

## MỨC ĐỘ NHẠY CẢM KHÁNG SINH CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *HAEMOPHILUS PARASUIS* PHÂN LẬP TỪ HEO

*Đặng Thị Xuân Thiệp, Bùi Nguyễn Hoàng Trang  
Lê Thanh Tùng, Lâm Ánh Tuyết, Võ Thị Trà An  
Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM*

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá mức độ nhạy cảm kháng sinh của các vi khuẩn *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) phân lập từ mẫu dịch mũi và phổi heo có biểu hiện bệnh hô hấp. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration - MIC) được thực hiện để đánh giá mức độ nhạy cảm kháng sinh của 13 chủng vi khuẩn *H. parasuis* với 13 kháng sinh thử nghiệm theo hướng dẫn của CLSI (2018). Tính đến thời điểm hiện tại, theo tham khảo từ các Tạp chí chuyên ngành thì đây là công bố trong nước đầu tiên trong việc áp dụng phương pháp MIC để đánh giá sự nhạy cảm của các vi khuẩn gây bệnh hô hấp trên heo nói chung và vi khuẩn *H. parasuis* nói riêng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hầu hết các kháng sinh đều có các chỉ số MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> đối với vi khuẩn *H. parasuis*, cao hơn so với điểm dừng của nồng độ tối thiểu ức chế vi khuẩn (MIC breakpoint) theo CLSI. Các chủng *H. parasuis* đã phân lập nhạy cảm cao nhất với các kháng sinh tylosin, tilmicosin, trimethoprim/sulfamethoxazole với tỷ lệ cao hơn 60%. Vi khuẩn có tỷ lệ nhạy cảm với các kháng sinh còn lại là 15% cho đến dưới 50%. Các chủng *H. parasuis* đề kháng mạnh với amoxicillin, gentamicin, tetracycline và ceftiofur. Kết quả này cho thấy vi khuẩn *H. parasuis* vẫn còn nhạy cảm với các kháng sinh thử nghiệm nhưng ở mức thấp và cần thường xuyên đánh giá mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn này để có liệu pháp điều trị hiệu quả.

*Từ khoá: H. parasuis, nhạy cảm, kháng sinh, heo, MIC.*

### Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* isolated from swine

*Dang Thi Xuan Thiep, Bui Nguyen Hoang Trang,  
Le Thanh Tung, Lam Anh Tuyen, Vo Thi Tra An*

### SUMMARY

This study was conducted to determine the antimicrobial susceptibility of *H. parasuis* isolated from the nasal fluid and lung samples of pigs with respiratory disease symptoms. The minimum inhibitory concentration (MIC) was performed to evaluate the antimicrobial susceptibility of 13 *H. parasuis* isolates with 13 tested antibiotics according to CLSI guidelines (2018). Up to the present time, according to the reference of the professional journals, this was the first publication in Viet Nam on applying the MIC method to evaluate the antibiotic susceptibility of respiratory pathogens in pigs in general and *H. parasuis* in particular.

The studied results showed that most of antibiotics had MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for *H. parasuis* isolates higher than the break point of the minimum bacterial inhibition concentration (MIC breakpoint) according to CLSI. Most of *H. parasuis* isolates were susceptible with tylosin, tilmicosin, trimethoprim/sulfamethoxazole (60%). *H. parasuis* isolates were susceptible with other antibiotics from 15% to less than 50%. *H. parasuis* isolates were strongly resistant to amoxicillin, gentamicin, tetracycline and ceftiofur. This result showed that *H. parasuis* isolates were still susceptible with the tested antibiotics but at low levels and it is necessary to regularly determine the antibiotic susceptibility of this bacteria for effective treatment.

*Keywords: H. parasuis, susceptibility, antimicrobial, swine, MIC.*

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Haemophilus parasuis* là một vi khuẩn Gram âm, thường trú ở đường hô hấp trên của heo khỏe mạnh. Vi khuẩn này là căn nguyên của bệnh Glässer, một bệnh hệ thống với đặc trưng là viêm đa khớp, viêm đa cơ và viêm màng não, tỷ lệ bệnh và tử vong cao ở heo con. Bệnh Glässer được xem là một trong những nguyên nhân quan trọng gây thiệt hại kinh tế trong ngành chăn nuôi heo (Oliver và ctv, 2004). Mặc dù liệu pháp kháng khuẩn sẵn sàng để phòng ngừa và kiểm soát nhiễm trùng trên lâm sàng nhưng tình trạng kháng kháng sinh đang gia tăng là mối lo ngại về sức khỏe toàn cầu đối với cả người và động vật. Do đó, các nghiên cứu xác định mức độ nhạy cảm của vi khuẩn này với các kháng sinh là rất quan trọng trong liệu pháp điều trị bệnh do vi khuẩn này gây ra. Kết quả nghiên cứu tại một số nước cho thấy *H. parasuis* có sự giảm mức độ nhạy cảm với các kháng sinh thử nghiệm (Aarestrup và ctv, 2004; de la Fuente và ctv, 2007; Zhou và ctv, 2010). Tại Việt Nam, nghiên cứu của Đinh Xuân Phát và ctv (2018) cho thấy các gốc *H. parasuis* có tỷ lệ nhạy cảm thấp nhất với các kháng sinh như tylosin, tilmicosin với tỷ lệ dưới 20%; tỷ lệ nhạy cảm với amoxicillin, florfenicol, ceftiofur, doxycycline là dưới 50%. Các nghiên cứu đều cho thấy các *H. parasuis* phân lập được ở các khu vực khác nhau đều có sự giảm nhạy cảm với các kháng sinh thử nghiệm. Do đó, cần tiếp tục các nghiên cứu để đánh giá chính xác hơn mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn này bằng nhiều phương pháp khác nhau ở những thời điểm khác nhau. Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện nhằm đánh giá mức độ mẫn cảm kháng sinh của các *H. parasuis* phân lập được bằng phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần quan trọng trong việc đánh giá mức độ nhạy cảm của *H. parasuis*, đồng thời xác định liệu pháp kháng sinh phù hợp trong điều trị bệnh do vi khuẩn này tại các khu vực đã lấy mẫu.

## II. NỘI DUNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung

Xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh của 13 gốc vi khuẩn *H. parasuis* đã phân lập với các kháng sinh thử nghiệm bằng phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu theo hướng dẫn của CLSI (2018).

### 2.2. Nguyên, vật liệu

#### 2.2.1. Các gốc *H. parasuis*

Tổng số 13 gốc vi khuẩn *H. parasuis* đã được phân lập từ 50 mẫu phổi và 80 mẫu dịch mũi heo có biểu hiện bệnh hô hấp thuộc một đề tài nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Đặng Thị Xuân Thiệp và ctv, 2019).

Quy trình phân lập các gốc vi khuẩn này được thực hiện theo công bố của Zhao và ctv (2010) và quy trình phân lập vi khuẩn gây bệnh hô hấp tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm về Vi sinh nông nghiệp, Khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông nghiệp Huazhong, Trung Quốc. Môi trường TSA (Tryptose soy agar; Oxoid) bổ sung 5% huyết thanh bò (Fetal Bovine Serum, Gibco) và 10 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD, Merck) được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Các đĩa nuôi cấy vi khuẩn được ủ hiếu khí ở 37°C trong 24-48 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, việc định danh các vi khuẩn dựa trên hình thái khuẩn lạc, kết quả nhuộm Gram, phản ứng catalase và PCR.

#### 2.2.2. Môi trường và các loại kháng sinh

Môi trường CAMHB (Cation adjusted Muller Hinton Broth) (Oxoid, Anh) được sử dụng để thực hiện phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu nhằm đánh giá mức độ mẫn cảm kháng sinh của các vi khuẩn đã phân lập được.

13 kháng sinh sẽ thực hiện MIC bao gồm amoxicillin (AMX), ceftiofur (CTF), enrofloxacin (ENO), tilmicosin (TIL), florfenicol (FFC), tiamulin (TIA), trimethoprim/ sulfamethoxazole (SXT) được sản xuất bởi công ty Supelco (Mỹ); tylosin (TYL), tulathromycin (TUL), tetracycline (TET) được sản xuất bởi công ty Sigma Aldrich (Mỹ) và được cung cấp bởi công ty TNHH Thiết bị khoa học sinh hóa Vina, quận Phú Nhuận, Tp. HCM; penicillin (PEN), gentamicin (GEN) và lincomycin (LIN) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. HCM (Bộ Y tế).

### 2.3. Phương pháp xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh

Tất cả các kháng sinh được hoà tan và pha loãng bằng các dung môi theo hướng dẫn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

M100-S26 (2016). Mỗi kháng sinh được pha loãng theo dãy nồng độ từ 128- 0,015 µg/ml trong các ống eppendorf để xác định MIC. Các ống đối chứng gồm CI (môi trường CAMHB + huyền dịch vi khuẩn), CM (môi trường CAMHB), CS (môi trường CAMHB + dung dịch kháng sinh được chuẩn bị để kiểm tra sự vô trùng của môi trường). Huyền dịch vi khuẩn được chuẩn bị ở nồng độ

$5 \times 10^5$  CFU/ml trong môi trường NaCl 0,9%. Chúng vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 được sử dụng làm đối chứng. Phương pháp MIC được thực hiện dựa theo hướng dẫn của CLSI (VET08 4th edition, 2018; M07-A10, 2015). Thông số đánh giá mức độ mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn *H. parasuis* theo CLSI (2018) và một số tài liệu tham khảo khác (Prüller và ctv, 2017; Aarestrup, 2004) (bảng 1).

**Bảng 1. Thông số đánh giá mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *H. parasuis***

| Kháng sinh                            | Nhạy cảm | Trung gian | Đề kháng |
|---------------------------------------|----------|------------|----------|
| Amoxicillin                           | ≤1       | 2          | ≥4       |
| Penicillin                            | ≤1       | 2          | ≥4       |
| Ceftiofur                             | ≤2       | -          | ≥8*      |
| Gentamicin                            | <1*      | -          | >2*      |
| Enrofloxacin                          | ≤0,25    | 0,5        | ≥1*      |
| Florfenicol                           | ≤2       | 4          | ≥8*      |
| Tetracycline                          | ≤4       | 4          | ≥16      |
| Tiamulin                              | ≤16      | -          | ≥32*     |
| Tilmicosin                            | <8*      | -          | >32*     |
| Tylosin                               | 2*       | -          | 16*      |
| Lincomycin                            | 4*       | -          | 8*       |
| Tulathromycin                         | ≤16*     | 32*        | ≥64*     |
| Trimethoprim/ Sulfamethoxazole (1:19) | ≤2*      |            | ≥4*      |

Nguồn: CLSI, 2018; \*:Prüller và ctv., 2017; Aarestrup, 2004.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh đối với các gốc *H. parasuis* nghiên cứu

Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh đối với vi khuẩn dựa trên việc đánh giá và so sánh các chỉ số MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> của kháng sinh đối với vi khuẩn và điểm dừng (MIC breakpoint) của kháng sinh đó theo CLSI. Trong đó, MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> là nồng độ ức chế tối thiểu 50% và 90% số gốc vi khuẩn của kháng sinh. MIC breakpoint là nồng độ kháng sinh thấp nhất có thể ức chế/tiêu diệt vi khuẩn theo CLSI.

Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> của các kháng sinh đối của các gốc *H. parasuis* được trình bày trong bảng 2.

Qua bảng 2 chúng tôi nhận thấy hầu hết MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> của các kháng sinh đều cao hơn so với breakpoint. Ngoại trừ, MIC<sub>50</sub> của tilmicosin và trimethoprim/sulfamethoxazole là tương đương breakpoint với các chỉ số lần lượt là 8 µg/ml và 2 µg/ml. Tilmicosin là kháng sinh thuộc nhóm macrolide, là nhóm kháng sinh bán tổng hợp có tác động chủ yếu trên vi khuẩn Gram dương và một số vi khuẩn Gram âm, *Mycoplasma* và vi khuẩn kỵ khí. Các kháng sinh thuộc nhóm này bao gồm erythromycin, tylosin, tilmicosin, tiamulin, tulathromycin, spiramycin,.. MIC breakpoint của các kháng sinh nhóm này đối với vi khuẩn *H. parasuis* là rất cao, dao động trong khoảng từ 16 - 64 µg/ml. MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> của các kháng sinh tiamulin, tilmicosin, tylosin, tulathromycin đối với *H. parasuis* nghiên cứu đều cao hơn MIC breakpoint, ngoại trừ MIC<sub>50</sub> tilmicosin là tương

**Bảng 2. Nồng độ ức chế tối thiểu của các gốc *H. parasuis* (µg/ml) (n=13)**

| Kháng sinh                      | Break points (µg/ml) | 0,015 | 0,03 | 0,06 | 0,12 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16  | 32 | 64 | 128 | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> |
|---------------------------------|----------------------|-------|------|------|------|------|-----|---|---|---|---|-----|----|----|-----|-------------------|-------------------|
| Amoxicillin                     | ≤1                   |       |      |      |      |      |     | 2 |   |   |   | 11* |    |    |     | >16               | >16               |
| Penicillin                      | ≤1                   |       |      | 1    |      | 1    | 3   | 1 | 1 | 1 | 1 | 4*  |    |    |     | 2                 | >16               |
| Ceftiofur                       | ≤2                   |       |      | 1    |      | 1    |     |   |   | 5 | 1 |     | 5* |    |     | 4                 | >16               |
| Gentamicin                      | ≤1                   |       |      |      |      |      |     | 2 |   | 1 | 3 | 1   | 6* |    |     | <16               | >32               |
| Enrofloxacin                    | ≤0,25                |       | 2    | 1    |      |      | 3   | 2 | 1 | 2 | 1 | 1*  |    |    |     | 1                 | 8                 |
| Florfenicol                     | ≤2                   |       |      |      |      |      |     | 3 | 2 | 1 | 1 | 6*  |    |    |     | 8                 | 64                |
| Tetracycline                    | ≤4                   |       |      |      |      | 1    | 1   |   |   | 1 |   | 3   | 7* |    |     | 32                | >32               |
| Tiamulin                        | <16                  |       |      |      | 2    | 1    |     | 2 |   |   |   | 1   | 6* |    |     | 32                | >32               |
| Tilmicosin                      | ≤8                   |       |      |      |      |      | 1   | 3 |   | 3 | 2 |     | 4* |    |     | 8                 | >32               |
| Tylosin                         | 2                    |       |      | 1    | 1    | 1    |     |   | 2 | 1 | 2 | 1   | 4* |    |     | 8                 | >32               |
| Lincomycin                      | 4                    |       |      | 1    |      | 1    | 1   |   |   |   | 1 |     | 9* |    |     | 32                | >32               |
| Tulathromycin                   | ≤16                  |       |      |      |      |      |     |   |   | 2 | 2 | 2   |    | 7* |     | >16               | >64               |
| Trimethoprim / Sulfamethoxazole | ≤2                   |       |      |      |      | 1    | 2   | 1 | 3 | 1 | 1 | 5*  |    |    |     | 2                 | >16               |

Ghi chú: vùng màu trắng là khoảng kháng sinh thử nghiệm, \*: các gốc vi khuẩn có giá trị MIC bằng/nhỏ hơn/lớn hơn nồng độ được kiểm tra

đương với MIC breakpoint. Một số nghiên cứu nước ngoài cho thấy MIC<sub>90</sub> của các kháng sinh này đối với *H. parasuis* thấp hơn so với kết quả thử nghiệm của chúng tôi và dao động trong khoảng 4-16 µg/ml (Nedbalcová và Kučerová, 2013; Aarestrup và ctv, 2004). Một nghiên cứu cho thấy, C<sub>max</sub> được phát hiện trong huyết tương sau khi cho heo sử dụng 1 liều duy nhất 40 mg/kg là 1,67 ± 0,28 µg/ml, thấp hơn MIC đối với *H. parasuis* (khoảng 2 g/ml). Tương tự như các loại thuốc macrolide khác, có thời gian bán hủy dài và có thể dẫn đến nồng độ cao trong mô phổi của heo. Một nghiên cứu khác cho thấy sau khi uống một liều duy nhất 40 mg/kg ở 6 con heo khỏe mạnh, rửa phế quản để định lượng thể tích dịch màng phổi và phương pháp pha loãng urê được sử dụng để xác định nồng độ tilmicosin trong phổi. Giá trị của T<sub>max</sub> và C<sub>max</sub> là 40,80 ± 6,57 giờ và 5,36 ± 0,74 µg/ml và giá trị cao hơn 4 µg/ml từ 6 - 48 giờ sau điều trị và giảm nhanh từ 4,72 µg/ml ở 48 giờ. Kết quả của Zhang và ctv (2017) chỉ ra rằng liều khuyến nghị để kiểm soát viêm phổi do *H. parasuis* ở heo nên là 20-40 mg/kg trọng lượng cơ thể khi dùng liều đơn.

Sự kết hợp của sulfonamid và trimethoprim cũng là một lựa chọn trong điều trị bệnh hô hấp cho động vật dùng làm thực phẩm. Trong nghiên cứu của chúng tôi thì MIC<sub>50</sub> của phức hợp kháng sinh tương đương breakpoint. Nhìn chung, nồng độ ức chế tối thiểu của phức hợp này đối với các gốc vi khuẩn thử nghiệm là cao hơn so với các nghiên cứu khác trên cùng nhóm vi khuẩn (Archambault và ctv, 2012; Oh và ctv, 2018; Prüller và ctv, 2017).

Đáng lưu ý, MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> của amoxicillin, penicillin và ceftiofur đối với các gốc *H. parasuis* đều >16 µg/ml. Các kháng sinh nhóm betalactam đã được sử dụng từ rất lâu trong chăn nuôi, đặc biệt amoxicillin. Đây là một kháng sinh phổ biến trong phòng trị bệnh hô hấp trên heo, có phổ tác động trên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương, thuốc có đặc điểm hấp thu tốt qua đường tiêu hóa, phân bố đến nhiều cơ quan và đặc biệt phân bố tốt đến phổi. Với những ưu điểm trên, kháng sinh này rất được ưu tiên trong phòng trị với bệnh hô hấp trên heo với đường cấp đơn giản bằng cách trộn vào trong thức ăn hoặc pha vào nước uống. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho

thấy nồng độ ức chế tối thiểu đã xác định của các vi khuẩn cao hơn nhiều so với MIC breakpoint (CLSI). Nghiên cứu của Krasucka và Kowalski (2010) về dược động học của amoxicillin cho thấy khi dùng kháng sinh này với liều lượng 28 mg/kg thể trọng thì nồng độ kháng sinh cao nhất trong huyết tương ( $C_{max}$ ) là 2,19  $\mu\text{g/ml}$ , nồng độ này cao từ 2- 4 lần so với MIC breakpoint của amoxicillin theo CLSI (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Các sản phẩm đang lưu hành có chứa amoxicillin dạng bột trộn vào thức ăn có liều khuyến cáo sử dụng phòng trị bệnh cho heo là 20-25mg/kg, liều này tương đương với liều thử nghiệm của nghiên cứu trên. Vậy nên, nếu sử dụng đúng liều khuyến cáo của các sản phẩm này thì MIC của thuốc sẽ cao hơn MIC breakpoint của amoxicillin theo CLSI nhưng sẽ thấp hơn MIC thực tế, do đó sẽ không đạt được hiệu quả phòng trị bệnh. Trên thực tế, nếu không đạt được hiệu quả điều trị như mong muốn thì người chăn nuôi có thể tự ý tăng liều kháng sinh để đạt hiệu quả điều trị bệnh tốt hơn. Điều này làm cho khả năng dung nạp kháng sinh của vi khuẩn tăng lên, đồng nghĩa với việc cần phải dùng một lượng kháng sinh lớn hoặc phối hợp kháng sinh mới có thể tiêu diệt vi khuẩn. Các nghiên cứu khác cho thấy MIC<sub>90</sub> của amoxicillin/clavulanic acid đối với vi khuẩn trên chỉ trung bình từ 0,25-0,5  $\mu\text{g/ml}$  (Aarestrup và ctv, 2004; Oh và ctv, 2018; Prüller và ctv, 2015).

Ceftiofur cũng là kháng sinh nhóm betalactam, phân nhóm cephalosporin thế hệ thứ ba, có phổ kháng khuẩn rộng được chỉ định rộng rãi trong điều trị bệnh đối với người và thú y (WHO, 2013; OIE, 2015). Ở động vật bị viêm phổi, nồng độ albumin huyết tương thường giảm đáng kể, giảm nồng độ ceftiofur trong huyết tương, tăng nồng độ thuốc tự do và nhanh chóng loại thải qua thận (Parra, 2006). Kết quả nghiên cứu về dược động của ceftiofur trên heo khỏe và heo bệnh với liều thử nghiệm tương ứng khuyến cáo sử dụng ceftiofur để điều trị bệnh hô hấp ở heo là 3 - 5 mg/kg trọng lượng cơ thể, tiêm bắp, trong vòng 7 ngày. Kết quả cho thấy mặc dù  $C_{max}$  đo được từ 2 nhóm heo thí nghiệm là trên mức MIC breakpoint của ceftiofur, nhưng  $C_{max}$  của ceftiofur ở nhóm heo khỏe là 12,9  $\mu\text{g/ml}$ , cao hơn so với heo bệnh chỉ ở mức 6,03  $\mu\text{g/ml}$  (Tantituvanont và ctv, 2008). Như vậy, ngoài đặc tính của thuốc thì tình trạng sức khỏe của động vật cũng ảnh hưởng đáng kể đến dược động học của thuốc, từ đó ảnh

hưởng đến hiệu quả điều trị bệnh.

Một điều ngạc nhiên là các kháng sinh mới như tulathromycin là một trong những kháng sinh thuộc nhóm macrolide có MIC breakpoint đối với các vi khuẩn hô hấp trên heo cao nhất so với các kháng sinh cùng nhóm. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy MIC<sub>90</sub> của kháng sinh này đối với *H. parasuis* là 64  $\mu\text{g/ml}$ . Nghiên cứu của Benchaoui và ctv (2004) cho thấy sử dụng tulathromycin ở liều 2,5 mg/kg thì  $C_{max}$  là 0,6 mg/ml sau 30 phút, nhưng sau đó nồng độ  $C_{max}$  trong phổi là 2,8  $\mu\text{g/ml}$  ở 12 giờ sau khi tiêm; 3,4  $\mu\text{g/ml}$  sau 24 giờ. Tulathromycin là kháng sinh phụ thuộc thời gian, thuốc có khả năng phân bố nhiều đến phổi và thải trừ chậm sau một liều duy nhất, đáp ứng các thuộc tính dược động học mong đợi đối với một loại thuốc chống vi trùng được chỉ định để điều trị bệnh hô hấp ở heo. Và như vậy, liều thử nghiệm trong nghiên cứu sẽ cho nồng độ trong máu thấp hơn nồng độ cần thiết để kiểm soát các vi khuẩn trong nghiên cứu.

Từ kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> của các kháng sinh đối với vi khuẩn *H. parasuis*, chúng tôi tiến hành xác định tỷ lệ nhạy cảm, trung gian và đề kháng với kháng sinh của các gốc *H. parasuis*. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

### 3.2. Mức độ miễn cảm kháng sinh của các gốc vi khuẩn *H. parasuis*

Kết quả về tỷ lệ nhạy cảm, trung gian và đề kháng của 13 gốc vi khuẩn *H. parasuis* đã phân lập với các kháng sinh thử nghiệm được trình bày qua bảng 3.

Kết quả từ bảng 3 cho thấy mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các gốc *H. parasuis* là khác nhau giữa các kháng sinh thử nghiệm. Trong đó, các gốc vi khuẩn này không nhạy cảm hoàn toàn với bất cứ kháng sinh nào trong số 13 kháng sinh thử nghiệm. Các gốc *H. parasuis* đã phân lập nhạy cảm cao nhất với các kháng sinh tylosin, tilmicosin, trimethoprim/sulfamethoxazole với tỷ lệ cao hơn 60%. Các kháng sinh còn lại có tỷ lệ vi khuẩn nhạy cảm từ 15% đến dưới 50%. Trong đó, các gốc *H. parasuis* nhạy cảm thấp nhất với amoxicillin, gentamicin, ceftiofur, tetracycline và ceftiofur với cùng tỷ lệ là 15,38%. Trên thực tế,

những kháng sinh có mức độ nhạy cảm thấp với gốc vi khuẩn trong nghiên cứu là những kháng sinh đã và đang được sử dụng rất phổ biến trong phòng trị bệnh trên heo nói chung và bệnh hô hấp trên heo nói riêng. Nghiên cứu của Van Cuong và ctv (2016) cho thấy có đến 57% lượng kháng sinh dùng

cho chăn nuôi heo bao gồm amoxicillin, colistin, tetracycline, lincomycin. Các kháng sinh này cũng được sử dụng rất phổ biến trong phòng trị bệnh hô hấp trên heo tại các quốc gia khác (Van Rennings, 2015; Lekagul, 2019; Vanni và ctv, 2012).

**Bảng 3. Mức độ mẫn cảm kháng sinh của các gốc *H. parasuis* (n = 13)**

| Kháng sinh                        | Nhạy cảm |           | Trung gian |           | Đề kháng |           |
|-----------------------------------|----------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|
|                                   | Số gốc   | Tỷ lệ (%) | Số gốc     | Tỷ lệ (%) | Số gốc   | Tỷ lệ (%) |
| Amoxicillin                       | 2        | 15,38     |            |           | 11       | 84,62     |
| Penicillin                        | 6        | 46,15     | 1          | 7,69      | 6        | 46,15     |
| Ceftiofur                         | 2        | 15,38     |            |           | 11       | 84,62     |
| Gentamicin                        | 2        | 15,38     |            |           | 11       | 84,62     |
| Enrofloxacin                      | 3        | 23,08     | 3          | 23,08     | 7        | 53,85     |
| Florfenicol                       | 5        | 38,46     | 1          | 7,69      | 7        | 53,85     |
| Tetracycline                      | 2        | 15,38     | 1          | 7,69      | 10       | 76,92     |
| Tiamulin                          | 6        | 46,15     |            |           | 7        | 53,85     |
| Tilmicosin                        | 9        | 69,23     |            |           | 4        | 30,77     |
| Tylosin                           | 8        | 61,54     |            |           | 5        | 38,46     |
| Lincomycin                        | 3        | 23,08     |            |           | 10       | 76,92     |
| Tulathromycin                     | 6        | 46,15     |            |           | 7        | 53,85     |
| Trimethoprim/<br>Sulfamethoxazole | 8        | 61,54     |            |           | 5        | 38,46     |

Nghiên cứu của Đinh Xuân Phát và ctv (2018) cho thấy vi khuẩn *H. parasuis* có tỷ lệ nhạy cảm cao nhất với doxycycline (95%), ceftiofur (91%), florfenicol (52%) và nhạy cảm thấp hơn 50% đối với amoxicillin (48%), lincomycin/spectinomycin (43%), enrofloxacin (38%), tulathromycin (38%), tilmicosin (19%), tylosin (10%).

De la Fuente và ctv (2007) đã nghiên cứu về mức độ nhạy cảm kháng sinh của 30 gốc *H. parasuis* ở Anh và Tây Ban Nha với 19 loại thuốc kháng sinh. Kết quả cho thấy tất cả các gốc phân lập ở Anh nhạy cảm hoàn toàn với penicillin, ceftiofur, erythromycin, tilmicosin, enrofloxacin và florfenicol; hầu hết các gốc vi khuẩn đều nhạy cảm với các kháng sinh còn lại, tỷ lệ nhạy cảm thấp nhất với neomycin, chiếm 80% các gốc vi khuẩn thử nghiệm. Ngược lại, tất cả các chủng phân lập ở Tây Ban Nha chỉ nhạy cảm với florfenicol và tỷ lệ nhạy cảm thấp đối với penicillin, ampicillin, oxytetracycline, erythromycin, tilmicosin, tiamulin

và trimethoprim + sulphamethoxazole. Kiểu hình đề kháng cũng được xác định với các gốc phân lập ở Tây Ban Nha, 23,3% trong số chúng kháng với ít nhất 8 loại thuốc kháng sinh. Nghiên cứu đã nhận định các gốc *H. parasuis* ở Anh rất nhạy cảm với các kháng sinh thường xuyên sử dụng để điều trị các bệnh về đường hô hấp của heo, tuy nhiên cần giám sát chặt chẽ hơn mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các gốc vi khuẩn này tại Tây Ban Nha. Gần đây, nghiên cứu của Dayao và ctv (2016) tại Úc cho thấy các gốc vi khuẩn *H. parasuis* có mức độ nhạy cảm rất cao với kháng sinh thử nghiệm, trong đó tỷ lệ nhạy cảm của các vi khuẩn này với ampicillin, penicillin, erythromycin và tulathromycin là hơn 90%.

Sự giảm mức độ nhạy cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh có thể liên quan đến nhiều cơ chế khác nhau. Trong đó, quan trọng nhất là vi khuẩn hình thành gen đề kháng và tạo màng sinh học (biofilm) nhằm cản trở tác động của kháng sinh đối với vi

khuẩn (Bello-Ortí và ctv, 2014; Archambault và ctv, 2012; Sassu và ctv, 2018). Nhiều nghiên cứu cho thấy tỷ lệ phát hiện gen đề kháng kháng sinh ở nhóm vi khuẩn trên với các kháng sinh là khá cao, trong đó các gen được phát hiện nhiều nhất liên quan đến đề kháng kháng sinh florfenicol, ampicillin, penicillin và tetracycline (Kucerova và ctv, 2012; Nedbalcová và Zdenka Kučerová, 2013). Ngoài ra, sự hình thành màng sinh học cũng ảnh hưởng đến tính miễn dịch với kháng sinh của vi khuẩn. Màng sinh học của vi khuẩn là một cấu trúc phức tạp được bao bọc bởi vỏ polymer tự sản xuất được gắn vào bề mặt vi khuẩn. Sự hình thành màng sinh học là một yếu tố quan trọng, cho phép vi khuẩn tồn tại và phát triển trong môi trường không thuận lợi (Jacques và ctv, 2010; Aragon và Tremblay, 2010; Olson và ctv, 2002). Mặc khác, *H. parasuis* được biết có khả năng hình thành màng sinh học có thể kháng kháng sinh và chất khử trùng gấp 10 - 1000 lần so với các vi khuẩn khác (Archambault và ctv, 2012; Sassu và ctv, 2018).

Kết quả từ các nghiên cứu trên cho thấy, mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *H. parasuis* là khác nhau ở mỗi khu vực, mỗi quốc gia và hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy vi khuẩn này có khuynh hướng giảm nhạy cảm với nhiều kháng sinh thử nghiệm. de la Fuente và ctv (2007) đã nhấn mạnh tầm quan trọng của việc sử dụng thuốc kháng sinh một cách thận trọng trong điều trị bệnh Glässer. Đặc biệt, cần đánh giá thường xuyên các mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* trước khi sử dụng một liệu pháp nhất định. Điều này không chỉ làm tăng hiệu quả điều trị bệnh, mà còn hạn chế tình trạng đề kháng kháng sinh không chỉ đối với vi khuẩn *H. parasuis*, mà còn đối với quần thể vi khuẩn khác gây bệnh hô hấp trên heo như *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *B. bronchiseptica* hay *M. hyopneumoniae*. Bên cạnh đó, hiện nay có nhiều loại vaccin đa giá có thể phòng được nhiều bệnh hô hấp do vi khuẩn trên heo như Rhinavac® Cerdos (Syva) là vaccin vô hoạt, đa giá chứa 6 kháng nguyên phòng bệnh do *P. multocida* type A và D, *B. bronchiseptica*, *M. hyopneumoniae* và *H. parasuis*; Suigen Donoban 10 (Virbac) phòng 6 bệnh hô hấp trên heo do *M. hyopneumoniae*, *S. suis* type 2, *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* type A và D, *B. bronchiseptica* và *H. parasuis*. Việc tiêm phòng vaccin đa giá còn góp phần giảm stress cho

heo, tiết kiệm chi phí chăn nuôi, ít tổn công.

Giải pháp quan trọng tiếp theo là vệ sinh sạch sẽ chuồng nuôi, áp dụng tốt các biện pháp sát trùng và thực hành xử lý động vật đúng cách, hạn chế sử dụng thuốc kháng sinh là điều cần thiết để giữ cho số lượng dịch bệnh Glässer bùng phát ở mức thấp. Đảm bảo an toàn sinh học và hạn chế tối đa các stress, nhất là stress nhiệt. Giải pháp thứ ba là áp dụng các biện pháp bảo vệ sức khỏe ruột của con vật. Đường ruột khỏe giúp tiêu hóa, hấp thu thức ăn tốt, thành ruột ngăn ngừa hiệu quả độc tố và nguồn bệnh, hệ miễn dịch ruột (chiếm 70-80% năng lực miễn dịch của cơ thể) sản sinh đầy đủ kháng thể để bảo vệ ruột và toàn bộ cơ thể. Các biện pháp bảo vệ sức khỏe ruột là cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng của khẩu phần theo một tỷ lệ cân đối phù hợp với nhu cầu của vật nuôi, đặc biệt là cân đối acid amin để giảm protein tổng số, sử dụng các phụ gia có lợi cho sức khỏe ruột hay ngăn ngừa những tác nhân gây tổn hại đến sức khỏe ruột như probiotic, prebiotic, acid hữu cơ, enzyme công nghiệp, các chất vô hoạt mycotoxin, các chất chống oxy hóa và thảo dược (Ramirez và Goossens, 2017).

#### IV. KẾT LUẬN

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các gốc *H. parasuis* là khác nhau giữa các kháng sinh thử nghiệm. Các gốc vi khuẩn đã phân lập không nhạy cảm hoàn toàn với các kháng sinh thử nghiệm. Các kháng sinh mà vi khuẩn nhạy cảm nhất bao gồm tylosin, tilmicosin, trimethoprim/sulfamethoxazole. Các gốc *H. parasuis* đề kháng mạnh với amoxicillin, gentamicin, ceftiofur, tetracycline và ceftiofur. Những kháng sinh có mức độ nhạy cảm thấp với gốc vi khuẩn trong nghiên cứu là những kháng sinh đã và đang được sử dụng rất phổ biến trong phòng trị bệnh hô hấp trên heo. Cần thường xuyên kiểm soát sự lưu hành cũng như xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *H. parasuis* để có liệu pháp điều trị hiệu quả. Tăng cường sức khỏe đàn bằng cách tiêm phòng, thực hiện tốt an toàn sinh học, giảm các yếu tố gây stress và sử dụng các chất bổ sung để tăng cường hệ miễn dịch.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí Nghiên cứu Khoa học của Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aarestrup F. M., Anne M. S., Øystein A., 2004. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary Microbiology* 101(2): 143–46.
2. Archambault M. José e H., Julien G., Yannick D. N. T., Mario J., 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Drug Resistance* 18(2): 198–206.
3. Cuong N. V., Nhung N. T., Nghia N. H., Hoa N. T. M., Trung N. V., Thwaites G., Carrique-Mas J., 2016. Antimicrobial consumption in medicated feeds in Vietnamese pig and poultry production. *Eco Health* 13, 490–498.
4. Dayao D., Gibson J. S., Blackall P. J., Turni C., 2016. Antimicrobial resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* isolated from Australian pigs. *Australian Veterinary Journal* 94(7): 227–31.
5. de la Fuente A. J. M., Tucker A. W., Navas J., Blanco M., Morris S. J., Gutiérrez-Martín C. B., 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology* 120(1–2): 184–91.
6. Đặng Thị Xuân Thiệp, Bùi Nguyễn Hoàng Trang, Lê Thanh Tùng, Võ Thị Trà An, 2019. Phân lập, định danh vi khuẩn gây bệnh hô hấp trên heo. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*. Tập XXVI, số 6-2019. Trang 49-55.
7. Đinh Xuân Phát, 2018. Phát hiện vi khuẩn *Haemophilus parasuis* (Hps) trên heo bằng phương pháp PCR và phân lập, kiểm tra kháng sinh đồ trên môi trường thạch. Báo cáo tổng kết đề tài khoa học công nghệ cấp cơ sở Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
8. Jacques, M., Virginia A., Yannick D. N. T., 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews* 11(2): 97–121.
9. Krasucka D. Kowalski C. J., 2010. Pharmacokinetic parameters of amoxicillin in pigs. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(6): 729-732.
10. Kucerova, Z., Hradecka H., Nechvatalova K., Nedbalcova K., 2012. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from clinical outbreaks of Porcine respiratory diseases.” *Veterinary Microbiology* 150(1–2): 203–6.
11. Lekagul, Angkana., 2019. Patterns of Antibiotic Use in Global Pig Production: A Systematic Review. *Veterinary and Animal Science*: 100058.
12. Oh Y. H., Moon D. C., Lee Y. J., Hyun B. H., Lim S. K., 2018. Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs between 2010 and 2016. *Veterinary Record Open* 5(1): e000293.
13. Oliveira, Simone, Lucina Galina, and Carlos Pijoan., 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus Parasuis* Infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13(6): 495–501.
14. Prüller, S., Rensch. U., Meemken D., Kaspar H., Kopp P. A., Klein G., Kehrenberg C., 2015. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from swine and companion animals and detection of resistance genes. *PLoS One* 10(8): e0135703.
15. Prüller, S., Turni C., Blackall, P. J., Beyerbach M., Klein G., Kreienbrock L., Strutzberg-Minder K., Kaspar H., Meemken D, Kehrenberg C. (2017). Towards a standardized method for broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology* 55(1): 264–73.
16. Sassu, E. L., Bossé J. T., Gottschalk M., Langford P.R. (2018). Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae* -knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and Emerging Diseases* 65: 72–90.
17. Vanni M., Merenda M., Barigazzi G., Garbarino C., Luppi A., Tognetti R., Intorre L., 2012. Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine. *Veterinary Microbiology* 156(1–2): 172–77.
18. Zhang L., Zhao L., Liu Y., Liu J., Li X., 2017. Pharmacokinetics of tilmicosin in healthy pigs and in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Journal of Veterinary Science* 18(4): 431.
19. Zhao Z., Wang C., Xue Y., Tang X., Wu B., Cheng X., He Q., 2011. The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with clinical respiratory disease. *The Veterinary Journal* 188(3): 337–40.
20. Zhou X., Xu, X., Zhao, Y., Chen, P., Zhang, X., Chen, H. and Cai, X., 2010. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. *Vet. Microbiol.* 141: 168–173.

Ngày nhận 23-12-2019

Ngày phản biện 11-2-2020

Ngày đăng 1-5-2020