

ẢNH HƯỞNG CỦA ERYTHROMYCIN TRONG ĐIỀU TRỊ CÁ RÔ ĐỒNG (*ANABAS TESTUDINEUS*) NHIỄM VI KHUẨN *AEROMONAS DHAKENSIS* ĐA KHÁNG KHÁNG SINH

Nguyễn Thành Luân

Viện Khoa học ứng dụng HUTECH, Đại học Công nghệ Tp. Hồ Chí Minh (HUTECH)

TÓM TẮT

Ảnh hưởng của kháng sinh với liều lượng ước tính trong phòng và điều trị bệnh thủy sản chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của kháng sinh erythromycin trong điều trị cá rô đồng giống gây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn kháng erythromycin (*Aeromonas dhakensis* NV5M và V7L) đã được khảo sát. Ngoài ra, sự kích hoạt làm gia tăng các loài vi khuẩn *Aeromonas/Vibrio* spp. kháng erythromycin trên cá rô đồng đã nhiễm vi khuẩn đa kháng cũng được khảo sát. Kết quả thí nghiệm cho thấy sau khi dùng cho ăn thức ăn bổ sung erythromycin (100mg/kg cá, 10 ngày) thì tỷ lệ cá chết tăng đáng kể; từ 6,67% lên 46,67% (ngày 11, $P = 0,035$) ở nhóm đối chứng không gây nhiễm; trong khi đó ở nhóm cá gây nhiễm với vi khuẩn kháng kháng sinh và có độc lực cao (*A. dhakensis* NV5M) tỷ lệ chết tăng đáng kể ($P = 0,021$) từ 40% lên 86,67% ở ngày 15 và cao hơn so với tỷ lệ chết (80%) ở nhóm gây nhiễm NV5M không cho ăn kháng sinh. Kết quả này cho thấy cá bị nhiễm vi khuẩn đa kháng cho kết quả điều trị không hiệu quả bằng kháng sinh. Kết quả trong nghiên cứu này chứng minh rằng *A. dhakensis* có thể duy trì hoặc phát tán các đặc tính kháng sang các loài vi khuẩn gây độc khác. Ngoài ra, việc sử dụng kháng sinh kéo dài có thể làm thay đổi số lượng vi khuẩn nội tại kháng kháng sinh và dẫn đến bệnh đặc biệt khó kiểm soát. Nghiên cứu này đóng góp những kết quả quan trọng trong cảnh báo việc sử dụng thuốc kháng sinh để dự phòng và điều trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam. Nghiên cứu tiếp theo cần phân tích cụ thể các cơ chế phân tử (gen kháng, plasmid) nhằm tăng cường kiểm soát việc phát tán sang nhóm vi khuẩn gây hại cho sức khỏe con người.

Từ khóa: *Aeromonas* spp., bệnh thủy sản, cá rô đồng, độc lực, kháng kháng sinh.

Effects of erythromycin in treatment for climbing perch (*Anabas testudineus*) infected experimentally with multi-antibiotic resistance *Aeromonas dhakensis*

Nguyen Thanh Luan

SUMMARY

A major problem concerning in aquaculture is the in-correct estimated dosage of antibiotics when treating fish disease. In this study, the effects of erythromycin in the treatment for climbing perch fingerlings infected experimentally with *Aeromonas dhakensis* strain (NV5M or V7L) resisting to erythromycin were investigated. In addition, inducing the increase of *Aeromonas/Vibrio* spp. resisting with erythromycin in the fish infected the multi-antibiotic resistant bacteria strain (NV5M or V7L) was also investigated. The results of this study showed that after stop feeding the feed adding erythromycin (100mg/kg fish/day, for 10 days), the mortality rate of the control (non-challenge) climbing perch increased significantly ($P = 0.035$, 6.67% to 46.67% at the day 11th). Meanwhile, the mortality rate of the fish challenged with the high virulent *Aeromonas dhakensis* isolate and multi-antibiotic resistance bacteria strains increased significantly ($P = 0.021$, 40% to 86.67% at the day 15th) and higher than the mortality rate (80%) in the fish group infected experimentally with NV5M without feeding feed added antibiotics. This result indicated that the fish infected with the

multi-antibiotic resistance bacteria that treatment by antibiotics were not effective. The studied result also indicated that *A. dhakensis* could remain or spread the resistant property to the other virulent bacteria. In addition, using antibiotics for aquatic disease treatment in a long time might change the number of internal antibiotic resistant bacteria leading to very difficult to control the diseases in fish. The result of this study also contributed the important warning in using antibiotics for fish disease prophylactic and therapy in aquaculture in Viet Nam. Further studies are necessary to elucidate the genetic mechanisms of these bacteria strains to control the danger to human health.

Keywords: *Aeromonas* spp., aquatic disease, climbing perch, virulence, antibiotic resistance.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, việc nuôi cá rô đồng (*Anabas testudineus*) mang lại hiệu quả kinh tế cao và đã được nuôi thử nghiệm thành công trong trang trại cá nước ngọt ở vùng Mymensingh, Bangladesh năm 2013 (Al Faruk và ctv, 2013). Tuy nhiên, việc nuôi thâm canh với mật độ cao dẫn đến một số dịch bệnh gây chết cá ở cả giai đoạn ương giống và nuôi thương phẩm. Cá trong ao có thể hao hụt lên đến 20% sau mỗi đợt cá bị bệnh (Nguyễn Hữu Thịnh và ctv, 2011). Giải pháp kháng sinh đang sử dụng trong phòng và điều trị bệnh thủy sản ở Việt Nam (Crumlish và ctv, 2002) với liều lượng sử dụng chỉ được ước tính mà chưa được định liều chính xác (Van, 2005). Ngoài ra, ảnh hưởng của việc sử dụng kháng sinh trên cá rô đồng cũng chưa được nghiên cứu nhiều.

Trong nghiên cứu này, sự ảnh hưởng của kháng sinh erythromycin trong điều trị cá rô đồng đã gây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn *A. dhakensis* NV5M và V7L (phân lập từ cá rô đồng bệnh, có tính kháng với erythromycin và tỷ lệ gây chết cá cao, 90%) được khảo sát. Quan trọng hơn, sự kích thích làm gia tăng các loài vi khuẩn *Aeromonas/Vibrio* spp. kháng erythromycin trên cá rô đồng bị nhiễm *A. dhakensis* đa kháng cũng được đánh giá. Chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của erythromycin trong điều trị cá nhiễm vi khuẩn đa kháng (kháng 2 nhóm kháng sinh trở lên) và có độc lực cao (chủng *A. dhakensis* NV5M và V7L phân lập từ cá rô đồng bệnh), cùng lúc khảo sát ảnh hưởng của việc sử dụng erythromycin đối với sự gia tăng các loài vi khuẩn *Aeromonas/Vibrio* spp. trên cá rô đồng bị nhiễm vi khuẩn đa kháng.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi sẽ đóng góp thông tin quan trọng về ảnh hưởng của kháng sinh erythromycin lên sức khỏe của cá rô đồng giống, hướng tới thay thế kháng sinh sử dụng trong nuôi trồng thủy sản bằng phương pháp thân thiện khác.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vi khuẩn thí nghiệm

Sử dụng 2 chủng vi khuẩn *A. dhakensis* V7L và NV5M phân lập được trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi.

Hai chủng vi khuẩn này được phân lập từ cá rô đồng nhiễm bệnh (gan có nhiều đốm mù trắng, xuất huyết) và chúng có độc lực gây chết cá rô đồng giống với tỷ lệ chết lên đến 90% khi sử dụng liều tiêm khoang bụng 10^5 CFU/con. Các chủng vi khuẩn trên được tăng sinh trên Trypton Soy agar (TSA, Himedia, India) 24 giờ ở 28°C trước khi sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo trong nghiên cứu này.

2.2. Cá thí nghiệm

Cá rô đồng giống (~3-5g/con, 250 con) sáng màu và lanh lợi được mua từ trại sản xuất cá giống Minh Lộc, Tp.HCM và nuôi ổn định trong bể composite 300L, sục khí liên tục tại Phòng thí nghiệm bệnh học Thú y, Viện Khoa học ứng dụng HUTECH, Đại học Công nghệ Tp.HCM. Trước thử nghiệm, sức khỏe của cá được kiểm tra ngẫu nhiên bằng cách quan sát bệnh tích và sự nhiễm vi khuẩn bao gồm vi khuẩn *Vibrio* spp. ở các mô gan, thận và lách bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường TSA và TCBS (TM Media, India) ở 28°C, 24-48 giờ.

2.3. Đánh giá khả năng đa kháng của 2 chủng V7L và NV5M

Thử nghiệm độ nhạy với kháng sinh được thực hiện trên môi trường thạch Muller-Hinton agar (Himedia, India) theo phương pháp đĩa khuếch tán kháng sinh của Kirby-Bauer. Theo đó, dung dịch kháng sinh được bổ sung vào giếng ($d = 6 \text{ mm}$) đã chuẩn bị sẵn trên đĩa thạch trải đều vi khuẩn (10^8 CFU/ml) để đạt nồng độ cuối cùng tương ứng với từng loại trình bày trong bảng 1. Sau đó, các đĩa thạch được ủ 24 giờ ở 28°C và ghi nhận khả năng kháng theo phương pháp được đề xuất bởi CLSI (2006). Kháng sinh erythromycin được chọn trong thử nghiệm trên cá do chúng thể hiện khả năng ức chế cả 2 chủng NV5M và V7L.

2.4. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của erythromycin trong điều trị cá nhiễm vi khuẩn đa kháng

Trong thí nghiệm gây nhiễm thực nghiệm cá rô đồng giống ($\sim 3\text{g/con}$) với vi khuẩn đa kháng để kiểm tra sự thay đổi số lượng vi khuẩn kháng erythromycin trong dịch ruột và mô thận, cá được bố trí ngẫu nhiên 30 con/bể 20L, sục khí 24/24 giờ, gồm 6 nghiệm thức: (1) đối chứng, tiêm dung dịch NaCl 0,85% (0,1 ml/con) và cho ăn thức ăn không bổ sung kháng sinh erythromycin; (2) đối chứng, tiêm dung dịch NaCl 0,85% (0,1 ml/con), cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh; (3) và (4) gây nhiễm thực nghiệm, tiêm vi khuẩn đa kháng và có độc lực cao (NV5M hoặc V7L) với liều 10^5 CFU/con ở xoang bụng, cho ăn thức ăn có bổ sung kháng sinh; (5) và (6) gây nhiễm, tiêm chủng vi khuẩn đa kháng và có độc lực cao (NV5M hoặc V7L) với liều 10^5 CFU/con ở xoang bụng và cho ăn thức ăn không bổ sung kháng sinh. Nồng độ erythromycin sử dụng là 100mg/kg cá (Nguyễn Phước Minh, 2012), cho ăn liên tục 10 ngày. Các mẫu dịch ruột và thận từ các nhóm thí nghiệm ($n=5$) được thu nhận và định lượng vi khuẩn *Vibrio* spp. kháng erythromycin trên môi trường TCBS và TSA có bổ sung erythromycin (50ug/ml) từ kết quả khảo sát MIC cho 2 chủng NV5M và V7L theo phương pháp của Nguyen và ctv. (2017). Song song với thí nghiệm trên, thí nghiệm khảo sát tỷ lệ cá sống/chết cũng được bố

trí cùng thời điểm với số cá ở mỗi nghiệm thức là 15 con. Tỷ lệ sống/chết được tính theo công thức $= (\text{số cá chết}/\text{tổng số cá}) \times 100\%$.

2.5. Xử lý thống kê

Tất cả số liệu đều được xử lý thống kê bằng phân tích phương sai ANOVA. Sự khác biệt về tỷ lệ cá sống/chết trong các nghiệm thức được so sánh bằng Fisher's exact test. Giá trị $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa và phân tử của hai chủng NV5M và V7L phân lập từ cá rô đồng bệnh

Khuẩn lạc NV5M trên môi trường TSA có hình dạng tròn, trắng đục được phân lập từ mang cá rô đồng thương phẩm ($\sim 200\text{g}$) có dấu hiệu bệnh mù ở gan, trong khi đó khuẩn lạc V7L có màu vàng (trên môi trường TCBS) phân lập từ lách cá. Hai chủng vi khuẩn đều là các vi khuẩn gram âm, catalase và oxidase dương tính. Chúng có khả năng phát triển trong môi trường TSB có bổ sung NaCl 5% (V7L) và 4% (NV5M). Cả hai chủng đều thể hiện khả năng dung huyết kiểu hình β -hemolysis. Kết quả định danh bằng trình tự 16SrDNA cho thấy cả hai chủng NV5M và V7L có mức độ tương đồng cao nhất với chủng *Aeromonas dhakensis* (T), MDC47 (99,84%) (không thể hiện trong bài viết này).

3.2. Khả năng kháng kháng sinh của hai chủng NV5M và V7L

Kết quả kiểm tra sự nhạy cảm với kháng sinh của hai chủng NV5M và V7L cho thấy chúng có thể kháng 7/9 loại kháng sinh thông dụng, và nhạy cảm với ciprofloxacin và doxycycline. Trong đó, ciprofloxacin đã bị cấm sử dụng trong sản xuất kinh doanh thủy sản (Thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT, 01/6/2016 của Bộ Nông nghiệp và PTNT). Kháng sinh doxycycline hiện không thuộc danh mục cấm hay hạn chế sử dụng; tuy nhiên trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi thấy rằng một số chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng giống đã có khả năng kháng mạnh với loại kháng sinh này.

Cả 2 chủng *A. dhakensis* NV5M và V7L đều thể hiện khả năng kháng kháng sinh erythromycin (với đường kính vòng kháng ghi nhận lần lượt là 18,33mm và 19,33mm) (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm kháng kháng sinh của hai chủng V7L và NV5M phân lập từ cá rô đồng

Kháng sinh	Clindamycin 2µg	Ampicillin 10µg	Tetracycline 30µg	Amoxicillin 25µg	Chloramphenicol 30µg	Ciprofloxacin 5µg	Erythromycin 15µg	Doxycycline 30µg	Cefalexin 30µg
Tình trạng ^g	-	Cấm	Cấm	Hạn chế	Cấm	Cấm	Hạn chế	-	-
	Đường kính vòng kháng (mm)								
Tham khảo (mm)	24 - 30 [@]	33 - 41 [#]	18 - 25 [*]	19 - 25 [*]	21 - 27 [*]	22 - 30 [@]	21 - 29 [#]	18 - 24 [*]	18 - 23 [*]
	Đường kính vòng kháng (mm)								
Chủng NV5M	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	22,33 ± 2,52 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	39,33 ± 5,51 (S)	18,33 ± 2,89 (R)	26,33 ± 2,89 (S)	0,00 ± 0,00 (R)
Chủng V7L	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	23,50 ± 2,12 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	36,33 ± 4,04 (S)	19,33 ± 4,93 (R)	31,33 ± 4,04 (S)	0,00 ± 0,00 (R)

*: đề xuất bởi CLSI (2006) cho chủng *Escherichia coli* ATCC® 25922; @: cho chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; #: cho chủng *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* ATCC® 33658 ủ 28 °C trong 24 - 28 giờ; ^g: theo thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT ngày 01/6/2016 của Bộ Nông nghiệp và PTNT; S: nhạy cảm; R: kháng

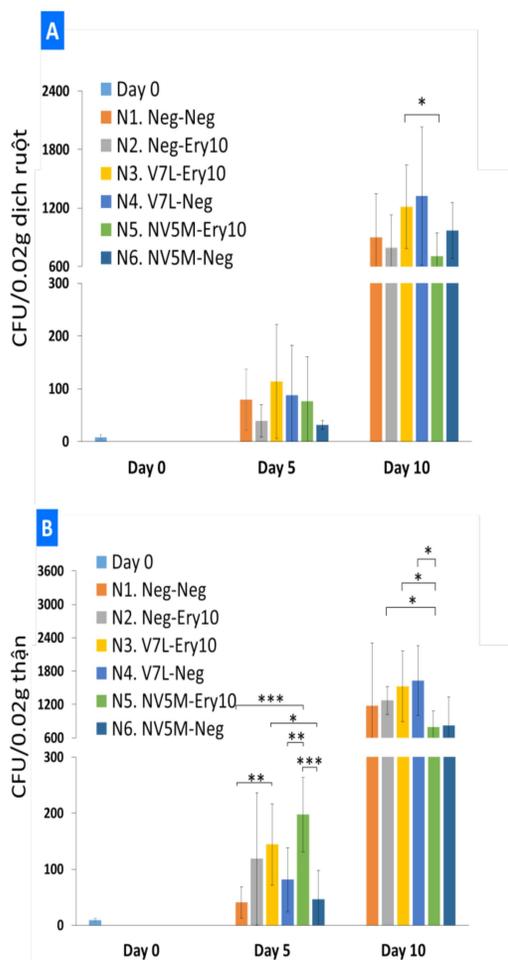
So với nghiên cứu trước đây của chúng tôi, kết quả này trái ngược với kết quả kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng giống (kháng hoàn toàn với erythromycin, d = 0 mm, dữ liệu không được mô tả trong nghiên cứu này). Điều này cho thấy rằng một số chủng vi khuẩn kháng hoàn toàn erythromycin có thể đã xuất hiện trong các trại nuôi cá rô đồng giống. Kết quả khảo sát sự nhạy cảm kháng sinh trong nghiên cứu này cho thấy *A. dhakensis* có khả năng chứa các plasmid có mang nhiều loại gen kháng kháng sinh khác nhau và có thể chuyển sang các loài vi khuẩn khác, sau đó làm tăng cường độ

lực của các loài gây bệnh (Aoki, 1988; Cabello và ctv, 2013). Để hiểu rõ hơn về đặc tính đó, chúng tôi đánh giá hiệu quả của việc sử dụng erythromycin trong bảo vệ cá và khả năng làm gia tăng các chủng vi khuẩn *Aeromonas/Vibrio* spp. nội tại kháng erythromycin bằng mô hình cá gây nhiễm *A. dhakensis* NV5M hoặc V7L đa kháng và được cho ăn thức ăn bổ sung erythromycin như bên dưới.

3.3. Sự gia tăng số lượng vi khuẩn *Aeromonas/Vibrio* spp. kháng erythromycin

Kết quả gây nhiễm thực nghiệm sử dụng

chủng *A. dhakensis* NV5M hoặc V7L đa kháng cho thấy không có sự khác biệt về số lượng *Aeromonas/Vibrio* spp. kháng erythromycin trong dịch ruột cá ở các nhóm thí nghiệm sau 5 ngày cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh (100mg/kg cá) (hình 1A).



**Hình 1. Số lượng vi khuẩn kháng erythromycin phân lập từ mẫu cá ở các nhóm thí nghiệm gây nhiễm thực nghiệm và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh erythromycin. Sự nhiễm *Vibrio* spp. kháng erythromycin ở dịch ruột (A) và thận (B).
*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.**

Tuy nhiên, nhóm gây nhiễm (nhóm 3) có số lượng *Aeromonas/Vibrio* spp. kháng erythromycin cao hơn đáng kể so với nhóm 5 (NV5M) sau 10 ngày cho ăn kháng sinh,

cho thấy rằng cá gây nhiễm với *A. dhakensis* V7L có thể đã kích thích sự gia tăng số lượng *Aeromonas/Vibrio* spp. Thật vậy, nghiên cứu trước đây (Austin và Al-Zahrani, 1988) cũng cho thấy rằng 30% vi khuẩn phân lập từ nước ở nhóm cá hồi (rainbow trout) đối chứng và 100% vi khuẩn nuôi cấy từ nước ở nhóm cá cho ăn thức ăn bổ sung erythromycin trong 10 ngày thí nghiệm kháng với erythromycin.

Hầu hết các vi khuẩn gram âm dương như không bị ảnh hưởng bởi erythromycin. Trong một nghiên cứu khác về ảnh hưởng của erythromycin trên hệ vi sinh vật đường ruột của cá hồi (Chinook Salmon) (Moffitt và Mobin, 2006), mật độ các vi khuẩn ở ruột cá khác biệt hoàn toàn giữa nhóm đối chứng và nhóm cho ăn thức ăn bổ sung erythromycin trong thời gian thí nghiệm (26 ngày). Cũng theo nghiên cứu trên, *Aeromonas* spp. kháng erythromycin được ghi nhận ở nhóm cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh mà không có ở nhóm đối chứng trong thời gian thí nghiệm, trong khi đó *Pseudomonas* spp. mặc dù không xuất hiện trong thời gian thí nghiệm với kháng sinh nhưng là giống vi khuẩn (gram âm) kháng erythromycin chiếm ưu thế trong ruột cá ở cả hai nhóm thí nghiệm sau khi dùng cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh 25 ngày. Điều này cho thấy rằng các vi khuẩn kháng kháng sinh có thể đã lan truyền đặc tính kháng cho các thành viên khác của cùng một loài vi khuẩn cũng như vi khuẩn trong một chi hoặc loài khác (Munita và Arias, 2016). Ngoài ra, sự gia tăng quá mức các vi khuẩn kháng erythromycin ở ruột có thể dẫn đến sự gia tăng sự hiện diện của chúng ở các cơ quan khác (như sự khác biệt về số lượng *Aeromonas/Vibrio* phân lập từ thận cá ở hai nhóm 3 và 6, hình 1B) bằng phương thức xâm lấn. Điều này phù hợp với báo cáo của Austin và Austin (1999), các vi khuẩn thuộc giống *Aeromonas* và *Vibrio* có thể gây bệnh bằng cách xâm lấn đến các cơ quan khác thông qua đường tiêu hóa.

Đối với thận cá, sau 5 ngày cho ăn liên tục với kháng sinh, số lượng vi khuẩn kháng erythromycin ở nhóm gây nhiễm và cho ăn kháng sinh (nhóm 3 và nhóm 5) cao hơn đáng kể

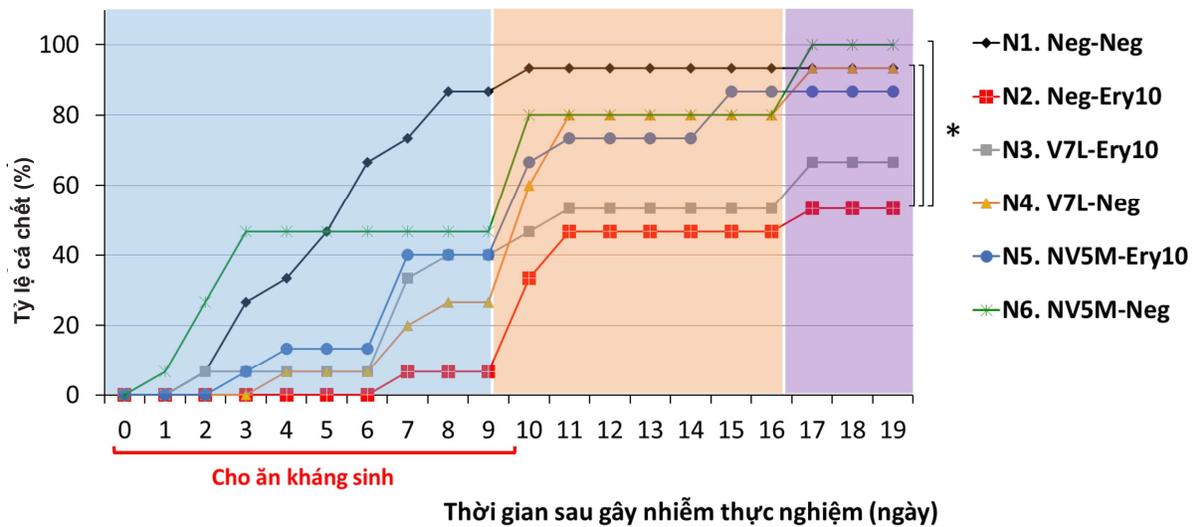
($P < 0,01$ và $P < 0,001$) so với nhóm không gây nhiễm và không cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh (nhóm 1). Tương tự, thí nghiệm gây nhiễm không cho ăn kháng sinh (nhóm 6, nhóm 4) có số lượng vi khuẩn kháng erythromycin nhiễm thấp hơn đáng kể ($P < 0,05$ và $P < 0,001$) so với nhóm gây nhiễm cho ăn kháng sinh (nhóm 3, nhóm 5) (hình 1B). Kết quả cho thấy rằng nếu cá bệnh do nhiễm vi khuẩn đa kháng và điều trị bằng chính kháng sinh đã kháng sẽ làm tăng số lượng vi khuẩn kháng kháng sinh đó.

Đối với cá không gây nhiễm và cho ăn kháng sinh (nhóm 2) kéo dài 10 ngày có thể làm tăng đáng kể số lượng *Aeromonas/Vibrio* spp. kháng erythromycin so với nhóm gây nhiễm cho ăn kháng sinh (nhóm 5) (hình 1B,

ngày 10), điều này cho thấy rằng việc sử dụng kháng sinh kéo dài có thể cảm ứng thay đổi số lượng vi khuẩn nội tại kháng chính loại kháng sinh đang sử dụng. Ngoài ra, cá nhiễm *A. dhakensis* V7L đa kháng và không cho ăn kháng sinh (nhóm 4) cũng có thể kích thích gia tăng số lượng vi khuẩn kháng erythromycin có thể do truyền các gen kháng trong cùng hệ sinh thái bằng hình thức ví dụ như tiếp hợp (Leungtongkam và ctv, 2018).

3.4. Tỷ lệ cá sống/chết sau khi gây nhiễm thực nghiệm và cho ăn thức ăn bổ sung erythromycin

Kết thúc thí nghiệm gây nhiễm thực nghiệm, tỷ lệ cá chết cao nhất được ghi nhận ở nhóm 1 (100%), 4 và 6 (93,33%) (hình 2).



Hình 2. Tỷ lệ cá sống/chết trong thí nghiệm gây nhiễm thực nghiệm và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh. *: $P < 0,05$

Các nhóm này đều là các nhóm không cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh. Trong nhóm cho ăn thức ăn bổ sung erythromycin, cá gây nhiễm ở nhóm 3 và nhóm 5 có tỷ lệ chết cao nhưng không đáng kể so với cá ở nhóm 2 ($P > 0,05$, hình 2). Điều này cho thấy chủng *A. dhakensis* trong cá có thể đã thể hiện tính kháng kháng sinh đang sử dụng và gây độc. Mặt khác, sau

khi dùng cho ăn kháng sinh, tỷ lệ chết ở nhóm 2 tăng đáng kể ($P = 0,035$) lên 46,67% (ngày 11), tuy nhiên tỷ lệ sống vẫn cao hơn rõ rệt ($P = 0,014$) so với nhóm đối chứng và nhóm không ăn kháng sinh (nhóm 1, 4 và 6).

Nhóm gây nhiễm với chủng *A. dhakensis* V7L cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh (nhóm

3) có tỷ lệ chết sau cùng thấp hơn không đáng kể (66,67% và 93,33%; $P > 0,05$) so với nhóm không cho ăn kháng sinh (nhóm 4). Sau khi dừng cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh ở nhóm gây nhiễm với V7L (nhóm 3), tỷ lệ chết tiếp tục tăng từ 40% lên 66,67% ở ngày 17 ($P > 0,05$). Tương tự, kết quả gây nhiễm với chủng NV5M đa kháng cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh (nhóm 5) có tỷ lệ chết sau cùng không khác biệt (86,67% và 100%, $P > 0,05$) so với nhóm cho ăn thức ăn không bổ sung kháng sinh (nhóm 6).

Nhìn chung, các kết quả thí nghiệm trên cá cho thấy rằng kháng sinh có thể không bảo vệ hiệu quả khi cá đã được gây nhiễm trước chủng đa kháng NV5M hoặc V7L. Rõ ràng, nhóm cá gây nhiễm với NV5M (nhóm 5) có tỷ lệ chết tăng đáng kể ($P = 0,021$); từ 40% lên 86,67% ở ngày 15 sau khi dừng cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh (ngày 10). Tỷ lệ cá chết sau 15 ngày ở nhóm 5 cao hơn đáng kể (86,67% và 46,67%, $P = 0,05$) so với nhóm 2 (đều có sử dụng kháng sinh). Điều này cho thấy rằng chủng NV5M có thể đã tự duy trì hoặc kích hoạt *Aeromonas/Vibrio* spp. khác, làm tăng độc lực gây bệnh và chết cá. Kết quả này đồng thuận với báo cáo tổng kết trước đây của Xiong và ctv (2019) về việc chuyển gen kháng thuốc giữa các vi khuẩn gây bệnh, tạo điều kiện thuận lợi cho sự xâm nhập và tăng cường độc lực của vi khuẩn gây bệnh khi lạm dụng kháng sinh. Vì vậy, việc sử dụng kháng sinh điều trị sẽ không hiệu quả nếu cá đã nhiễm bệnh bởi vi khuẩn đa kháng NV5M.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hiện tại đã cho thấy cá rô đồng nhiễm vi khuẩn *A. dhakensis* kháng erythromycin có thể gây ảnh hưởng đến kết quả điều trị khi dùng lại kháng sinh erythromycin với tỷ lệ cá chết sau cùng cao hơn so với nhóm thí nghiệm không gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh. Chủng NV5M có thể đã tự duy trì hoặc kích thích các vi khuẩn *Aeromonas/Vibrio* spp. khác, làm tăng độc lực gây bệnh và

chết cá. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng việc sử dụng kháng sinh kéo dài có thể làm thay đổi số lượng vi khuẩn nội tại kháng lại loại kháng sinh đã sử dụng và sẽ dẫn đến các bệnh đặc biệt khó kiểm soát. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đóng góp thông tin quan trọng về sự ảnh hưởng của kháng sinh erythromycin lên sức khỏe của cá rô đồng giống, hướng tới thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản bằng phương pháp thân thiện khác.

Các nghiên cứu tiếp theo cần làm sáng tỏ cơ chế làm xuất hiện hiện tượng siêu kháng, phân tích các đặc điểm phân tử của các gen kháng thuốc của chủng siêu kháng. Cùng quan điểm với Lim và ctv (2016), kết quả nghiên cứu này đề xuất một yêu cầu nghiêm ngặt để kiểm soát việc sử dụng kháng sinh phòng và trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Quỹ nghiên cứu Khoa học và công nghệ, Trường đại học Công nghệ, TP. HCM đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al Faruk, Antor Hossain, Abdulla-Al-Asif, Md. Nurul Mahmud Bhuiyan, Md. Jahangir Sarker, 2018. Culture and management techniques of Vietnamese Koi. *Asian Australas J Biosci Biotechnol.* 3(2): 93-105.
2. Aoki, T., 1988. Drug resistance plasmids from fish pathogens. *Microbiol. Sci.* 5: 219-223.
3. Austin, B., and Al-Zahrani, A.M.J., 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal micro flora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 33:1-14
4. Austin, B., Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. *Springer Science & Business Media.*
5. Cabello, F.C, Godfrey, H.P, Tomova, A., Ivanova, L, Dölz, H., Millanao, A.,

- Buschmann, A.H., 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15:1917–1942.
6. CLSI, 2006. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Approved guideline VET03-A. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.*
7. Crumlish, M., Dung, T.T. *et al.*, 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.* 25: 733- 736.
8. Leungtongkam, U., Thummeepak, R., Tasanapak, K., Sitthisak, S., 2018. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 13(12): e0208468.
9. Moffitt, R.M and Mobin, S.M.A., 2006. Profile of microflora of the posterior intestine of *Chinook Salmon* before, during, and after administration of rations with and without erythromycin. *North American Journal of Aquaculture* 68:176–185, 2006 DOI: 10.1577/A05–013.1
10. Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 4(2).
11. Nguyễn Hữu Thịnh *et al.*, 2011. Một trường hợp nhiễm nặng *Trypanosoma* sp. trên cá rô đồng (*Anabas testudinus*) nuôi thâm canh. Khoa Thủy Sản, Trường ĐH Nông Lâm TP. HCM.
12. Nguyễn Phước Minh, 2012. *Nghiên cứu định lượng kháng sinh erythromycin trong tôm, cá bằng kỹ thuật sóng vuông quét nhanh trên cực giọt chậm và khả năng đào thải.* Luận án tiến sỹ, Đại học Bách Khoa TP.HCM.
13. Nguyen, T.L., Park, C.I., and Kim, D.H., 2017. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture* 471, 113–120.
14. Van, P.T., 2005. Current status of aquaculture veterinary drugs usage for aquaculture in Vietnam. *Workshop on antibiotic resistance in Asian aquaculture environments.* Chiang Mai, Thailand. ISBN 88-901344-3-7.
15. Xiong, J.B., Nie, L., Chen, J., 2018. Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity. *Zoological research* 40(2), 70–76.
- Ngày nhận 27-9-2019
Ngày phản biện 26-10-2019
Ngày đăng 1-9-2020