

# XÂY DỰNG QUI TRÌNH KIỂM TRA KHÁNG SINH ĐỒ CỦA VI KHUẨN GÂY BỆNH GAN THẬN MỦ TRÊN CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPHthalmus*) TRONG ĐIỀU KIỆN THỰC ĐỊA

Nguyễn Thị Bạch Mai

Khoa Thủy Sản, Đại học Nông lâm TP.HCM

Email: [bachmai77@yahoo.com](mailto:bachmai77@yahoo.com)

## ABSTRACT

A study was conducted to develop a field antibiogram test in comparison with the standard antibiogram test for *Edwardsiella ictaluri* on Tra fish. In this study, 30 diseased fish were sampled at Phu Da islet, Vinh Long province. Antibiogram tests for *E. ictaluri* in liver, spleen and kidney of the diseased fish with 4 antibiotics (doxycyclin, tetracyclin, amoxicillin and florfenicol) was performed following a standard protocol and three field protocols. The field protocols are being applied by Aquatic animal health companies to quickly testing disease on cultured Tra fish. The results of the present study indicated that: (1) there was no significant difference ( $P>0.05$ ) in diameter of zone of inhibition between 24 and 48 hours for doxycyclin when testing on the same organ with the same method whereas there were significant differences ( $P<0.05$ ) in that for amoxicillin and tetracyclin. However, there was no statistical difference in antibiotic sensitivity of *E. ictaluri* between 24 and 48 hours to the four antibiotics tested on all of the organs with the applied methods; (2) there were no significant differences in antibiotic sensitivity at 24 hours of *E. ictaluri* between Bauer Kirby method and the field methods when testing the same antibiotic on the same organ; (3) all of three field methods could be applied as an antibiogram test in identifying sensitivity of *E. ictaluri* to antibiotic in the field.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây nghề nuôi cá tra ở nước ta phát triển rất nhanh đã góp phần tích cực vào việc nâng cao nguồn thu nhập của cộng đồng và tăng kim ngạch xuất khẩu. Tuy nhiên, cá tra nuôi thường gặp phải bệnh nghiêm trọng là gan thận mủ, bệnh này gây thiệt hại rất lớn cho nghề nuôi. Đây là bệnh do vi khuẩn nên hướng điều trị chủ yếu là sử dụng kháng sinh. Để xác định tính kháng kháng sinh của vi khuẩn cần thực hiện thử nghiệm kiểm tra kháng sinh đồ. Phương pháp kháng sinh đồ được sử dụng hiện nay là phương pháp Bauer Kirby. Đây là phương pháp cho kết quả chính xác nhưng lại tốn nhiều thời gian (6 – 7 ngày). Thời gian chờ đợi trước khi điều trị này là quá lâu đối với người nuôi cá; một khi dịch bệnh bùng phát thì thiệt hại do bệnh là rất lớn (tỷ lệ cá chết có thể lên đến 90% trên cá tra giống và 50% trên cá tra nuôi thịt) (Nguyễn Hữu Thịnh và Trương Thanh Loan, 2007). Vì vậy, để có kết quả kiểm tra kháng sinh đồ của vi khuẩn gây bệnh trong thời gian ngắn hơn và đáng tin cậy là nhu cầu chính đáng từ thực tiễn sản xuất.

Hiện nay, các phòng xét nghiệm của các Công ty thuốc Thủy sản và các Công ty Nuôi trồng Thủy Sản thực hiện kháng sinh đồ trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm bằng cách sử dụng dịch nghiền từ thận cá bệnh. Bên cạnh đó, kháng sinh đồ trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm còn được thực hiện bằng cách sử dụng dịch mẫu thu bằng tăm bông vô trùng từ thận cá bệnh (Furones, 2001). Các phương pháp kiểm tra nhanh sự nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh này đã góp phần nâng cao hiệu quả điều trị bệnh bằng việc sử dụng kháng sinh phù hợp trong giai đoạn bệnh mới bắt đầu. Tuy nhiên, việc áp dụng các phương pháp này còn tùy tiện và chưa có nghiên cứu kiểm chứng. Do đó, việc nghiên cứu xây dựng một phương pháp làm kháng sinh đồ nhanh, đơn giản nhưng kết quả đáng tin cậy là một việc làm cần thiết.

## VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu dùng trong thí nghiệm

- Cá tra bị bệnh gan thận mũ tại các ao nuôi ở cồn Phú Đa, tỉnh Vĩnh Long.
- Môi trường Brain Heart Infusion Agar (BHIA)
- Đĩa giấy tẩm kháng sinh tetracycline 30 µg (TC), doxycycline 30 µg (DXC) và amoxycillin 10 µg (AML) của công ty Nam Khoa (Việt Nam) và florfenicol 30 µg (FFC) của công ty Oxoid (Anh).
- Bộ test định danh trực khuẩn Gram âm để mọc IDS-14GNR (công ty Nam Khoa).

### Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp thực hiện kháng sinh đồ trong phòng thí nghiệm:** Phương pháp kháng sinh khuếch tán trên mặt thạch (phương pháp Bauer Kirby).

Kháng sinh đồ theo phương pháp Bauer Kirby được thực hiện với vi khuẩn *E. ictaluri* được phân lập từ gan, thận và lách cá bệnh ở ao nuôi tại cồn Phú Đa, tỉnh Vĩnh Long. Huyền phù vi khuẩn bằng cách chọn vài khuẩn lạc riêng lẻ và có hình dạng, màu sắc điển hình của vi khuẩn *E. ictaluri* (khuẩn lạc của vi khuẩn *E. ictaluri* có màu trắng hơi trong, lồi, tròn với đường kính 0,5 – 2 mm) hòa vào 4 mL nước muối sinh lý và đem lắc đều. Huyền phù phải được pha loãng để có độ đục tương đương với độ đục của ống chuẩn Mc-Farland 0,5. Sau khi huyền phù đã có được độ đục đúng yêu cầu, dùng micropipette hút huyền phù vi khuẩn cho vào hai đĩa môi trường BHIA (0,1 mL/đĩa). Tiến hành trang đều vi khuẩn trong đĩa. Để khô tự nhiên trong 5 – 10 phút, sau đó dùng kẹp khử trùng gấp đĩa giấy có tẩm kháng sinh cho vào đĩa môi trường, nhấn đều xung quanh đĩa kháng sinh. Đem ủ đĩa trong tủ ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Đo đường kính vòng vô khuẩn bằng thước đo với sai số 1 mm tại hai thời điểm là 24 và 48 giờ.

### Các qui trình thực hiện kháng sinh đồ tại thực địa

Vật dụng, dụng cụ thí nghiệm sử dụng trong các phương pháp này đều được khử trùng kỹ, bàn thao tác phải được khử trùng bằng cồn 70%. Cá bệnh được khử trùng bề mặt bằng bông thấm cồn trước khi giải phẫu, ghi nhận lại các dấu hiệu bệnh tích bên ngoài và bên trong các cơ quan, chủ yếu là gan, thận, lách. Sau khi giải phẫu, dùng bông tẩm cồn sát trùng bề mặt nội quan (gan, thận, lách) và lấy mẫu bệnh đối với từng cỡ cá như sau:

+ Đối với cá lớn (từ 50 gram trở lên): Cắt một mẫu nhỏ gan, thận, lách. Cho riêng từng loại vào ống eppendorf đối với phương pháp tẩm bông và phương pháp nghiền hoặc đặt mẫu nội quan này lên đĩa BHIA đối với phương pháp phết.

+ Đối với mẫu cá nhỏ (từ 15 gram trở xuống): thu mẫu gan, thận, lách của 5 - 8 cá theo từng loại, mỗi loại cho vào cùng một ống eppendorf, dùng chày vô trùng đồng nhất mẫu.

+ Đối với cá vừa (lỡ) (từ 15 – 50 gram): ta thu mẫu nội quan của 2 hay 3 cá cho vào cùng một ống eppendorf, dùng chày vô trùng đồng nhất mẫu.

+ Ống eppendorf sử dụng cho phương pháp nghiền phải được cân trọng lượng trước khi cho mẫu vào nhằm xác định trọng lượng mẫu đã thu.

Các qui trình thực hiện kháng sinh đồ tại thực địa có các thao tác thu mẫu bệnh và đưa mẫu bệnh vào môi trường nuôi cấy khác nhau như sau:

### **Qui trình 1: Phương pháp tẩm bông**

Đối với cá trên 50 g, dùng tẩm bông vô trùng nghiền mẫu; trong trường hợp cá nhỏ hơn 50 g, dùng tẩm bông vô trùng nhúng vào ống eppendorf chứa mẫu đã được đông nhất. Tiếp đến nhúng tẩm bông đã thấm mẫu bệnh vào 1 mL nước muối sinh lý. Dùng pipet hút dịch mẫu vi khuẩn cho vào hai đĩa môi trường BHIA (0,1 mL/đĩa). Tiến hành tráng đều vi khuẩn trong đĩa.

### **Qui trình 2: Phương pháp phết**

Đối với cá trên 50 g, dùng kẹp vô trùng gắp phần cơ quan đã cắt quét đều trên đĩa thạch BHI. Trong trường hợp cá nhỏ hơn 50 g, dùng tẩm bông vô trùng nhúng vào ống eppendorf chứa mẫu đã được đông nhất. Sau đó dùng tẩm bông đã thấm mẫu bệnh phết đều lên 2 đĩa BHIA.

### **Qui trình 3: Phương pháp nghiền**

Cân trọng lượng mẫu gan, thận và lách; sau đó nghiền trong nước muối sinh lý theo tỷ lệ 1 đơn vị trọng lượng mẫu/9 thể tích nước muối sinh lý. Dùng pipet hút dịch mẫu cho vào hai đĩa môi trường BHIA (0,1 mL/đĩa). Tiến hành tráng đều vi khuẩn trong đĩa.

Ở cả 3 qui trình, sau khi đưa vi khuẩn vào môi trường BHIA để khô tự nhiên trong 5 – 10 phút. Sau đó dùng kẹp khử trùng gắp đĩa giấy có tẩm kháng sinh cho vào đĩa môi trường, nhấn đều xung quanh đĩa kháng sinh. Đem ủ đĩa trong tủ ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Tiến hành đo đường kính vòng vô khuẩn bằng thước đo với sai số 1 mm tại hai thời điểm là 24 và 48 giờ.

### **Bố trí thí nghiệm**

Thu 30 mẫu cá bệnh từ các ao nuôi cá tra ở cồn Phú Đa, tỉnh Vĩnh Long. Tiến hành thực hiện kháng sinh đồ theo 4 qui trình – 1 qui trình trong phòng thí nghiệm và 3 qui trình tại thực địa gồm có qui trình nghiền, qui trình phết và qui trình tẩm bông – cho mỗi mẫu cá bệnh. Kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu gồm tetracycline (TC), doxycycline (DXC), florfenicol (FFC) và amoxycillin (AML).

## **KẾT QUẢ & THẢO LUẬN**

### **Kết quả kháng sinh đồ ở 24 và 48 giờ**

#### **Kết quả kháng sinh đồ (ĐKVKK) ở 24 và 48 giờ**

Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn ở gan, thận và lách cá bệnh gan thận mù ở Vĩnh Long được trình bày ở bảng 1, 2 và 3.

Kết quả trắc nghiệm F trong cùng phương pháp thực hiện, cùng cơ quan khảo sát và cùng loại kháng sinh cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa ( $P > 0,05$ ) về đường kính vòng kháng khuẩn ở gan, thận và lách cá với kháng sinh DXC ở 24 và 48 giờ. Bên cạnh đó, đối với các phương pháp thực địa thì không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P > 0,05$ ) về đường kính vòng kháng khuẩn của *E. ictaluri* đối với FFC ở thận và lách đo sau 24 giờ và 48 giờ. Tuy nhiên, đường kính vòng kháng khuẩn của AML và TC thì có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 24 giờ và 48 giờ ở cả 4 phương pháp ( $P < 0,05$ ). Đường kính vòng kháng

khuẩn của AML có chiều hướng tăng nhẹ, của TC lại giảm. Điều này liên quan đến tác động kháng khuẩn và thời gian hiệu ứng của kháng sinh. Theo Lý Thị Thanh Loan và ctv (2003), AML thuộc nhóm sát khuẩn và TC thuộc nhóm kháng sinh kìm khuẩn. Đối với AML, tốc độ sát khuẩn phụ thuộc thời gian vi khuẩn tiếp xúc với kháng sinh ở nồng độ lớn hơn hay bằng nồng độ ức chế tối thiểu. Hiệu lực sát khuẩn của kháng sinh này thường xảy ra chậm nên vòng kháng khuẩn của *E. ictaluri* đo ở 24 giờ nhỏ hơn khi đo ở 48 giờ. Đối với TC, kháng sinh này chỉ ức chế sự phát triển chứ không tiêu diệt được vi khuẩn. Do đó, ở nồng độ 30 µg/đĩa, TC chỉ kìm hãm được vi khuẩn trong 24 giờ, sau đó thì vi khuẩn thích nghi dần và phát triển trở lại.

**Bảng 1:** Kết quả kháng sinh đồ trên gan cá sau 24 và 48 giờ ủ ở 30°C

Phương pháp	Kháng sinh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) ± SE	
		24 giờ	48 giờ
Bauer Kirby	AML	25,0 ± 1,9 <sup>a</sup>	28,9 ± 2,2 <sup>b</sup>
	FFC	12,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,3 ± 0,9 <sup>b</sup>
	DXC	20,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	20,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
	TC	14,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	12,2 ± 1,0 <sup>b</sup>
Nghiên	AML	28,1 ± 2,2 <sup>a</sup>	31,7 ± 2,5 <sup>b</sup>
	FFC	13,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	12,8 ± 1,2 <sup>b</sup>
	DXC	20,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	20,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
	TC	15,5 ± 1,4 <sup>a</sup>	12,8 ± 1,3 <sup>b</sup>
Phết	AML	25,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	29,2 ± 2,4 <sup>b</sup>
	FFC	12,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	11,7 ± 0,6 <sup>b</sup>
	DXC	20,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	19,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
	TC	14,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	12,2 ± 1,3 <sup>b</sup>
Tấm bông	AML	29,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	33,0 ± 2,7 <sup>b</sup>
	FFC	13,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	12,6 ± 0,8 <sup>b</sup>
	DXC	20,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	20,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
	TC	15,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	13,1 ± 1,4 <sup>b</sup>

Ghi chú: n = 30; các giá trị trên cùng một hàng có cùng ký tự thì sai khác không có ý nghĩa ở P = 0,05

**Bảng 2:** Kết quả kháng sinh đồ trên thận cá sau 24 và 48 giờ ủ ở 30°C

Phương pháp	Kháng sinh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) ± SE	
		24 giờ	48 giờ
Bauer Kirby	AML	25,2 ± 1,9 <sup>a</sup>	29,1 ± 2,3 <sup>b</sup>
	FFC	11,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	10,8 ± 0,9 <sup>b</sup>
	DXC	20,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	20,5 ± 0,8 <sup>a</sup>
	TC	14,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	12,4 ± 0,9 <sup>b</sup>
Nghiên	AML	27,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	31,0 ± 2,4 <sup>b</sup>
	FFC	13,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	12,9 ± 1,0 <sup>a</sup>
	DXC	21,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	21,1 ± 0,6 <sup>a</sup>
	TC	15,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	12,5 ± 1,4 <sup>b</sup>
Phết	AML	24,2 ± 1,9 <sup>a</sup>	27,0 ± 2,1 <sup>b</sup>
	FFC	12,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,8 ± 0,9 <sup>a</sup>
	DXC	19,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,6 <sup>a</sup>
	TC	13,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	10,8 ± 1,2 <sup>b</sup>
Tấm bông	AML	28,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	32,3 ± 2,5 <sup>b</sup>
	FFC	13,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	13,2 ± 1,0 <sup>a</sup>
	DXC	21,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	21,4 ± 0,7 <sup>a</sup>
	TC	15,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	13,1 ± 1,5 <sup>b</sup>

Ghi chú: (như bảng trên)

**Bảng 3:** Kết quả kháng sinh đồ trên lách cá sau 24 và 48 giờ ủ ở 30°C

Phương pháp	Kháng sinh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) ± SE	
		24 giờ	48 giờ
Bauer Kirby	AML	24,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	28,9 ± 2,3 <sup>b</sup>
	FFC	11,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,1 ± 0,9 <sup>b</sup>
	DXC	20,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	19,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
	TC	14,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	12,4 ± 1,0 <sup>b</sup>
Nghiên	AML	27,7 ± 2,2 <sup>a</sup>	31,2 ± 2,2 <sup>b</sup>
	FFC	13,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	12,9 ± 1,1 <sup>a</sup>
	DXC	21,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	21,2 ± 0,7 <sup>a</sup>
	TC	15,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	12,8 ± 1,4 <sup>b</sup>
Phết	AML	25,8 ± 2,0 <sup>a</sup>	28,4 ± 2,2 <sup>b</sup>
	FFC	11,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,7 ± 0,9 <sup>a</sup>
	DXC	19,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	19,8 ± 0,8 <sup>a</sup>
	TC	13,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	11,8 ± 1,4 <sup>b</sup>
Tăm bông	AML	30,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	33,6 ± 2,8 <sup>b</sup>
	FFC	12,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	12,7 ± 1,1 <sup>a</sup>
	DXC	20,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	20,6 ± 0,9 <sup>a</sup>
	TC	15,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	13,6 ± 1,7 <sup>b</sup>

Ghi chú: (như bảng trên)

#### Kết quả đánh giá tính nhạy cảm với kháng sinh của *E. ictaluri*

Kết quả phân tích thống kê trong cùng phương pháp thực hiện, cùng cơ quan kiểm tra và cùng loại kháng sinh về đường kính vòng kháng khuẩn của *E. ictaluri* với AML, TC (trong cả 4 phương pháp) và FFC (trong phương pháp Bauer Kirby) có sự khác biệt có ý nghĩa ( $P < 0,05$ ) giữa 24 và 48 giờ. Tuy nhiên kết quả này không làm thay đổi nhận định về sự nhạy cảm của *E. ictaluri* với các loại kháng sinh thử nghiệm. Sự nhạy cảm của *E. ictaluri* đối với các loại kháng sinh ở 24 giờ và 48 giờ được trình bày ở bảng 4. Chúng tôi sử dụng trắc nghiệm  $\chi^2$  để phân tích sự khác nhau về sự nhạy cảm đối với kháng sinh của *E. ictaluri*. Kết quả phân tích thống kê cho thấy giữa 24 và 48 giờ không có sự sai khác có ý nghĩa ( $P > 0,05$ ) về độ nhạy của *E. ictaluri* đối với 4 kháng sinh thử nghiệm ở tất cả cơ quan kiểm tra và phương pháp thực hiện.

**Bảng 4:** Kết quả đánh giá tính nhạy cảm với kháng sinh của *E. ictaluri* trên gan, thận, lách cá tra sau khi ủ ở 30°C

Cơ quan	Kháng sinh	Sự nhạy cảm với kháng sinh của <i>E. ictaluri</i> (Nhạy/Đề kháng)							
		Bauer Kirby		Nghiên		Phết		Tăm bông	
		24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ
Gan	AML	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>
	FFC	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>
	DXC	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	28/2 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>
	TC	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>
Thận	AML	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>
	FFC	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>
	DXC	30/0 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	28/2 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>
	TC	4/26 <sup>a</sup>	4/26 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>
Lách	AML	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>
	FFC	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>
	DXC	28/2 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>	27/3 <sup>a</sup>	27/3 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>	28/2 <sup>a</sup>
	TC	4/26 <sup>a</sup>	4/26 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>

Ghi chú: (như bảng trên)

Theo Alderman và Smith (2001), thời gian ủ vi khuẩn trong thử nghiệm kháng sinh đồ là 24 – 28 giờ và 44 – 48 giờ. Bên cạnh đó, CLSI (2005) khuyến cáo, trong thử nghiệm kháng sinh đồ trên vi khuẩn họ đường ruột (*Enterobacteriaceae*) nên ủ vi khuẩn ở 22°C trong 24 – 48 giờ và/hoặc 44 – 48 giờ hoặc ủ ở 28°C trong 24 – 28 giờ. *E. ictaluri* là một trong những loài khó phát triển của giống *Edwardsiella*, tăng trưởng chậm trên môi trường nuôi cấy. Trên môi trường BHIA ở 26°C, *E. ictaluri* cần 3 ngày (Baxa và ctv, 1990) hoặc từ 36 – 48 giờ ở 28 – 30°C (Plumb, 1994) để mọc thành các khuẩn lạc hình tròn màu trắng. Trong thí nghiệm này, chúng tôi ủ *E. ictaluri* ở 30°C. Do đó, theo thời gian phát triển của vi khuẩn, cần phải đọc kết quả kháng sinh đồ sau 48 giờ ủ. Tuy nhiên, kết quả thí nghiệm cho thấy đối với AML, FFC, DXC và TC, chúng ta có thể rút ngắn thời gian đọc kết quả kháng sinh đồ của *E. ictaluri* từ 48 giờ xuống còn 24 giờ. Điều này cũng phù hợp với khuyến cáo của CLSI (2005).

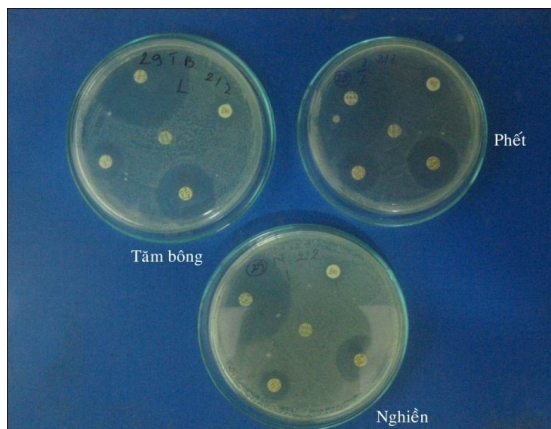
## So sánh kết quả kháng sinh đồ ở 24 giờ của các phương pháp

### Kết quả kháng sinh đồ (ĐKVKK)

Kết quả phân tích thống kê (t bất cặp) về đường kính vòng kháng khuẩn ở 24 giờ của *E. ictaluri* giữa phương pháp chuẩn và 3 phương pháp thực địa trong cùng loại kháng sinh được trình bày ở bảng 5.

Kết quả kháng sinh đồ (ĐKVKK) giữa các phương pháp thực hiện trong cùng cơ quan kiểm tra, cùng loại kháng sinh cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn trung bình của phương pháp phết tương đương với phương pháp Bauer Kirby; của phương pháp nghiền và phương pháp tăm bông lớn hơn phương pháp Bauer Kirby.

Phương pháp Bauer Kirby là phương pháp thường được sử dụng trong việc xác định sự nhạy cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh ở các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên khi so sánh với phương pháp nghiền và phương pháp tăm bông thì có đường kính vòng kháng khuẩn nhỏ hơn. Theo Alderman và Smith (2001), huyền phù dùng trong thử nghiệm kháng sinh đồ phải có mật độ vi khuẩn từ  $1 - 2 \times 10^8$  cfu/mL. Mật độ vi khuẩn thấp hoặc cao hơn đều ảnh hưởng đến đường kính vòng kháng khuẩn. Mật độ vi khuẩn trong dịch nghiền gan và lách (khi thu mẫu bệnh bằng tăm bông) thường ở mức thấp của khoảng mật độ vi khuẩn thích hợp cho thử nghiệm kháng sinh đồ. Trong khi đó, mật độ vi khuẩn trong gan thận lách cá tra nhiễm bệnh thực nghiệm bởi *E. ictaluri* vào thời gian cá chết nhiều lại cao hơn  $2 \times 10^8$  cfu/mL. Mật độ vi khuẩn cao và thấp hơn  $1 - 2 \times 10^8$  cfu/mL là nguyên nhân làm cho đường kính vòng kháng khuẩn của phương pháp tăm bông và phương pháp nghiền lớn hơn phương pháp Bauer Kirby.



**Hình 1** Kết quả kháng sinh đồ của *E. ictaluri* ở lách cá bệnh theo 3 phương pháp thực địa

**Bảng 5:** Kết quả kháng sinh đồ (ĐKVKK) của *E. ictaluri* ở các phương pháp sau khi ủ ở 30°C, 24 giờ

Cơ quan	Kháng sinh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) ± SE			
		Bauer Kirby	Nghiên	Phết	Tăm bông
Gan	AML	25,0 ± 1,9 <sup>a</sup>	28,1 ± 2,2 <sup>b</sup>	25,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	29,0 ± 2,4 <sup>b</sup>
	FFC	12,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	13,2 ± 1,1 <sup>b</sup>	12,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	13,1 ± 0,8 <sup>b</sup>
	DXC	20,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	20,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	20,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
	TC	14,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	15,5 ± 1,4 <sup>b</sup>	14,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	15,4 ± 1,4 <sup>b</sup>
Thận	AML	25,2 ± 1,9 <sup>a</sup>	27,6 ± 2,1 <sup>b</sup>	24,2 ± 1,9 <sup>a</sup>	28,9 ± 2,3 <sup>b</sup>
	FFC	11,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	13,2 ± 1,0 <sup>b</sup>	12,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	13,3 ± 1,0 <sup>b</sup>
	DXC	20,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	21,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	19,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	21,4 ± 0,7 <sup>b</sup>
	TC	14,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	15,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	13,3 ± 1,3 <sup>b</sup>	15,6 ± 1,6 <sup>a</sup>
Lách	AML	24,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	27,7 ± 2,2 <sup>b</sup>	25,8 ± 2,0 <sup>a</sup>	30,7 ± 2,5 <sup>b</sup>
	FFC	11,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	13,0 ± 1,1 <sup>b</sup>	11,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	12,9 ± 1,1 <sup>a</sup>
	DXC	20,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	21,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	19,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	20,4 ± 0,8 <sup>a</sup>
	TC	14,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	15,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	13,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	15,9 ± 1,7 <sup>a</sup>

Ghi chú: (như bảng trên)

### Kết quả đánh giá sự nhạy cảm với kháng sinh của *E. ictaluri*

Kết quả đánh giá sự nhạy cảm của *E. ictaluri* với kháng sinh được trình bày ở bảng 6.

**Bảng 6:** Kết quả đánh giá sự nhạy cảm với kháng sinh của *E. ictaluri* trên gan, thận, lách cá tra sau khi ủ ở 30°C, 24 giờ

Cơ quan	Kháng sinh	Sự nhạy cảm của <i>E. ictaluri</i> với kháng sinh (Nhạy/Đề kháng)			
		Bauer Kirby	Nghiên	Phết	Tăm bông
Gan	AML	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>
	FFC	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>
	DXC	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	28/2 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>
	TC	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>
Thận	AML	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>
	FFC	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>
	DXC	30/0 <sup>a</sup>	30/0 <sup>a</sup>	28/2 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>
	TC	4/26 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>
Lách	AML	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>	23/7 <sup>a</sup>
	FFC	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>	1/29 <sup>a</sup>
	DXC	28/2 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>	27/3 <sup>a</sup>	29/1 <sup>a</sup>
	TC	4/26 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>	3/27 <sup>a</sup>

Ghi chú: (như bảng trên)

Kết quả trắc nghiệm  $\chi^2$  cho thấy khi phân tích trong cùng cơ quan kiểm tra, cùng loại kháng sinh không có sự khác biệt có ý nghĩa về sự nhạy cảm với kháng sinh giữa phương pháp Bauer Kirby với các phương pháp thực địa ( $P > 0,05$ ). Khi thực hiện kháng sinh đồ theo phương pháp chuẩn cần phải chọn một khuẩn lạc riêng rẽ có hình dạng và màu sắc đặc trưng của *E. ictaluri* để cấy thuần (Furones, 2001; Alderman và Smith, 2001). Sau đó mới dùng 1 – 2 khuẩn lạc (tùy vào kích thước khuẩn lạc) (Furones, 2001) hoặc tối thiểu 3 khuẩn lạc (Alderman và Smith, 2001) từ đĩa vi khuẩn thuần để pha huyền phù vi khuẩn và thực hiện kháng sinh đồ. Trong khi đó, vi khuẩn sử dụng trong các phương pháp thực địa là tập hợp của nhiều chủng vi khuẩn *E. ictaluri* có trong gan, thận và lách cá tra bị bệnh. Trong thí nghiệm này, tập hợp các tế bào vi khuẩn *E. ictaluri* sử dụng trong các phương pháp thực địa và chủng vi khuẩn *E. ictaluri* thuần dùng trong phương pháp Bauer Kirby có độ nhạy với kháng sinh



tương đương nhau. Do đó, không có sai khác về kết quả đánh giá tính nhạy cảm với kháng sinh của *E. ictaluri* ở các phương pháp thực địa và phương pháp Bauer Kirby.

Khi xác định sự nhạy cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh, chúng ta đều thực hiện thử nghiệm kháng sinh đồ. Sau khi có kết quả vòng kháng khuẩn, sẽ dựa vào tiêu chuẩn đường kính vòng kháng khuẩn của NCCLS để xác định xem vi khuẩn nhạy cảm hay kháng đối với loại kháng sinh thử nghiệm. Từ đó xác định được loại kháng sinh thích hợp trong điều trị bệnh. Do đó, từ kết quả về sự nhạy cảm của *E. ictaluri* giữa các phương pháp trong cùng cơ quan kiểm tra, cùng loại kháng sinh chúng tôi cho rằng phương pháp nghiên, phương pháp phết và phương pháp tẩm bông có thể dùng để thực hiện thử nghiệm sự nhạy cảm của vi khuẩn *E. ictaluri* đối với kháng sinh tại thực địa.

## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy giữa phương pháp Bauer Kirby với các phương pháp thực địa không có sự khác biệt có ý nghĩa về kết quả đánh giá tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn *E. ictaluri*. Như vậy, các phương pháp thực địa có thể dùng để thực hiện thử nghiệm sự nhạy cảm của vi khuẩn *E. ictaluri* đối với kháng sinh tại thực địa và khi áp dụng các phương pháp này, thời gian thực hiện thử nghiệm kháng sinh đồ đã giảm từ 6 – 7 ngày (theo phương pháp Bauer Kirby) xuống 1 ngày. Điều này góp phần nâng cao hiệu quả điều trị bệnh cá thông qua việc sử dụng kháng sinh phù hợp trong giai đoạn bệnh mới bắt đầu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu tiếng Việt

Lý Thị Thanh Loan, Phạm Võ Ngọc Ánh, Mã Tú Lan, Trương Hồng Việt, Phạm Văn Điền, 2003. *Chọn lọc và thử nghiệm để tìm ra một vài loại kháng sinh có thể thay thế Chlorramphenicol và Nitrofurans không được phép sử dụng trong ương nuôi ấu trùng tôm sú và cá tra, cá basa*. Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II, 88 trang

Nguyễn Hữu Thịnh và Trương Thanh Loan, 2007. *Phân lập và khảo sát đặc điểm kháng kháng sinh của Edwardsiella ictaluri gây bệnh gan thận mũ trên cá tra, Pangasius hypophthalmus, nuôi thâm canh*. Tạp chí KHKT Nông Lâm Nghiệp, Số 1&2: 175 – 179

### Tài liệu tiếng Anh

Alderman, D.J., Smith, P., 2001. *Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases*. Journal of Aquaculture 196: 211–243

Baxa, D.V., Groff, J.M., Wishkovsky, A., and Hedrick R.P., 1990. *Susceptibility of nonictalurid fishes to experimental infection with Edwardsiella ictaluri*. Journal Diseases of Aquatic Organism 8:113 – 117

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. *Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals: proposed guideline*. CLSI document M42-P [ISBN 1-56238-576-3]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA

Furones, D.M., 2001. *Sampling for antimicrobial sensitivity testing: a practical consideration*. Journal of Aquaculture 196: 303 – 309

Plumb, J.A., 1994. *Edwardsiella Septicaemia*. In Bacterial diseases of fish (Eds. I. Valerie, R.J. Roberts and N.R. Bromage). Blackwell, Oxford, UK, 59 - 79