định danh *E. ictaluri* phân lập từ cá tra ở Việt Nam.

Bảng 1. Các loại đĩa kháng sinh được sử dụng trong thử nghiệm

Đĩa kháng sinh	Ký hiệu	Hàm lượng (µg/đĩa)	Kháng (mm)
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	SXT	23,75/1,25	≤10
Amoxicillin	AML	10	≤13
Doxycycline	DX	30	≤12
Colistin	CLT	10	≤8
Oxytetracycline	OT	30	≤14
Florfenicol	FFC	30	≤11



Hình 1. Khuẩn lạc *Edwardsiella ictaluri* trên thạch BHIA ủ ở 30 °C sau 48 h

Bảng 2. Kết quả định danh *E. ictaluri* bằng kit IDS 14GNR

Phản ứng sinh hóa	<i>E. ictaluri</i>	
	Kết quả	Quan sát
Catalase	+	Sủi bọt
Oxidase	-	Không đổi màu
Lên men glucose	+	Vàng
Khử Nitrate	+	Đỏ cánh sen
ONPG	-	Không màu
Urease	-	Đỏ nhạt
PAD	-	Vàng lợt
Citrate	-	Vàng
Thủy giải esculin	-	Không đen
Sinh H ₂ S	-	Không đen
Indol	-	Vòng vàng
Voges-Poskauer	-	Vàng nhạt
Malonate	-	Vàng
LDC	+	Khuẩn lạc mọc, môi trường có màu tím
Di động	-	Khuẩn lạc mọc không nhòe đường cấy

Bảng 3. Số mẫu vi khuẩn *E. ictaluri* được phân lập ở mỗi tỉnh

Tỉnh	Số trại thu mẫu	Số chủng vi khuẩn phân lập	<i>E. ictaluri</i>	
			Tổng cộng	Tỷ lệ (%)
Cần Thơ	6	17	5	29,41
Đồng Tháp	4	12	0	0,00
Vĩnh Long	2	21	15	71,42
An Giang	3	34	15	44,11
Bến Tre	2	13	12	92,30
Tổng cộng	17	97	47	48,45

Trong các mẫu cá bệnh, chỉ có cá thu từ Đồng Tháp chúng tôi không phân lập được *E. ictaluri*. Ở các địa bàn thu mẫu cá bệnh còn lại, tỷ lệ *E. ictaluri* định danh được khá cao, lần lượt là 29,41, 71,42, 44,12 và 92,31 % tại Cần Thơ, Vĩnh Long, An Giang và Bến Tre (Bảng 3). Điều này chứng tỏ tại thời điểm thu mẫu tháng 4 - 6, bệnh gan thận mũ đang lưu hành tại bốn tỉnh trên. Theo kinh nghiệm của nông dân nuôi cá tra, bệnh gan thận mũ xảy ra phổ biến trong các tháng thời tiết chuyển mát (tháng 9 - 12). Trong khoảng thời gian này nhiệt độ nước có thể giảm thấp đến 26 - 28 °C nhất là vào ban đêm. Các tháng còn lại trong năm bệnh chỉ xuất hiện rải rác. Theo Hawke và ctv (1998), *E. ictaluri* có khả năng gây bệnh cao nhất cho cá nheo (*Ictalurus punctatus*) nuôi ở Hoa Kỳ khi nhiệt độ nước trong khoảng 20 - 28 °C. Như vậy, có khả năng *E. ictaluri* gây bệnh trên cá tra tại Việt Nam có đặc điểm gây bệnh trong điều kiện nhiệt độ nước mát tương tự như trên cá nheo. Kết quả phân lập vi khuẩn từ cá bệnh trong nghiên cứu này cho thấy bệnh cũng đã xuất hiện thường xuyên trong

tháng thời tiết nóng (tháng 4, 5 và 6). Nguyên nhân có thể do diện tích nuôi thâm canh cá tra tăng nhanh trong những năm gần đây đi đôi với ô nhiễm môi trường và mầm bệnh tích tụ trong khu vực nuôi nên bệnh cũng đã xuất hiện trong những tháng nóng mặc dù mức độ thiệt hại có thấp hơn.

Đối với mẫu cá thu tại Đồng Tháp, chúng tôi không phân lập được *E. ictaluri*. Nguyên nhân có thể do bệnh trong thời điểm thu mẫu bệnh không diễn ra ở mức độ cấp tính nên các vi khuẩn cơ hội xâm nhập vào cơ thể cá phát triển thành khuẩn lạc nhanh hơn, che lấp khuẩn lạc của vi khuẩn mục tiêu trên môi trường thạch.

Kết quả kháng sinh đồ

Các loại kháng sinh được lựa chọn dựa vào thực tế sử dụng thuốc kháng sinh của người nuôi cá tra. Kết quả khảo sát tính đề kháng kháng sinh của 47 chủng *E. ictaluri* được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tính đề kháng kháng sinh của *E. ictaluri*

Loại kháng sinh	Ký hiệu	Đề kháng	
		Số lượng	(%)
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	SXT	47	100
Amoxicillin	AML	19	40,4
Doxycycline	DX	13	27,7
Colistin	CLT	46	97,9
Oxytetracycline	OT	15	31,9
Florfenicol	FFC	20	42,5

Bảng 5. Số lượng và tỷ lệ chủng *E. ictaluri* kháng mỗi loại kháng sinh tại các địa phương

Tỉnh	SXT		AML		DX		CLT		OT		FFC	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Cần Thơ	5	10,6	0	0,0	2	15,4	5	10,9	1	6,7	1	5,0
Vĩnh Long	15	31,9	4	21,1	5	38,5	13	28,3	6	40,0	9	45,0
An Giang	15	31,9	7	36,8	5	38,5	14	30,4	5	33,3	6	30,0
Bến Tre	12	25,6	8	42,1	1	7,6	14	30,4	3	20,0	4	20,0
Tổng cộng	47	100	19	100	13	100	46	100	15	100	20	100

Bảng 6. Tính đa kháng của vi khuẩn đối với các tổ hợp kháng sinh

Thứ tự	Tổ hợp kháng sinh	Số chủng
1	SXT, FFC, AML, DX, CLT, OT	6
2	SXT, FFC, AML, CLT, OT	1
3	SXT, FFC, DX, CLT, OT	4
4	SXT, FFC, AML, DX, CLT	1
5	SXT, DX, CLT, OT	1
6	SXT, FFC, CLT, OT	2
7	SXT, FFC, AML, CLT	2
8	SXT, AML, CLT, OT	2
9	SXT, DX, CLT	1
10	SXT, AML, CLT	3
11	SXT, CLT, OT	1
12	SXT, AML, CLT	4
13	SXT, FFC, CLT	3
14	SXT, CLT	15
Tổng cộng		46

47 (100%) chủng *E. ictaluri* phân lập được đều đề kháng với SXT. Tương tự đối với CLT, tính đề kháng của vi khuẩn gần như tuyệt đối (46/47 chủng chiếm 97.9%). Như vậy, hai loại kháng sinh này đã không có tác dụng trong trị bệnh mụn gan. Trong thực tế, người dân vẫn còn dùng hai loại kháng sinh này ở dạng kết hợp với các loại khác. Theo Waltman và Shotts (1984), tỷ lệ chủng *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo ở Mỹ kháng với colistin là 95.3%, tuy nhiên 100% chủng lại nhạy cảm với SXT. Sự khác nhau về tính đề kháng với SXT giữa các

chủng *E. ictaluri* phân lập ở Việt Nam và Mỹ có thể do kháng sinh phối hợp này được sử dụng điều trị cá bệnh khá phổ biến và không đúng cách trong nước trong nhiều năm qua.

Đối với các loại kháng sinh còn lại *E. ictaluri* đề kháng một phần với tỷ lệ thay đổi từ 27,7 đến 42,5%. Crumlish và ctv (2002) ghi nhận các chủng *E. ictaluri* phân lập trên cá tra ở Việt Nam nhạy cảm hoàn toàn với AML và FFC. *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo ở Mỹ cũng hoàn toàn nhạy cảm với

FFC (Anissa và ctv, 2003). Sau thời gian phát triển nghề nuôi và dịch bệnh thường xuyên xảy ra, nông dân đã sử dụng nhiều loại kháng sinh. Kết quả đã hình thành *E. ictaluri* kháng AML (40,4 %) và FFC (42,5 %) cho đến thời điểm hiện tại.

Thông qua bảng dưới đây ta có thể hiểu hơn về tác dụng của mỗi loại kháng sinh đối với cá tra nuôi ở từng tỉnh.

Kết quả từ bảng 5 cho thấy số lượng và tỷ lệ các chủng vi khuẩn đề kháng tại các địa phương có chênh lệch khá lớn. Một trong những kháng sinh sử dụng khá phổ biến hiện nay trong điều trị bệnh gan thận là FFC. Tỷ lệ chủng kháng FFC tại Cần Thơ và Vĩnh Long lần lượt là 5,0 và 45 % trong tổng số 20 chủng kháng FFC tại 4 tỉnh. Vì vậy, việc lựa chọn kháng sinh có khả năng điều trị cao nhất cần dựa trên kết quả kháng sinh đồ cho các chủng phân lập tại địa phương. Qua đó, sử dụng đúng loại kháng sinh và đúng liệu trình sẽ giảm thấp phí cũng như nâng cao hiệu quả điều trị bệnh, hạn chế sự gia tăng vi khuẩn kháng thuốc.

Khảo sát tính đa kháng của *E. ictaluri*, trong 47 chủng đã có 46 chủng đề kháng với hai loại kháng sinh trở lên (Bảng 6). Như vậy *E. ictaluri* phân lập đã kháng với hầu hết các loại kháng sinh sử dụng. Tình trạng phổ biến hiện nay là nông dân thường kết hợp nhiều loại kháng sinh điều trị cùng lúc. Thêm vào đó, trước đây nhiều thuốc kháng sinh bán trên thị trường kết hợp hơn hai loại kháng sinh trong cùng một sản phẩm cũng có thể là một nguyên nhân hình thành vi khuẩn đa kháng.

KẾT LUẬN

Bệnh gan thận mủ trên cá tra nuôi thâm canh cũng có thể thường xuyên xảy ra trong thời điểm thời tiết mùa nóng. Vi khuẩn phân lập từ cá bệnh được định danh là *E. ictaluri* bằng kit IDS 14GNR. Hầu hết tất cả các chủng *E. ictaluri* đều biểu hiện tính đề kháng và đa kháng với các loại kháng sinh thường sử dụng trong điều trị bệnh, tuy nhiên số lượng và tỷ lệ chủng đề kháng khá khác nhau theo địa phương nơi bệnh xảy ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anissa McG., Gaunt P., Santucci T., Simmons R. and Endris R., 2003. *In vitro* evaluation of susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to flofenicol. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**: 576 – 579.
- Crumlish M., Dung T.T., Turnbull J.F., Ngoc N.T.N., and Ferguson H.W., 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.* **25**: 733 – 736.
- Ferguson H.W., Turnbull J.F., Shin A., Thompson K., Dung T.T., and Crumlish M., 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.* **24**: 509 – 513.
- Hawke J.P., 1979. A bacterium associated with pond cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish. Res. Board Can.* **36**: 1508 – 1512.
- Hawke J.P., Durborow R.M., Thune R.L., and Camus A.C., 1998. ESC – Enteric septicemia of catfish. *Southern Regional Aquaculture Center*. No. **47**.
- Keskin O., Secer S., Izgur M., Turkyilmaz S. and Mkakosya R.S., 2004. *Edwardsiella ictaluri* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Tur. J. Vet. Anim. Sci.* **28**: 649 – 653
- Waltman W.D. and Shotts E.B. 1986. Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*. *J. Wildlife Dis.* **22**(2): 173 -177.