

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH Ở TÔM

Hoàng Minh Đức*, Phạm Thuỳ Linh, Trần Thị Khánh Hoà, Nguyễn Thế Hoàng Long
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
*Tác giả liên hệ email: hoangminhduc@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) ở tôm gây ra bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* là một trong những bệnh quan trọng nhất đối với ngành nuôi trồng thủy sản trên toàn thế giới. Trong nghiên cứu này, tổng số 50 mẫu tôm nghi mắc AHPND đã được thu thập tại các trại thuộc huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định để phân lập *V. parahaemolyticus*. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 43/50 (86%) mẫu dương tính với *V. parahaemolyticus*. Tiến hành phát hiện gen mã hóa độc tố pirA gây bệnh AHPND trên 43 chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được đã cho kết quả là 8/43 (18,6%) chủng mang gen pirA. Tám chủng *V. parahaemolyticus* này có tỷ lệ kháng cao nhất với ampicillin (100%), cefotaxime (100%), tiếp theo là ciprofloxacin (37,5%), chloramphenicol (37,5%), tetracycline (25%) và có tỷ lệ kháng thấp nhất với gentamicin (12,5%). Tất cả chủng phân lập được có khả năng kháng từ 2 kháng sinh trở lên với 6 kiểu hình kháng được xác định. Đáng chú ý là 2/8 (25%) chủng có khả năng đa kháng và một chủng kháng tất cả kháng sinh thử nghiệm đã được phát hiện.

Từ khóa: *V. parahaemolyticus*, AHPND, kháng kháng sinh, tôm.

Isolation and determination of antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp

Hoang Minh Duc, Pham Thuy Linh, Tran Thi Khanh Hoa, Nguyen The Hoang Long

SUMMARY

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp caused by *Vibrio parahaemolyticus* is one of the most important diseases for the aquaculture industry on the worldwide. In this study, 50 shrimp samples suspected with AHPND infection were collected at shrimp farms in Hai Hau district, Nam Dinh province for isolating *V. parahaemolyticus*. The studied results showed that 43/50 (86%) samples were positive with *V. parahaemolyticus*. Eight out of forty-three (18.6%) isolates were found to harbour the gene encoding pirA toxin causing AHPND. These 8 *V. parahaemolyticus* isolates exhibited the highest resistance rates to ampicillin (100%) and cefotaxime (100%), followed by ciprofloxacin (37.5%), chloramphenicol (37.5%), tetracycline (25%), and the lowest resistance rate to gentamicin (12.5%). All isolates were resistant to 2 or more antibiotics with 6 resistance patterns. Notably, 2 out of 8 (25%) isolates were identified as multidrug-resistant strains and one isolate was capable of resisting all the tested antibiotics.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, AHPND, antibiotic resistance, shrimp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vibrioparahaemolyticus (*V. parahaemolyticus*) là nguyên nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp

tính (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND) trên tôm, có tỷ lệ chết cao lên đến 100%. Bệnh AHPND lần đầu tiên được báo cáo tại Trung Quốc vào năm 2009, sau đó lan rộng ra các khu

vực khác ở châu Á (Việt Nam, Malaysia, Thái Lan, Philippines, Đài Loan, Nhật Bản, Bangladesh), châu Mỹ (Mexico, Nam Mỹ, Hoa Kỳ) và châu Úc (Tang và cs., 2020). Sự xuất hiện của AHPND trên toàn cầu gây giảm sản lượng tôm đáng kể dẫn đến tổn thất kinh tế lớn đối với ngành nuôi trồng thủy sản ở các quốc gia. Trong đó, sản lượng tôm giảm xuống khoảng 60%, gây thiệt hại ước tính vượt quá 43 tỷ đô la do ảnh hưởng bởi AHPND (Kumar và cs., 2021). Tại Thái Lan, bùng phát AHPND đã làm giảm sản lượng tôm từ hơn 600.000 tấn vào năm 2011 xuống còn khoảng 200.000 tấn vào năm 2014-2015, thiệt hại kinh tế hơn 7,3 tỷ đô la (Shinn và cs., 2018). Tại Malaysia, Cục Thủy sản ước tính thiệt hại do AHPND là 0,49 tỷ đô la vào giai đoạn 2011-2014 (Kua và cs., 2016). Tại Hoa Kỳ, sản lượng tôm đã giảm từ 3,2 tấn/ha vào năm 2016 xuống còn 2,2 tấn/ha vào năm 2017 khi AHPND bùng phát. Thậm chí ở các quốc gia không có dịch AHPND, nền kinh tế vẫn bị ảnh hưởng do phải chi trả nhiều trong nỗ lực ngăn chặn sự xâm nhập của mầm bệnh, bao gồm giám sát và kiểm soát nhập khẩu (Tang và cs., 2020).

Tại Việt Nam, nuôi tôm là ngành mang lại hiệu quả kinh tế cao. Theo đề án phát triển ngành công nghiệp nuôi tôm nước lợ ở nước ta, tính đến năm 2025 tổng diện tích nuôi tôm nước lợ đạt 750.000 ha, tổng sản lượng là trên 1.100.000 tấn. Tuy nhiên trong những năm gần đây, bệnh AHPND lan rộng trong quần thể tôm và gây tổn thất đáng kể cho người nuôi trồng thủy sản (Nguyễn Văn Khanh và cs., 2019). Vào năm 2010, AHPND lần đầu tiên được báo cáo tại Việt Nam, tuy nhiên vẫn chưa xác định rõ nguyên nhân gây bệnh. Sau đó, *V. parahaemolyticus* được xác định là tác nhân chính gây bệnh AHPND do là chủng duy nhất được tìm thấy trong đợt bùng phát dịch bệnh trên tôm tại Việt Nam vào năm 2012 (FAO, 2013). Các yếu tố dẫn đến sự xuất hiện của AHPND liên quan đến quản lý trang trại, ao nước, thức ăn và đàn giống (ấu trùng tôm) (Boonyawiwat và cs., 2018). Nhiều biện pháp kiểm soát đã được thực hiện bao gồm hướng dẫn người nuôi cải thiện điều kiện sản xuất, cơ sở vật chất và áp dụng an toàn sinh học, giám sát tích cực các vùng sản

xuất tôm để cảnh báo sớm, sàng lọc tôm trưởng thành và giai đoạn hậu ấu trùng. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có một biện pháp phòng và trị bệnh thực sự hiệu quả do AHPND có khả năng lây lan nhanh và gây chết hàng loạt (Kumar và cs., 2021).

Trong những năm gần đây, kháng kháng sinh là vấn đề đang được quan tâm trên toàn cầu. Một số nghiên cứu đã được thực hiện để xác định tính kháng kháng sinh của *Vibrio* spp. chỉ ra rằng *V. parahaemolyticus* đã phát triển khả năng đa kháng, điều này gây ra mối lo ngại nghiêm trọng đối với ngành nuôi trồng thủy sản ở nhiều quốc gia, đe dọa nền kinh tế và sức khỏe cộng đồng (Yang và cs., 2017). Mối nguy từ việc kháng sinh được sử dụng với một lượng lớn để phòng và trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản dẫn đến sự gia tăng và lây lan vi khuẩn kháng kháng sinh, bên cạnh đó còn tác động gây ô nhiễm môi trường nước. Chính vì những lý do trên, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn quyết định ban hành "Kế hoạch hành động quốc gia về phòng, chống kháng kháng sinh trong lĩnh vực nông nghiệp giai đoạn 2021-2025". Việc giám sát vi khuẩn kháng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam, bao gồm *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND là vô cùng cần thiết để theo dõi xu hướng kháng kháng sinh, xây dựng chiến lược phòng và điều trị hiệu quả.

Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thêm thông tin về tỷ lệ nhiễm và tính kháng kháng sinh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập và xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm

- Phát hiện gen mã hóa độc tố gây bệnh AHPND của các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được

- Xác định khả năng kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu nghiên cứu: 50 mẫu tôm được thu thập từ các trại tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định.

- Môi trường, hóa chất: Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar, Alkaline Peptone Water (APW), Brain Heart Infusion (BHI) broth, Mueller Hinton Agar (MHA), NaCl, thuốc thử các phản ứng sinh hóa, hóa chất nhuộm gram, hóa chất sử dụng cho phản ứng PCR.

- Khoanh giấy tẩm kháng sinh: ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Thực hiện từ tháng 1 đến tháng 12 năm 2023

- Địa điểm lấy mẫu: Huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định

- Địa điểm xét nghiệm: Phòng thí nghiệm Bộ môn Thú y cộng đồng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thu thập mẫu

Tổng 50 mẫu tôm nghi mắc AHPND được thu thập từ các trại tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định. Những con tôm có biểu hiện lơ dờ, vỏ mềm, nhợt nhạt, gan tụy teo có màu trắng, ruột rỗng được cho nghi mắc AHPND (Kumar và cs., 2021). Mẫu tôm được đựng trong các túi zip vô trùng, ghi đầy đủ thông tin, bảo quản lạnh trong hộp đá, vận chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Thú y cộng đồng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam để tiến hành phân lập *V. parahaemolyticus*. Thời gian từ lúc lấy mẫu và xử lý mẫu không vượt quá 24 h.

2.4.2. Phân lập vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Phương pháp phân lập vi khuẩn *V. parahaemolyticus* dựa theo TCVN 8710-19:2019, cụ thể như sau: 1 gram mẫu gan tụy tôm cắt nhuyễn

và đồng nhất với 9 mL dung dịch Alkaline Peptone Water (APW), ủ 37°C trong 24 h để tăng sinh. Sau ủ, mẫu tăng sinh được ria lên môi trường thạch chọn lọc TCBS và ủ ở 37°C trong vòng 24 – 48 h. Khuẩn lạc đặc trưng của *V. parahaemolyticus* trên thạch TCBS có màu xanh lục, tròn, phẳng, nhầy, d = 2-3mm. Chọn 2-3 khuẩn lạc giả định trên môi trường TCBS tăng sinh trong canh thang BHI ở 37°C trong 24 h để tiến hành kiểm tra phản ứng sinh hoá (Oxidase, Nitrate, Arginine dihydrolase - ADH, Lysine decarboxylase - LDC, Ornithine decarboxylase - ODC) và nhuộm gram. Các chủng *V. parahaemolyticus* được bảo quản trong glycerol 20% ở nhiệt độ -86°C.

2.4.3. Phát hiện gen mã hóa độc tố của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND

Các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm được xác định thông qua việc phát hiện gen mã hóa độc tố *pirA* bằng kỹ thuật PCR.

Chuẩn bị DNA mẫu: DNA của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được tách chiết bằng phương pháp sốc nhiệt, tiến hành như sau: Ria cấy vi khuẩn từ ống giống lên thạch TCBS, ủ 37°C trong 24 h. Khuẩn lạc đặc trưng của *V. parahaemolyticus* trên thạch TCBS (xanh, tròn, phẳng, nhầy, d = 2-3 mm) được dầm với 1 mL Tris-EDTA (TE) buffer trong ống eppendorff, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch nổi và giữ cặn. Thêm vào ống 100 µL TE buffer, huyền dịch vi khuẩn được đun cách thủy ở 100°C trong 10 phút. Sau đó, làm lạnh nhanh bằng cách cho vào tủ -20°C trong 10 phút. Cuối cùng ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Bỏ phần cặn lắng, lấy phần dịch nổi, thu được DNA tinh khiết, bảo quản ở -20°C.

Thành phần phản ứng: Mỗi ống PCR chứa 25 µL dung dịch, bao gồm: 4 µL DNA; 1 µL mỗi mỗi 10 pmol/µL; 4 µL dNTPs 1mM; 2,5 µL PCR buffer 10X; 1 µL Taq polymerase 5U và nước khử nuclease. Cặp mồi AP3 được sử dụng để xác định gen mã hóa độc tố *pirA* theo nghiên cứu của Sirikharin và cs. (2015). Thông tin cặp mồi và chu trình nhiệt của phản ứng PCR được trình bày ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Thông tin cặp mồi phát hiện gen mã hóa độc tố *pirA*

Gen đích	Mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)
<i>pirA</i>	AP3-F	ATG AGT AAC AAT ATA AAA CAT GAA AC	333
	AP3-R	GTG GTA ATA GAT TGT ACA GAA	

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Giai đoạn	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính ban đầu	94	5 phút	1
Biến tính	94	30 giây	
Gắn mồi	53	30 giây	30
Kéo dài	72	40 giây	
Hoàn tất kéo dài	72	5 phút	1

Điện di và đọc kết quả: Sản phẩm PCR được bổ sung loading dye và tiến hành điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm Tris-acetate-EDTA (TAE) 1X. Đọc kết quả bằng máy chụp Gel-Doc (Biorad). Sự hiện diện của các băng sẽ được so sánh với thang chuẩn DNA.

2.4.4. Xác định khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND

Kiểm tra khả năng mẫn cảm với kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được bằng phương pháp khuếch tán trên thạch (Kirby-Bauer). Cụ thể như sau, láng huyền phù của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã được hiệu chỉnh ở độ đục 0,5 McFarland (tương đương 10^8 CFU/mL) lên thạch MHA, sau đó đặt các khoanh giấy kháng sinh lên bề mặt thạch. Sau khi ủ 16-18h ở 37°C, tiến hành đo đường kính của vòng vô

khuẩn xung quanh mỗi khoanh giấy kháng sinh. Kết quả được so sánh với điểm mẫn cảm giới hạn của 6 loại kháng sinh được thử nghiệm, bao gồm: ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg) theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và Phòng thí nghiệm (CLSI, 2018), từ đó xác định mức độ mẫn cảm với từng loại kháng sinh của vi khuẩn.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn *V. parahaemolyticus* từ tôm

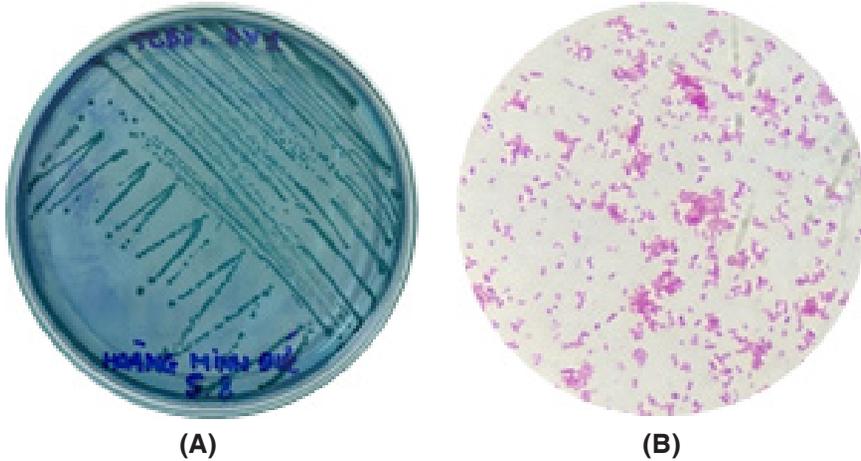
Trong số 50 mẫu tôm nghi mắc AHPND thu thập từ 5 trang trại tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định phát hiện 43 (86%) mẫu dương tính với *V. parahaemolyticus*, kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ phân lập *V. parahaemolyticus* trên tôm

Địa điểm	Số mẫu khảo sát	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Trại 1	10	7	70
Trại 2	10	9	90
Trại 3	10	10	100
Trại 4	10	9	90
Trại 5	10	8	80
Tổng	50	43	86

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được phát triển trên thạch TCBS có hình thái khuẩn lạc màu xanh lục, tròn, phẳng, nhầy và d =

2-3 mm (hình 1A). Khi quan sát dưới kính hiển vi (1.000X), vi khuẩn bắt màu hồng (gram âm), có hình que thẳng hoặc hơi cong (hình 1B).



Hình 1. Khuẩn lạc *V. parahaemolyticus* trên thạch TCBS (A), vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau khi nhuộm gram dưới kính hiển vi (1.000X) (B)

Kiểm tra phản ứng sinh hóa cho thấy 43 chủng phân lập được không mọc trên môi trường không bổ sung NaCl; phản ứng oxidase, nitrate, LDC, ODC dương tính và phản ứng ADH âm tính.

Tỷ lệ nhiễm *V. parahaemolyticus* trên tôm trong nghiên cứu này (86%) cao hơn so với một số báo cáo trong nước trước đây. Tại Thừa Thiên-Huế, tỷ lệ nhiễm *V. parahaemolyticus* trên tôm ở mức thấp; dao động trong khoảng 16,67% đến 26,67% (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2020; Nguyễn Văn Khanh và cs., 2019). Tỷ lệ mẫu dương tính với *V. parahaemolyticus* là 47,6% được báo cáo trong một cuộc khảo sát tại các trại nuôi tôm có dấu hiệu nhiễm AHPND ở Nghệ An (Trương Thị Mỹ Hạnh và cs., 2016). Tuy nhiên, nghiên cứu của Mai Hoàng Thùy Dung và cs. (2021) cho kết quả 100% mẫu tôm có biểu hiện bệnh AHPND được khảo sát dương tính với *V. parahaemolyticus* và cao hơn tỷ lệ phân lập trong nghiên cứu này. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy tỷ lệ nhiễm *V. parahaemolyticus* trên tôm ở mức trung bình đến cao. Tại Thái Lan, nghiên cứu của Joshi và cs. (2014) cho kết quả tỷ lệ phân lập *V. parahaemolyticus* từ trại tôm đang bùng phát bệnh AHPND là 30%. Báo

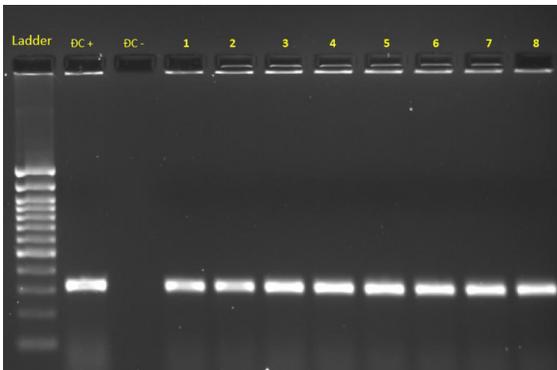
cáo khác tại các ổ dịch AHPND ở Bangladesh đã đưa ra tỷ lệ nhiễm *V. parahaemolyticus* trên tôm là 76,67% (Hossain và cs., 2020), thấp hơn so với kết quả nghiên cứu này. Thực tế, rất khó để so sánh tỷ lệ nhiễm *V. parahaemolyticus* trên tôm trong các nghiên cứu vì sự khác biệt về loại mẫu (tuổi tôm, loài tôm) và số lượng mẫu. Ngoài ra, mùa vụ, khu vực địa lý, quy trình phát hiện và phân lập khác nhau cũng ảnh hưởng tới kết quả nghiên cứu.

Sự gia tăng tỷ lệ nhiễm *V. parahaemolyticus* có thể là hệ quả của sự phát triển nhanh chóng ngành nuôi tôm trong thời gian vừa qua. Theo thống kê của Cục Thủy sản (2023), sản lượng tôm nước ta năm 2022 đạt 1.080,6 triệu tấn; tăng 8,5%; kim ngạch xuất khẩu tôm lập kỷ lục khi đạt 4,3 tỷ USD; tăng 11,2% so với năm 2021. Để đáp ứng sản lượng trên, diện tích ao nuôi, mật độ nuôi và lượng thức ăn sử dụng đã gia tăng thiếu kiểm soát. Trong đó, mật độ nuôi tôm cao làm gia tăng lượng chất thải từ tôm, gây ô nhiễm môi trường ao nuôi, tạo điều kiện cho nhiều loại vi sinh vật phát triển. Sự cạnh tranh về thức ăn và oxy dẫn đến sự suy giảm miễn dịch của tôm, ngoài ra mật độ nuôi còn làm tăng khả

năng va chạm giữa các sinh vật trong ao, tăng nguy cơ bị thương, tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập và gây bệnh. Bên cạnh đó, nhu cầu tôm giống cao gây khó khăn trong việc kiểm soát nguồn tôm, tiềm ẩn những ấu trùng tôm mang vi khuẩn gây bệnh hoặc có sức đề kháng yếu. Nguyên nhân dẫn đến những đợt bùng phát AHPND gần đây được cho là do phương pháp nuôi tôm thâm canh. Nước ao nuôi tôm sau mỗi vụ thường không được xử lý dẫn đến các mầm bệnh cơ hội và tác nhân gây bệnh vẫn còn tồn đọng trong ao. Vì vậy, khử trùng toàn bộ ao nuôi để tiêu diệt các yếu tố truyền bệnh AHPND góp phần làm giảm tình trạng lây lan.

3.2. Xác định gen mã hóa độc tố gây bệnh AHPND của các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được

Tổng cộng 43 chủng *V. parahaemolyticus* được kiểm tra sự hiện diện của gen mã hóa độc tố *pirA* gây bệnh hoại tử gan tụy trên tôm bằng kỹ thuật PCR, kết quả cho thấy 18,6% (8/43) chủng dương tính (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen độc tố *pirA*

Ghi chú: Giếng Ladder: DNA Ladder 1,5kb; giếng ĐC+: Đối chứng dương; giếng ĐC-: Đối chứng âm; giếng 1-8: Các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập

Tỷ lệ này thấp hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Phước và cs. (2020) phát hiện 50% (4/8) chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được có khả năng gây bệnh AHPND. Nghiên cứu của Trương Thị Mỹ Hạnh và cs. (2016) tại Nghệ An

chỉ ra rằng 30% (9/30) chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được cho kết quả PCR dương tính với gen mã hóa độc tố gây bệnh AHPND. Ngược lại, trong một nghiên cứu trên các mẫu tôm bệnh tại các tỉnh Tây Nam Bộ phát hiện 6,67% (10/150) chủng *V. parahaemolyticus* mang gen *pirA* (Mai Hoàng Thùy Dung và cs., 2021).

PirA thuộc độc tố kép PirAB là yếu tố độc lực chính của *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND. Tuy nhiên, một số nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng các plasmid pVA1 chứa gen mã hóa chủng vi khuẩn *Vibrio* khác như *V. campelli*, *V. punensis*, *V. harveyi*, *V. owensii* cũng có thể mang độc tố kép PirAB, giả thuyết cho rằng plasmid này được lan truyền giữa các loài *Vibrio* khác nhau (Lee và cs., 2015). Trên thực tế, vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây AHPND được báo cáo sản xuất độc tố kép PirAB chủ yếu nhằm vào tuyến tiêu hóa (gan, tụy) gây hoại tử, từ đó làm rối loạn chức năng và tử vong ở tôm. Độc tố PirA có khả năng liên kết, gây tổn thương và bong tróc tế bào biểu mô gan tụy dẫn đến hiện tượng gan tụy teo, nhạt màu là biểu hiện đặc trưng của bệnh AHPND trên tôm (Kumar và cs., 2021).

3.3. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được

Tiến hành kiểm tra tính kháng kháng sinh của 8 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mang gen mã hóa độc tố *pirA* với 6 loại kháng sinh thử nghiệm. Kết quả được tổng hợp ở bảng 4.

Các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được từ các mẫu tôm trong nghiên cứu này có khả năng kháng cao với ampicillin (100%) và cefotaxime (100%), tiếp theo là ciprofloxacin (37,5%), chloramphenicol (37,5%), tetracycline (25%) và kháng thấp nhất với gentamicin (12,5%). Từ lâu, ampicillin đã được sử dụng rộng rãi để phòng và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn trong nuôi trồng thủy sản dẫn đến tình trạng kháng cao ở các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được trong nghiên cứu này. Trong khi đó, cefotaxime, gentamicin và tetracycline là các loại kháng sinh đang được sử dụng phổ biến tại các trang trại nuôi tôm hiện nay. Ngoài ra, các trang trại

thường xuyên sử dụng trái phép ciprofloxacin và chloramphenicol trong quá trình nuôi tôm, là một

trong những nguyên nhân làm xuất hiện các chủng *V. parahaemolyticus* kháng các kháng sinh này.

Bảng 4. Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được (N=8)

STT	Nhóm kháng sinh	Loại kháng sinh	Số chủng kháng	Tỷ lệ kháng (%)
1	β-lactam	Ampicillin	8	100
2		Cefotaxime	8	100
3	Amino-glycosides	Gentamicin	1	12,5
4	Tetracyclines	Tetracycline	2	25
5	Quinolones	Ciprofloxacin	3	37,5
6	Phenicols	Chloramphenicol	3	37,5

Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được trong nghiên cứu này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Trương Thị Mỹ Hạnh và cs. (2016) cho thấy các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập từ tôm bệnh tại Nghệ An có tỷ lệ kháng cao với ampicillin (100%), tiếp theo là tetracycline (55,6%) và kháng thấp nhất với ciprofloxacin (11,1%). Kết quả khảo sát trên mẫu tôm, nước, bùn tại các trại nghi nhiễm AHPND tại Bạc Liêu cho thấy tỷ lệ kháng của các chủng *V. parahaemolyticus* với cefotaxime, ciprofloxacin lần lượt là 40%; 13,3% và không phát hiện chủng kháng chloramphenicol (Nguyễn Công Tráng và cs., 2019). Nhìn chung, các chủng *V. parahaemolyticus* được phân lập từ tôm tại các tỉnh/thành trong cả nước đều có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh, mặc dù AHPND mới được phát hiện lần đầu tiên tại Việt Nam vào năm 2010 (FAO, 2013). Bên cạnh đó, vi khuẩn *V. parahaemolyticus* kháng kháng sinh còn được tìm thấy trên hải sản bán lẻ. Điều này gây ra mối lo ngại bởi các chủng vi khuẩn này dễ dàng truyền lây sang người thông qua chuỗi thức ăn (Yang và cs., 2017)

Nghiên cứu trước đây trên thế giới cho thấy các chủng *V. parahaemolyticus* có khả năng kháng với một số kháng sinh thường xuyên được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản như ampicillin, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol. Cụ thể, nghiên cứu của Yang và cs. (2017) thực hiện tại Trung

Quốc cho thấy *V. parahaemolyticus* có tỷ lệ kháng cao với ampicillin (79,59%), tiếp theo là gentamicin (17,35%) và tetracycline (13,27%). Nghiên cứu tại Malaysia báo cáo rằng các chủng *V. parahaemolyticus* có tỷ lệ kháng ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin lần lượt là 84,17%; 13,33% và 6,67% (Tan và cs., 2020). Tỷ lệ kháng ciprofloxacin (37,5%) trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn hẳn so với các báo cáo trước đây, đây là điều đáng báo động khi ciprofloxacin là kháng sinh thường dùng để điều trị bệnh do vi khuẩn gram âm đa kháng trên người và bị cấm sử dụng hoàn toàn trong thủy sản và thú y để tránh tình trạng hình thành vi khuẩn kháng kháng sinh này.



Hình 2. Kiểm tra tính mẫn cảm với kháng sinh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Tại Việt Nam, kháng sinh được sử dụng trong

nuôi trồng thủy sản với mục đích phòng và trị bệnh mang lại thành công và hiệu quả kinh tế cao, tuy nhiên vẫn còn nhiều hạn chế. Tại các trại nuôi tôm, kháng sinh được sử dụng bằng cách trộn vào thức ăn và bổ sung trực tiếp vào ao nuôi. Nhiều loại kháng sinh đã được sử dụng trong quá trình nuôi tôm để phòng và trị bệnh, mặc dù đa phần các hộ nuôi không nắm rõ hiệu quả mang lại của kháng sinh. Chính những điều này dẫn đến sự hình thành vi khuẩn *V. parahaemolyticus* kháng kháng sinh và ngày càng trở nên đa kháng. Nguy hiểm hơn khi các chủng vi khuẩn này có khả năng lây truyền gen kháng kháng sinh cho các vi sinh vật gây bệnh khác. Vì vậy, *V. parahaemolyticus* kháng

kháng sinh không chỉ là mối lo ngại cho ngành nuôi trồng thủy sản mà còn đe dọa đến sức khỏe con người. Bên cạnh đó, các loài thủy sản đào thải phần lớn kháng sinh vào nước, do đó làm ô nhiễm môi trường nước, nguy cơ gây gia tăng tình trạng kháng kháng sinh trong cộng đồng.

Tất cả các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được đều kháng từ 2 loại kháng sinh trở lên. Kết quả kiểm tra tính đa kháng phát hiện 2/8 (25%) chủng MDR (kháng từ 3 nhóm kháng sinh trở lên), trong đó một chủng kháng tất cả kháng sinh được thử nghiệm (bảng 5).

Bảng 5. Kiểu hình kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được (N=8)

Số kháng sinh kháng	Số kiểu hình kháng	Kiểu hình kháng	Số chủng	Tỷ lệ (%)
2	1	AMP-CTX	3	37,5
		AMP-CTX-TET	1	12,5
3	3	AMP-CTX-CIP	1	12,5
		AMP-CTX-CHL	1	12,5
4	1	AMP-CTX-CHL-CIP	1	12,5
6	1	AMP-CTX-GEN-TET-CHL-CIP	1	12,5
MDR	2		2	25
Tổng	6		8	100

Ghi chú: AMP: Ampicillin, CTX: Cefotaxime, GEN: Gentamicin, TET: Tetracycline, CIP: Ciprofloxacin, CHL: Chloramphenicol, MDR: đa kháng, N: Tổng số chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được

Tỷ lệ *V. parahaemolyticus* đa kháng trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với các báo cáo tại Malaysia (90,83%) (Tan và cs., 2020) và Trung Quốc (74,5%) (Hu và Chen, 2016). Sự đa dạng kiểu hình kháng cũng được thể hiện trong nghiên cứu này, từ 8 chủng *V. parahaemolyticus* xác định được 6 kiểu hình kháng, trong đó kiểu hình AMP-CTX chiếm ưu thế nhất (3/8 chủng).

Sự xuất hiện các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND kháng kháng sinh là mối lo ngại đáng kể đối với ngành nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là ngành nuôi tôm trên toàn cầu. Đáng chú ý, *V. parahaemolyticus* có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) giúp vi khuẩn tăng cường khả năng

chống lại kháng sinh và các chất sát trùng. Giống như các vi sinh vật khác, *V. parahaemolyticus* tạo ra các yếu tố bám dính riêng biệt cho phép vi khuẩn liên kết chặt chẽ với nhau, bám vào bề mặt và bắt đầu hình thành biofilm, tăng khả năng kháng kháng sinh và độc lực của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* khiến chúng trở nên nguy hiểm và khó tiêu diệt hơn (Elexson và cs., 2014).

Hiện nay, ở các quốc gia có ngành nuôi trồng thủy sản phát triển, cơ quan chính phủ đang phải nỗ lực kiểm soát việc sử dụng kháng sinh để giảm thiểu tình trạng kháng. Sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đã bị cấm hoặc chịu sự quản lý nghiêm ngặt ở nhiều nước châu Âu và Bắc Mỹ

do những hậu quả mang lại như tồn dư kháng sinh trong thực phẩm, tình trạng kháng kháng sinh và gây ô nhiễm môi trường. Tuy nhiên, kháng sinh vẫn được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản với số lượng lớn tại nhiều quốc gia như Thái Lan, Việt Nam (Defoirdt và cs., 2011). Tình trạng lạm dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản dẫn đến khả năng kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND đang ngày càng gia tăng là thách thức cho các quốc gia có ngành nuôi tôm trọng điểm.

IV. KẾT LUẬN

Tổng cộng 43 chủng *V. parahaemolyticus* được phân lập và giữ giống từ 50 mẫu tôm nghi mắc bệnh AHPND. Trong đó, phát hiện 8/43 (18,6%) chủng mang gen mã hoá độc tố *pirA* gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR.

Các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND phân lập được trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng cao nhất với ampicillin (100%) và cefotaxime (100%), kế tiếp là ciprofloxacin (37,5%), chloramphenicol (37,5%), tetracycline (25%) và kháng thấp nhất với gentamicin (12,5%). Đáng chú ý, phát hiện 25% chủng *V. Parahaemolyticus* đa kháng, một chủng kháng tất cả kháng sinh thử nghiệm với kiểu hình kháng là ampicillin - cefotaxime - gentamicin - tetracycline - chloramphenicol - ciprofloxacin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Boonyawiwat, V., Nga, N. T. V., & Bondadreantaso, M. G., 2018. Risk factors associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreak in the Mekong delta, Vietnam. *Asian Fisheries Science*. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2018.31.s1.016>
- CLSI, 2018. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. In *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>
- Elexson, N., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Soopna, P., Lee, H. Y., Tuan Zainazor, T. C., Nor Ainy, M., Nakaguchi, Y., Mitsuaki, N., & Son, R., 2014. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.020>
- FAO, 2013. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). In *FAO Fisheries and Aquaculture Report* (Vol. 1053, Issue 1053).
- Hossain, M. M. M., Uddin, M. I., Islam, H., Fardoush, J., Rupom, M. A. H., Hossain, M. M., Farjana, N., Afroz, R., Hasan-Uj-Jaman, Roy, H. S., Shehab, M. A. S., & Rahman, M. A., 2020. Diagnosis, genetic variations, virulence, and toxicity of AHPND-positive *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon*. *Aquaculture International*, 28(6). <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00607-z>
- Hu, Q., & Chen, L., 2016. Virulence and antibiotic and heavy metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from crustaceans and shellfish in Shanghai, China. *Journal of Food Protection*, 79(8). <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-031>
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I. T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C. F., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K., & Thitamadee, S., 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428–429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>
- Kua, B. C., Iar, A., Siti Zahrah, A., Irene, J., Norazila, J., Nik Haiha, N. Y., Fadzilah, Y., Mohammed, M., Siti Rokhaiya, B., Omar, M., & Teoh, T. P., 2016. Current status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of farmed shrimp in Malaysia. *Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia*, 55–59.

10. Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K., 2021. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*, 13(8), 524.
11. Lee, C. Te, Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H. J., Wang, H. C., Hor, L. I., & Lo, C. F., 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112>
12. Mai Hoàng Thùy Dung, Huỳnh Tuấn Bình, Nguyễn Thị Minh Hòa, Nguyễn Phước Khải Hoàn, Nguyễn Thanh Toàn, Trần Thị Hương Liên, Tiền Hải Lý, Nguyễn Đình Xuyên, Trần Linh Thuốc, & Trần Văn Hiếu, 2021. Thực trạng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) trên tôm nuôi và kết quả phân lập chủng vi khuẩn gây bệnh ở một số tỉnh Tây Nam Bộ. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển*, 20(02), 36–43. <https://doi.org/10.52997/jad.5.02.2021>
13. Nguyễn Công Tráng, Trần Thị Ngọc Lắm, H. T. Q. N., 2019. Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ các vùng nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) của tỉnh Bạc Liêu năm 2019. *Tạp Chí Khoa Học-Công Nghệ Thủy Sản*, 4, 139–147.
14. Nguyễn Ngọc Phước; Nguyễn Thị Xuân Hồng; Nguyễn Công Chung, 2020. Nghiên cứu độc lực của một số chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp Chí Khoa Học Nông Nghiệp Việt Nam*.
15. Nguyễn Văn Khanh, Nguyễn Quang Linh, Trần Thúy Lan, Lê Thị Tuyết Nhân, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Thị Kim Cơ, & Trần Quốc Dung, 2019. Phân lập và sàng lọc các chủng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế bằng chỉ thị phân tử 16S rRNA. *Tạp Chí Khoa Học Đại Học Huế: Khoa Học Tự Nhiên*, 128(1E), 47–58. <https://doi.org/10.26459/hueuni-jns.v128i1e.5443>
16. Shinn, A. P., Pratoomyot, J., Griffiths, D., Trong, T. Q., Vu, N. T., Jiravanichpaisal, P., & Briggs, M., 2018. Asian shrimp production and the economic costs of disease. *Asian Fish. Sci. S*, 31, 29–58.
17. Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K., 2015. Characterization and PCR Detection Of Binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates that Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. *PLOS ONE*, 10(5), e0126987.
18. Tan, C. W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T. Y., Lee, E., Rollon, W. D., Hara, H., Kayali, A. Y., Nishibuchi, M., & Radu, S., 2020. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.002>
19. Tang, K. F. J., Bondad-Reantaso, M. G., Arthur, J. R., MacKinnon, B., Hao, B., Alday-Sanz, V., Liang, Y., & Dong, X., 2020. Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, C1190, 0_1-65.
20. TCVN 8710-19:2019: *Bệnh Thủy Sản - Quy Trình Chẩn Đoán - Phần 19: Bệnh Hoại Tử Gan Tụy Cấp Tính Ở Tôm 2019*.
21. Trương Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị Yên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Phan Thị Vân, Nguyễn Đình Vinh, & Trương Thị Thành Vinh, 2016. Hiện trạng sử dụng thuốc và tính kháng kháng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan. *Tạp Chí Khoa Học - Công Nghệ Thủy Sản*, 4, 57–64.
22. Yang, Y., Xie, J., Li, H., Tan, S., Chen, Y., & Yu, H., 2017. Prevalence, antibiotic susceptibility and diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates in seafood from South China. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02566>

Ngày nhận: 10-2-2024

Ngày phản biện: 12-4-2024

Ngày đăng: 1-9-2024