

Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh của một số chủng vi khuẩn gây bệnh phân lập từ cá rô đồng (*Anabas testudineus*) ở các trang trại trên địa bàn Thành Phố Hồ Chí Minh

Multi-antibiotic resistant bacteria from Vietnamese climbing perch (*Anabas testudineus*) on fish farms in Ho Chi Minh City

Trần Kiên Cường¹, Huỳnh Trần Thục Đoan¹, Phan Tiến Dũng¹,
Nguyễn Thành Luân², Phạm Thị Hải Hà^{1*}

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam

²Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (HUTECH), Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: pthha@ntt.edu.vn

ARTICLE INFO

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.17.2.2249.2022

Ngày nhận: 20/04/2022

Ngày nhận lại: 12/05/2022

Duyệt đăng: 02/06/2022

Từ khóa:

Anabas testudineus; bệnh trên cá; cá rô đồng Việt Nam; kháng kháng sinh; 16S rRNA

Keywords:

Anabas testudineus; fish diseases; Vietnamese climbing perch; antibiotic resistance; 16S rRNA

ABSTRACT

Giới thiệu: Cá rô đồng (*Anabas testudineus*) hiện đang là đối tượng nuôi có giá trị kinh tế cao, phân bố nhiều quốc gia trong đó có Việt Nam. Việc lạm dụng kháng sinh, hóa chất kháng khuẩn đang gây nhiều tác động tiêu cực tới môi trường cũng như con người.

Vật liệu và phương pháp: Nghiên cứu thu nhận những mẫu cá rô đồng có các dấu hiệu nghi ngờ nhiễm bệnh và tiến hành phân lập khuẩn từ các mẫu cá thu nhận. Vi khuẩn phân lập được kiểm tra đặc tính hình thái, đặc trưng sinh hóa và tiến hành đánh giá tình trạng kháng kháng sinh của chúng bằng phương pháp kháng sinh đồ bằng đĩa giấy tẩm kháng sinh, phương pháp giải trình tự phân tích cây phát sinh loài bằng phần mềm Mega 11, model Kimura-2-parameter bootstrap 1,000 lần được dùng để định danh phân tử bằng gen 16S rRNA.

Kết quả: Nghiên cứu đã phân lập được 14 nhóm vi sinh từ cá rô đồng bệnh/dấu hiệu lạ thu thập từ các trang trại trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh (TP.HCM). Nghiên cứu tiếp tục định danh 04 chủng vi khuẩn có mức độ tương đồng khi so sánh trình tự gen 16S rRNA lần lượt *Pseudomonas aeruginosa* (99.77%), *Aeromonas dhakensis* (99.93%), *Kosakonia sacchari* (100%), và *Edwardsiella ictaluri* (99.44%).

Kết luận: Kết quả thu nhận 04 chủng khuẩn giải trình tự có hiện trạng đa kháng kháng sinh trên cá rô đồng *A. testudineus* đang lưu hành ở TP.HCM.

ABSTRACT

Introduction: The Vietnamese climbing perch (*Anabas testudineus*) is a farmed species with significant economic value that is extensively disseminated in numerous countries, including Vietnam. Antibiotic and antibacterial drugs have

been abused in climbing perch aquaculture. These antibiotic-resistant bacteria and/or genes can result in negative effects on public health and the environment.

Materials and methods: The study collected samples of perch with suspicious signs of infection and isolated bacteria from the collected fish samples. Isolated bacteria were examined for morphological and biochemical characteristics and evaluated for their antibiotic resistance by antibiotic-immersed paper discs, sequencing methods, and phylogenetic tree analysis methods using Mega 11 software, model Kimura-2-parameter bootstrap 1,000 times, which was used to identify molecules by the 16S rRNA gene.

Results: In this study, 14 bacterial colonies were identified in Vietnamese climbing perch collected from several fish farms in Ho Chi Minh City that had aberrant symptoms on the exterior and within their organs. These bacteria were then put through a series of biochemical experiments to determine their colony morphologies. Following that, gene sequencing was performed, and 4 bacterial strains were found with a high degree of similarity to the 16S rRNA, including *Pseudomonas aeruginosa* (99.7%), *Aeromonas dhakensis* (99.93%), *Kosakonia sacchari* (100%), and *Edwardsiella ictaluri* (99.44%).

Conclusions: 04 strains of sequenced bacteria with multi-antibiotic resistance status were detected in *A. testudineus* perch circulating in a fish farm in Ho Chi Minh City.

1. Giới thiệu

Cá rô đồng (*Anabas testudineus*) là loài cá sống ở các loại hình thủy vực khác nhau như ao, bè, ruộng, và phổ biến nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam (Bailly, Reyes, Atanacio, & Froese, 2010). Gần đây, nghề nuôi cá rô đồng *A. testudineus* phát triển mạnh, phổ biến ở các tỉnh Đông Nam Bộ và Đồng bằng sông Cửu Long vì đây là đối tượng nuôi có giá trị kinh tế cao và được nhiều người tiêu dùng ưa thích do thịt cá ngon, giàu dinh dưỡng, và có giá trị xuất khẩu về nguồn cá giống cũng như nguồn cá thịt thương phẩm. Tuy nhiên, việc thâm canh hóa ô ạt cùng với sự biến đổi khí hậu khiến các vi sinh vật gây hại/dịch bệnh bùng phát liên tục trong các trang trại nuôi cá. Các vi khuẩn gây bệnh đặc biệt thường gặp ở cá nước ngọt bao gồm *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., và *Mycobacterium* spp. (Banerjee, Nandi, & Ray, 2017; Cipriano, 2001; Lio-Po & Lim, 2014; Meyer & Bollock, 1973; Woo & Gregory, 2014). Bên cạnh đó, việc lạm dụng kháng sinh, hóa chất kháng khuẩn trong nuôi trồng thủy sản đã và đang gây nhiều tác động tiêu cực, kìm hãm tăng trưởng, tích lũy thuốc trong cơ thể cá và các động vật thủy sản (FAO, 2003; Harikrishnan, Kim, Balasundaram, & Heo, 2012). Hệ quả khiến các thực phẩm thủy hải sản trở thành nguồn chứa các vi khuẩn/gen kháng kháng sinh có thể lây lan từ động vật thủy sản sang người thông qua chuỗi thức ăn, đe dọa nghiêm trọng sức khỏe con người và môi trường. Tình trạng kháng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản kể cả kháng kháng sinh trên người cũng ngày càng gia tăng trầm trọng dẫn đến xuất hiện các chủng vi khuẩn siêu kháng thuốc, mà nguồn thức ăn đưa vào cơ thể

cũng đang là nguyên nhân gián tiếp gây ra tình trạng này (Abutbul, Golan-Goldhirsh, Brazani, & Zilberg, 2004; Cabello, 2006).

Các nghiên cứu từ trước đến nay tại Việt Nam chưa tập trung đánh giá đa dạng tình trạng bệnh nhiễm khuẩn/bệnh gây chết trên cá rô đồng *A. testudineus* mà chỉ đánh giá riêng lẻ vào một loại khuẩn gây bệnh cụ thể trên một đối tượng là cá rô đồng *A. testudineus*. Do đó, nghiên cứu này tiến hành thu nhận, phân lập các chủng vi khuẩn gây bệnh và đóng góp dữ liệu về tình trạng đa kháng kháng sinh và một số biểu hiện bệnh nhiễm khuẩn trên cá rô đồng *A. testudineus* thu thập từ các trang trại trên địa bàn TP.HCM; từ đó hướng tới việc sử dụng các liệu pháp khác an toàn hiệu quả, dần thay thế kháng sinh/hóa chất phòng trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản tương lai.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Địa điểm thí nghiệm

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Vi Sinh của Viện Kỹ Thuật Công Nghệ Cao, trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

2.2. Thu nhận và phân lập vi khuẩn trên cá bệnh/dấu hiệu lạ

Nguồn cá rô đồng bệnh/dấu hiệu lạ được thu nhận từ các trang trại nuôi cá thuộc các quận trên địa bàn TP.HCM (Quận 12, Quận 9, Quận 8, Thủ Đức, Cần Giờ, ...) vào khoảng thời gian tháng 05 - 10 hàng năm. Cá có các dấu hiệu bệnh như cá ít ăn/bỏ ăn, cá bơi lơ dờ; thân đen, xuất huyết; hoặc thân xuất hiện các vết lở loét; vẩy rụng; đuôi mòn/cụt, ... Các mẫu lách, thận, mang, da, và gan được thu nhận và cấy lên đĩa môi trường Trypton soy agar (TSA, Himedia). Đĩa cấy ủ 24 giờ ở 28°C, sau đó các khuẩn lạc rời được chọn làm thuần, tăng sinh và bảo quản trong môi trường Trypton soy broth (TSB, Himedia) bổ sung 15% glycerol ở -80°C. Vi khuẩn được tái nuôi cấy trên môi trường TSA, kiểm tra đặc điểm, hình thái, sinh lý và sinh hóa trước khi sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

2.3. Xác định đặc điểm, hình thái và sinh hóa

Các vi khuẩn phân lập từ mẫu cá bệnh tiếp tục được kiểm tra các đặc điểm, hình thái, sinh lý và các phản ứng sinh hóa của các vi khuẩn này trên môi trường chuyên biệt nhằm khoanh vùng và định danh sơ bộ về các vi khuẩn phân lập ban đầu. Từng mẫu vi khuẩn lần lượt được thử nghiệm phản ứng sinh hóa qua các môi trường chọn lọc MacConkey, Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS, Himedia), thạch máu, Kligler iron agar (KIA, Himedia), và các phản ứng nhuộm Gram, khí gas, H₂S, Catalase, Oxidase, ... Nguyên lý và các chỉ tiêu theo dõi theo hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng của Bộ Y tế năm 2017 (Luong, Doan, & Nguyen, 2017).

2.4. Xác định tính nhạy cảm với kháng sinh

Các vi khuẩn phân lập được xác định tính kháng và đa kháng kháng sinh qua độ nhạy cảm với kháng sinh. Phương pháp này dựa vào đường kính vùng ức chế, mức độ nhạy cảm có thể phân loại S (Susceptible - nhạy cảm), I (Intermediate - trung gian), R (Resistant - đề kháng), theo hướng dẫn thực hành xét nghiệm của Bộ Y tế năm 2017 (Luong & ctg., 2017) trên môi trường thạch Muller-Hinton Agar (MHA, Himedia) theo phương pháp đĩa khuếch tán kháng sinh của Kirby-Bauer (Hudzicki, 2016). Đĩa giấy kháng sinh đặt lên đĩa vi khuẩn đã trải đều trên môi trường MHA (10³ CFU/ml, theo hướng dẫn của CLSI 2018). Các kháng sinh dùng cho khảo sát bao gồm ampicillin-Am, amoxicillin-Ax, ofloxacin-Of, chloramphenicol-CL, ciprofloxacin-Ci, clindamycin-CL, cefalexin-Cp, doxycyclin-Dx, erythromycin-Er, và tetracyclin-Te (Nam Khoa, Việt Nam). Sau đó, các đĩa thạch ủ 24 giờ ở 28°C và kiểm tra sự kháng theo CLSI (2018).

2.5. Định danh dựa trên sinh học phân tử

DNA của các mẫu vi khuẩn được tách chiết bằng bộ kit TopPURE^R Genomic DNA extraction kit (Công ty TNHH thiết bị ABT, Việt Nam). Sau đó, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi 16S rRNA phổ biến trong định danh phân tử các chủng vi khuẩn có trình tự và chu trình nhiệt xác định (**Bảng 1**).

Sản phẩm PCR được phát hiện bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose nồng độ 1.2% và kiểm tra kết quả. Các sản phẩm thu nhận sau quá trình khuếch đại tiếp tục được giải trình tự bằng Sanger sequencing (KTest, Việt Nam).

Bảng 1

Trình tự mồi và chu trình nhiệt của phản ứng PCR 16S rRNA

Primer	Trình tự	Chu trình nhiệt	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Chu kỳ	Tài liệu tham khảo
27F	5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3'	Biến tính ban đầu	94	5	1	Janda và Abbott (2007); Tu và cộng sự (2010)
		Biến tính	94	1	35	
		Bắt cặp	55	1		
1492R	5' - TS CAA GGT AAA CTT CTA AAG CA - 3'	Kéo dài	72	3	1	
		Kết thúc	72	10		
		Giữ mẫu	4	∞		

Nguồn: Janda và Abbott (2007); Tu và cộng sự (2010)

Trình tự các vi khuẩn được giải được dùng để xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm Mega 11 với thông số model Kimura-2-parameter và bootstrap 1,000 lần. Với các chủng tham chiếu được sử dụng từ ngân hàng cơ sở dữ liệu NCBI.

3. Kết quả thảo luận

3.1. Thu nhận và phân lập vi khuẩn ban đầu từ mẫu cá bệnh

110 mẫu cá rô đồng *A. testudineus* bệnh/dấu hiệu lạ từ các trang trại cá giống thuộc các quận trên địa bàn TP. HCM (Quận 12, Quận 9, Quận 8, Thủ Đức, Cần Giờ, ...), với các dấu hiệu bất thường/biểu hiện bệnh bên ngoài rõ ràng, đặc trưng như cá ít ăn/bỏ ăn; cá bơi lơ lờ; thân đen, xuất huyết hoặc thân xuất hiện các vết lở loét; vẩy rụng; đuôi mòn/cụt được giải phẫu thu bệnh phẩm. Từ đó, 65 mẫu khuẩn lạc nghi ngờ thu nhận được trên môi trường ban đầu TSA, cụ thể gồm 14 nhóm ở Quận 8 (chiếm 21.54%), 14 nhóm ở Quận 9 (chiếm 21.54%), 11 nhóm ở Quận 12 (chiếm 16.92%), 14 nhóm ở Thủ Đức (chiếm 21.54%), và 12 nhóm ở Cần Giờ (18.46%), từ hầu hết các cơ quan phân lập như gan (30/65, chiếm 46.15%), thận (19/65, chiếm 29.23%), và tỳ tạng (18/65, chiếm 27.69%) của cá rô đồng *A. testudineus* bệnh/dấu hiệu lạ (**Bảng 2**).

Ngoài các dấu hiệu cảm quan bên ngoài, cá rô đồng *A. testudineus* bệnh khi thu nhận ở các ao nuôi đều lơ lờ, bơi lội kém linh hoạt, cá bệnh bị cô lập; vẩy bong tróc; đuôi mòn cụt; đầu và phần nắp mang trắng xuróc; mang cá nhạt màu, kèm theo biểu hiện đặc trưng bệnh gan-thận-mủ (cá bệnh có các đốm trắng nhỏ li ti trên da, gan, thận, và tỳ tạng), hoặc bệnh xuất huyết (xuất huyết ở vùng mắt, xung quanh miệng, hậu môn, và ở các vây hoặc có dịch bên trong xoang bụng), hoặc có dấu hiệu nhiễm kép hai loại bệnh trên (**Hình 1** và **Hình 2**).

Bảng 2

Số vi khuẩn ban đầu phân lập từ cá rô đồng *A. testudineus* bệnh ở các trang trại trên địa bàn TP.HCM

STT	Địa điểm thu mẫu	Số cá (con)	Số vi khuẩn	Cơ quan phân lập*
1	Quận 8	24	14	Gan (6), thận (4), lách (5)
2	Quận 9	23	14	Gan (6), thận (5), lách (4)
3	Quận 12	21	11	Gan (7), thận (5), lách (5)
STT	Địa điểm thu mẫu	Số cá (con)	Số vi khuẩn	Cơ quan phân lập*
4	Thủ Đức	22	14	Gan (7), thận (2), lách (3)
5	Cần Giờ	20	12	Gan (4), thận (3), lách (1)
	Tổng	110	65	Gan (30), thận (19), lách (18)

* Các số trong dấu ngoặc là số vi khuẩn phân lập từ cơ quan cá bệnh gan-thận-mù và cá nhiễm kép hai bệnh gan-thận-mù và xuất huyết

Nguồn: Kết quả thu nhận được của nghiên cứu từ các trang trại cá thực tế. Số vi khuẩn ban đầu phân lập từ cá rô đồng *A. testudineus* bệnh ở các trang trại trên địa bàn TP.HCM, cụ thể trên địa bàn Quận 8-9-12-Thủ Đức- Cần Giờ

Từ 65 khuẩn lạc nghi ngờ phát triển trên môi trường TSA ban đầu. Sau mỗi 24 giờ tiến hành cấy chuyển nhiều lần để làm thuần các khuẩn lạc nghi ngờ trên môi trường NA (Nutrient Agar), nghiên cứu chọn lọc được 14 nhóm vi khuẩn thuần nhất (kí hiệu I - XIV) dựa theo đặc điểm hình thái khuẩn lạc. Các vi khuẩn sau khi tách khuẩn lạc thuần được lưu trữ trong môi trường TSB chứa glycerol 15% ở -80°C. Các đặc điểm, hình thái, sinh lý, và sinh hóa cơ bản của vi khuẩn luôn được kiểm tra trước khi sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

3.2. Định danh sơ bộ dựa trên đặc điểm, hình thái và sinh hóa

14 nhóm vi khuẩn sau khi phân lập từ cá bệnh được tiến hành sàng lọc trên ba môi trường chọn lọc MacConkey, thạch máu, và TCBS. Dựa trên kết quả sàng lọc sơ bộ, 13 nhóm vi khuẩn (đã loại bỏ mẫu XI do khuẩn lạc không mọc/xuất hiện trên TSA) được tiếp tục kiểm tra các phản ứng sinh hóa KIA, Catalase, Oxidase, và Simmon citrate. Từ đó, một số đề xuất ban đầu được đưa ra: 01 nhóm bị loại bỏ (XI, do khuẩn lạc không mọc/xuất hiện rất ít trên TSA), 02 nhóm (X và XII) chưa xác định được tên do khuẩn lạc mọc rất yếu do đó cũng không tiếp tục sử dụng, 11 nhóm còn lại được dự đoán thuộc các chi *Yersinia* spp., *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., và *E. coli* kết quả được thể hiện trong **Bảng 3**. Các kết quả định danh sơ bộ dựa trên đặc điểm, hình thái, sinh lý và sinh hóa này có sự trùng khớp với một số nghiên cứu trước đây về vi sinh vật trên các loài thủy sản nước ngọt và ở cá rô đồng *A. testudineus* như Chhanda, Parvez, Rumi, Hosen, và Islam (2019) nghiên cứu phân lập được một số chủng vi khuẩn gây bệnh trên đối tượng *A. testudineus* cho thấy nhóm tác giả đã phân lập được các chủng vi khuẩn gồm *Samonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., và *Staphylococcus* spp., nghiên cứu của L. T. Nguyen (2020), đã định danh được chủng vi khuẩn *Aeromonas dhakensis* gây bệnh trên cá rô đồng, cũng như nghiên cứu của Haque, Banyopadhyay, và Mondal (2020) công bố khả năng gây bệnh của chủng vi khuẩn *Pseudomonas* trên cá rô đồng *A. testudineus*. Tuy nhiên, từ trước đến nay, các nghiên cứu tại Việt Nam chưa tập trung khảo sát và đánh giá về bệnh nhiễm khuẩn gây bệnh và gây chết cá rô đồng *A. testudineus*. Như vậy, việc đánh giá tình trạng nhiễm khuẩn nội quan và phân lập các vi khuẩn từ cá rô đồng bệnh trên địa bàn TP.HCM sẽ cung cấp thông tin cơ bản, chính xác ban đầu cho các nghiên cứu bệnh học thủy sản và cá nước ngọt tiếp theo.

Bảng 3

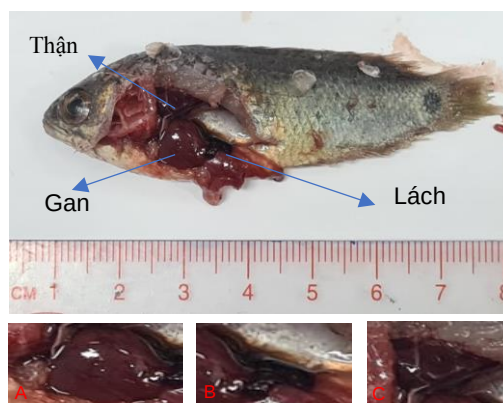
Danh sách nhóm vi sinh vật dự kiến từ các phản ứng sinh hóa cơ bản

STT	Môi trường chọn lọc					Phản ứng sinh hóa						Tên dự kiến
	Macconkey (sau 24 giờ)	TSA	TCBS (sau 48giờ)	Nhuộm Gram	Blood agar	Catalase	Simmon citrate	KIA			Oxidase	
								Reactions Red: Alk Yellow: Acid	Gas	H ₂ S		
I	-	Khuẩn lạc nhỏ Mọc rất kém	-	-	γ	+	-	Alk-Acid	-	-	-	<i>Yersinia spp</i>
II	-	Khuẩn lạc nhỏ, màu vàng nhạt, tâm màu đen	+	-	β	+	+	Alk-Acid	-	-	+	<i>Vibrio spp</i>
III	-	Khuẩn lạc rất lớn, không tròn đều viền trắng nhạt và đục dần ở giữa	-	-	γ	+	+	Alk-Acid	-	+	-	<i>Samonella spp</i>
IV	-	Khuẩn lạc nhỏ vừa viền trong và đục dần ở giữa	-	-	β	+	+	Alk-Alk	-	-	+	<i>Pseudomonas spp</i>
V	-	Khuẩn lạc rất nhỏ, màu trắng sữa	-	-	β	+	+	Alk-Acid	+	+	-	<i>Edwardsiella spp</i>
VI	Khuẩn mọc yếu	Khuẩn lạc tròn, trơn, có màu vàng nhạt	-	+	α	+	-	Alk-Acid	-	-	-	<i>Staphylococcus spp</i>
VII	+	Khuẩn lạc lớn, tròn đều, viền trong nhàn trắng hơi ngả vàng	-	-	γ	+	+	Acid-Acid	++	-	-	<i>Klebsiella spp/ E.coli</i>
VIII	-	Khuẩn lạc to vừa tròn đều, trắng đục	+	-	β	+	-	Alk-Acid	-	-	+	<i>Aeromonas spp</i>
IX	-	Khuẩn lạc lớn, tròn đều, viền trong, nhàn trắng đục	-	-	γ	+	+	Acid-Acid	++	-	-	<i>Enterobacter spp</i>
XIII	Khuẩn mọc yếu	Khuẩn lạc nhỏ, tròn, lồi, màu vàng chanh	-	+	α	+	-	Alk-Acid	-	-	-	<i>Staphylococcus spp</i>
XIV	-	Khuẩn lạc to, tròn đều, viền trong, nhàn trắng đục	-	-	β	+	+	Alk-Acid	+	+	-	<i>Edwardsiella spp</i>

Nguồn: Kết quả nghiên cứu thu nhận được về Danh sách nhóm vi sinh vật dự kiến từ các phản ứng sinh hóa cơ bản



Hình 1. Hình ảnh ngoại thể của cá rô đồng bệnh. Cá rô đồng *A. testudineus* được thu từ trang trại cá giống với các dấu hiệu bệnh/lạ bên ngoài, như (A) đầu và mang bị bong tróc và xuất huyết; (B) vảy bị bong tróc và/hoặc xuất huyết dưới da; (C) đuôi bị ăn mòn cắt, ngắn hơn bình thường



Hình 2. Hình ảnh giải phẫu nội tạng cá rô đồng bệnh. Cá rô đồng *A. testudineus* bệnh/dấu hiệu lạ được giải phẫu và ghi nhận tình trạng nội tạng, như (A) gan bầm đỏ, xuất hiện đốm trắng; (B) tỷ tạng sưng to bất thường; (C) thận đỏ bầm, và sưng to

3.3. Hiện trạng kháng kháng sinh của các vi khuẩn phân lập được

Trong quá trình nuôi thâm canh, thuốc kháng sinh hoặc hóa chất được phối trộn vào thức ăn cho cá. Qua thời gian, lượng lớn chất kháng sinh tích tụ từ hóa chất, thức ăn công nghiệp dư thừa, và phân cá sẽ lắng đọng xuống đáy ao nuôi và bị rửa trôi lan ra các khu vực lân cận (Boxall & ctg., 2004; Le & Do, 2009; Sørum, 2005). Thực tế, cá/động vật thủy sản và môi trường nước ao nuôi hiện đang là nguồn chủ yếu chứa vi khuẩn và các gen kháng kháng sinh (Heuer & ctg., 2009); điều này gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ thống nuôi trồng, sản xuất, phá vỡ cân bằng hệ sinh thái tự nhiên, và tác động xấu đến sức khỏe con người (Jang & ctg., 2018).

Trong nghiên cứu này, 11 nhóm vi khuẩn được tiến hành kiểm tra với 10 kháng sinh thuộc nhóm beta-lactam, quinolone, tetracycline, lincosamide, phenicol, và macrolide (**Bảng 4**), ghi nhận các vi khuẩn đều kháng với các kháng sinh thuộc hai nhóm beta-lactam và lincosamide. Nhóm beta-lactam cho kết quả các vi khuẩn kháng lần lượt Am (10/11, chiếm 90.9%), Ax (10/11, chiếm 90.9%), và Ci (05/11 chiếm 45.45%). Nhóm lincosamide, cụ thể với kháng sinh clindamycin có tỷ lệ kháng 10/11 nhóm vi khuẩn (chiếm 90.9%). Trong 11 nhóm vi khuẩn phân lập được, nhóm IV kháng với 07/10 kháng sinh được khảo sát (70%). Đồng thời, nhóm VI, VII và VIII kháng với 06/10 kháng sinh (60%). So với nghiên cứu trước đó của L. T. Nguyen (2020) tính đa kháng kháng sinh trên 09 kháng sinh kết quả biểu hiện mức độ đa kháng của các vi khuẩn nghiên cứu dao động trong khoảng 05 - 08 kháng sinh khá tương đồng với nghiên cứu này ở vi khuẩn nhóm IV (07/10), VI (06/10), VII (06/10), VIII (06/10). Tỷ lệ đa kháng kháng sinh của các vi khuẩn phân lập cao nhưng rơi vào những kháng sinh từ lâu đã bị cấm hoặc hạn chế sử dụng trong nuôi trồng thủy sản như Am, Cp, Of và CL. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, các vi khuẩn phân lập kháng lại 10/11 với Cl và 03/11 với ER, Dx những loại kháng sinh vẫn đang lưu hành sử dụng, hiển thị xu hướng kháng kháng sinh của các vi khuẩn ngày một gia tăng và ngày càng mở rộng phổ kháng, điều này lâu dài có thể dẫn đến tình trạng thất bại trong phòng và trị bệnh thủy sản về sau.

Bảng 4

Tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn (kí hiệu I - XIV) phân lập từ cá rô đồng *A. testudineus* bệnh/dấu hiệu lạ

Kháng sinh	Nồng độ (ug)	Tình trạng**	Nguồn tham khảo (mm)*											
				I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	XIII	XIV
Am	10	Cấm	33-41	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ax	20	Hạn chế	19-25	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ci	30	-	18-23	S	R	I	R	S	R	R	R	I	I	I
Cp	5	Cấm	22-30	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
Of	5	Cấm	15-25	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
Te	30	Hạn chế	18-25	S	S	S	I	S	S	R	R	S	R	S
Dx	30	-	18-24	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S
Cl	2	-	24-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
CL	30	Cấm	21-27	S	I	S	R	S	R	S	S	S	I	S
Er	15	Hạn chế	21-29	I	I	S	R	I	R	I	I	I	R	I
Tỉ lệ (R/10)				1	4	3	7	3	6	6	6	3	4	3

* Ampicillin -Am, amoxicillin -Ax, ofloxacin-Of, chloramphenicol-CL, ciprofloxacin -Ci, clindamycin -Cl, cefalexin-Cp, doxycyclin-Dx, erythromycin-Er, và tetracyclin-Te

“S”: Susceptible; “I”: intermediate; “R”: Resistant

Nguồn: * Số liệu công bố bởi CLSI (2018)

**Thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT ngày 01/06/2016 của Bộ Nông nghiệp và PTNT (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2016)

Kết quả khảo sát tình trạng kháng kháng sinh của 11 nhóm vi khuẩn biểu thị, các kháng sinh thuộc beta-lactam đều bị các vi khuẩn đề kháng. Các kháng sinh thuộc beta-lactam từ lâu đã không được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản do nhóm kháng sinh này bị kháng bởi nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh. Sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn trên động vật thủy sản, đặc biệt là đề kháng với nhóm beta-lactam hiện nay rất nghiêm trọng. Hiện tượng sự gia tăng các chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh beta-lactam đã được chứng minh xuất phát từ nguyên nhân sử dụng kháng sinh không đúng cách. Ba nhóm kháng sinh tetracylin, quinolone, và macrolide phổ biến trong phòng trị bệnh nhiễm khuẩn trong nuôi trồng thủy sản. Nhóm macrolide, cụ thể với kháng sinh erythromycin ức chế khuẩn, tuy nhiên chỉ kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn chứ không có tác dụng tiêu diệt vi khuẩn hoàn toàn (Tổng cục Thủy sản Việt Nam, 2013) điều này tương ứng với việc loại kháng sinh này chỉ cho kết quả 03/11 vi khuẩn kháng kháng sinh và 08 nhóm khuẩn chỉ cho mức độ diệt khuẩn trung gian mà không diệt khuẩn hoàn toàn theo tiêu chuẩn của CLSI (2018). Kháng sinh thuộc quinolone có khả năng diệt khuẩn cao do tác động lên cấu trúc vòng xoắn DNA của vi khuẩn, nhóm kháng sinh quinolone trong nghiên cứu này cho thấy khả năng diệt khuẩn rõ rệt tuy nhiên lại là loại đã bị cấm dùng theo Thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT ngày 01/06/2016 của Bộ Nông nghiệp và PTNT (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2016) nên việc sử dụng

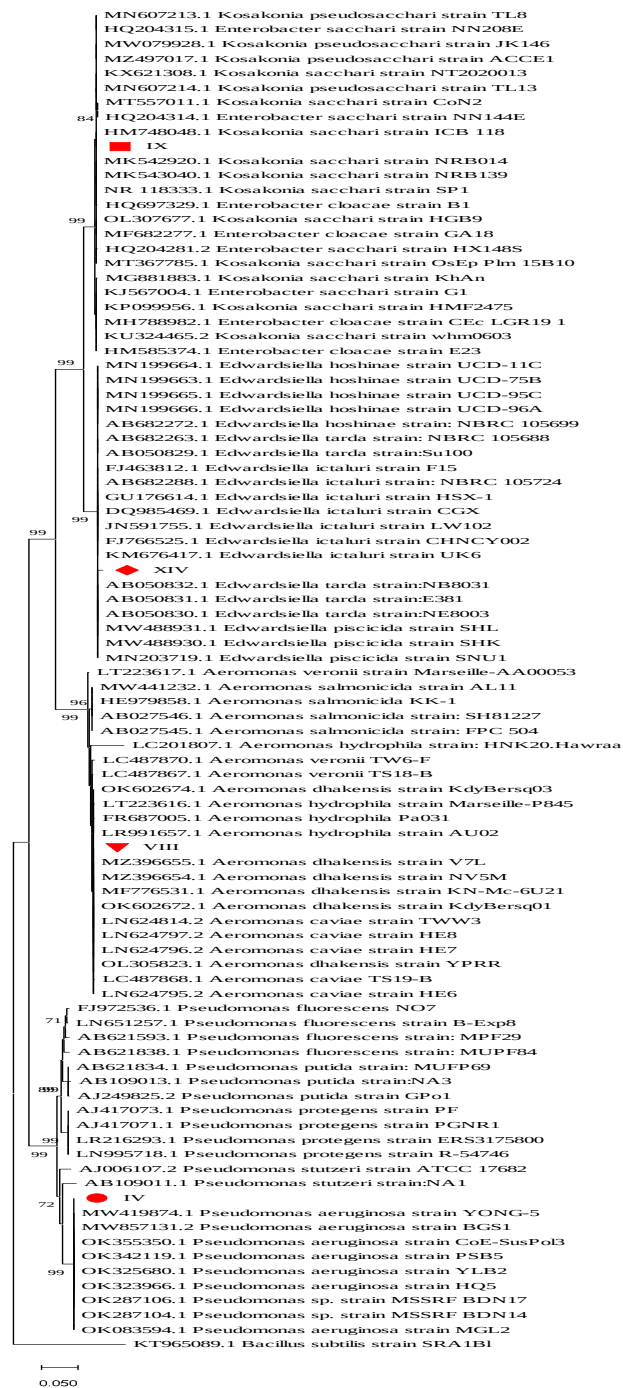
loại kháng sinh này trong nuôi trồng thủy sản cũng không còn được cho phép. Kháng sinh thuộc tetracyclin có khả năng kiềm khuẩn do ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein trong cả vi khuẩn Gram âm (-) và vi khuẩn Gram dương (+) (Tổng cục Thủy sản Việt Nam, 2013) vì vậy kháng sinh này cũng dần bị hạn chế trong nuôi trồng thủy sản. Các vi khuẩn nhóm IV và VIII có mức độ đa kháng kháng sinh cao (06 - 07/10 loại kháng sinh), kháng với các kháng sinh thuộc beta-lactam, lincosamid, macrolide, và tetracyclin (macrolide và tetracyclin rất thông dụng trong nuôi trồng thủy sản). Điều này rõ ràng, các mẫu cá thu nhận ở các trang trại trên địa bàn TP.HCM đang bị nhiễm các vi khuẩn đa kháng thuốc với phổ kháng rất lớn, kháng với cả kháng sinh trong danh mục cấm/hạn chế sử dụng theo Thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT ngày 01/06/2016 của Bộ Nông nghiệp và PTNT (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2016). Hai vi khuẩn với mức độ đa kháng này được nhận định là *Pseudomonas* spp. và *Aeromonas* spp., đây cũng là hai loại vi khuẩn thường xuyên gây ra các vấn đề bệnh lý trên động vật cũng như trên người như nhiễm trùng đường hô hấp dưới, viêm màng não, hay nhiễm trùng máu có thể dẫn tới tử vong (N. D. Nguyen & Nguyen, 2017).

3.4. Định danh dựa trên sinh học phân tử

Dựa trên các đặc điểm, hình thái, sinh lý, sinh hóa, và tình trạng kháng kháng sinh cao trong các kháng sinh đang được sử dụng phổ biến trong thủy sản hiện nay như tetracyclin và macrolide các vi khuẩn đa kháng kháng sinh quan trọng kháng lại nhiều loại kháng sinh (06/10) và được nhận định ban đầu dựa trên hình thái là các vi khuẩn thường gây bệnh trên cá nước ngọt Việt Nam từ các nghiên cứu trước đó được định danh phân tử, gồm các vi khuẩn nhóm IV, VIII, IX, và XIV. Kết quả giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger sequencing và công cụ BLAST trên ngân hàng dữ liệu NCBI nhận thấy:

- Vi khuẩn nhóm IV cho kết quả định danh là *Pseudomonas aeruginosa* với mức độ tương đồng 99.77%, kết quả này khẳng định khảo sát ban đầu chính xác.
- Vi khuẩn nhóm VIII có mức độ tương đồng 99.93% với *Aeromonas dhakensis* điều này có sự khác biệt so với nhận định ban đầu vi khuẩn này thuộc họ *Vibrio* spp. mọc khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường TCBS, môi trường chuyên biệt cho *Vibrio* spp. Sự khác biệt này cũng từng được nhắc đến trong một vài phát hiện trước đây của Wejdan, Al-Rubaia, Ocuba, và Noor (2014), *Aeromonas* mọc khuẩn lạc màu vàng bóng trên môi trường TCBS và đôi khi có thể bị nhầm lẫn với *V. parahaemolyticus* trên môi trường phân lập ban đầu (Bottone & Robin, 1978).
- Vi khuẩn nhóm IX có mức độ tương đồng 100% với *Kosakonia sacchari*, thuộc họ *Enterobacteria* spp., phù hợp với các kết quả kiểm tra đặc điểm, hình thái, sinh lý và sinh hóa ban đầu. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây chỉ nêu lên rằng *Kosakonia sacchari* là vi khuẩn cố định đạm trên cây mía hay vi khuẩn phân lập trên ruộng lúa nông nghiệp, hoặc là vi khuẩn dùng trong công nghệ lên men, vẫn chưa có công bố nào về tình trạng *Kosakonia sacchari* này gây bệnh trên động vật thủy sản (M. Chen & ctg., 2014; Mertschnigg & ctg., 2020). Như vậy, việc định danh phân tử trong nghiên cứu này lần đầu phát hiện một chủng vi khuẩn mới, có khả năng gây bệnh trên thủy sản nói chung cũng như cụ thể trên cá rô đồng *A. testudineus* nói riêng, đây chính là điểm mới và là mục tiêu cần hướng đến nghiên cứu sâu hơn.
- Vi khuẩn nhóm XIV có trình tự tương đồng 99.44% với *Edwardsiella ictaluri*, đúng như với giả thiết ban đầu.

Kết quả xây dựng cây phát sinh loài cũng cho thấy phân nhóm loài có sự tương đồng với kết quả BLAST trên NCBI, cho thấy rằng các nhóm khuẩn đều có sự phân nhánh rõ rệt đối với từng chủng vi khuẩn với nhau điều này cho thấy trình tự gen của các vi khuẩn được giải khi so sánh với các vi khuẩn khác là không bị trùng lặp lẫn nhau. Khi so sánh trong mức độ từng nhóm vi khuẩn với các chủng tham chiếu theo từng chi vi khuẩn bao gồm: ở chi *Pseudomonas* so sánh với bốn chủng tham chiếu của vi khuẩn *P. fluorescens*, ba chủng *P. putida*, ba chủng *P. protegens*, hai chủng *P. stutzeri*, bảy chủng *P. aeruginosa*, và một chủng giải trình tự cho thấy rằng nhánh của chi *Pseudomonas* có sự phân nhánh giữa các loài tốt nhất chứng tỏ rằng gen 16S RNA phân định tốt nhất các loài trong nhóm khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*. Ở chi *Aeromonas* khi so sánh với ba chủng *A. veronii*, ba chủng *A. salmonicida*, bốn chủng *A. hydrophyla*, năm chủng *A. caviae*, năm chủng *A. dhakensis* cùng với chủng giải trình tự cho thấy trình tự gen của chi *Aeromonas* phân định loài không tốt bằng *Pseudomonas* tuy nhiên trong nhánh của cây phát sinh loài có thể thấy rằng chủng khuẩn giải trình tự nằm cạnh hai chủng khuẩn có mã phân lập là V7L và NV5M là hai vi khuẩn gây bệnh trên cá rô đồng đã được nhóm tác giả L. T. Nguyen (2020) công bố trước đó, chứng tỏ rằng vi khuẩn phân lập tại các trại cá trên địa bàn TP.HCM có sự trùng khớp với mẫu phân lập từ nguồn cá thu nhận tại khu vực Tây Nam bộ, đây cũng là một điểm đáng lưu ý trong việc khuẩn gây bệnh đang lưu hành trong nuôi trồng và vận chuyển thủy sản. Chi vi khuẩn *Kosakonia* khi so sánh với các chủng tham chiếu gồm bốn chủng *K. pseudosacchari*, bốn chủng *Enterobacter cloacae*, tám chủng *K. sacchari* nhận thấy rằng chủng giải trình tự nằm gần với chủng *K. sacchari*, tuy nhiên chủng này gần với vi khuẩn trong nghiên cứu có nguồn phân lập từ vi khuẩn cố định đạm và từ khu vực trồng mía việc tìm ra chủng khuẩn trong nghiên cứu này vẫn hoàn toàn mới. Còn lại chi vi khuẩn *Edwardsiella* khi so sánh với năm chủng *E. hoshinae*, năm chủng *E. tarda*, bảy chủng *E. ictaluri* và ba chủng *E. piscicida* thấy chủng khuẩn giải trình tự gần với hai chủng vi khuẩn *E. tarda* và *E. ictaluri* tuy nhiên nghiên cứu này xác định chủng khuẩn thu nhận được thuộc chủng *E. ictaluri* vì những dấu hiệu bệnh tích ghi nhận được trên gan cá thu nhận có dấu hiệu của bệnh gan-thận-mủ do chủng khuẩn này gây ra. Tất cả các nhóm vi khuẩn đều sử dụng chủng out group là vi khuẩn Gram dương *Bacillus subtilis* (KT965089.1). Điều này một lần nữa khẳng định lại việc giám định bằng sinh học phân tử là 04 nhóm khuẩn phân lập được là IV, VIII, IX và XIV tương ứng lần lượt với các chủng *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas dhakensis*, *Kosakonia sachari* và *Edwardsiella ictaluri*.



Hình 3. Cây phát sinh loài của 04 nhóm vi khuẩn phân lập IV, VII, IX và XIV dựa trên các chủng tham chiếu từ NCBI

Một vài nghiên cứu tại Việt Nam trước đây đề cập đến một số vi khuẩn gây bệnh trên cá rô như *Streptococcus iniae* gây bệnh đen thân (Tu, Huynh, & Nguyen, 2013), *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết (O. T. H. Dang, Nguyen, & Truong, 2012), *A. hydrophila* và *Streptococcus* spp. phân lập từ cá rô bị bệnh phù mắt và xuất huyết (T. T. M. Dang, Nguyen, Tran, & Dang, 2012). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, các chủng vi sinh được phân lập và định danh đều là nguồn mẫu thu nhận ở khu vực TP.HCM và các chủng vi khuẩn không có sự trùng lặp với các công bố trước đó. Tu và cộng sự (2010) chỉ ra, *Aeromonas* spp. với ít nhất 31 loài chuyên gây bệnh xuất huyết, lở loét trên hầu hết các động vật thủy sản, đặc biệt trên cá da trơn. Đáng chú ý

nhất là *A. dhakensis* được tìm thấy trên mẫu cá bệnh, trên động vật thủy sản hoặc cả ở trong môi trường nước sông, nước ao và nước bể cá vùng cận nhiệt và nhiệt đới. Các nghiên cứu trên thế giới cũng phát hiện, các vi khuẩn gây bệnh trên cá rô đồng như: Chhanda và cộng sự (2019) nhận thấy các chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá rô *A. testudineus* ở Thái Lan thuộc *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., và *Staphylococcus* spp. sau khi được nuôi trên các môi trường chọn lọc và kiểm tra phản ứng sinh hóa. Hossain và cộng sự (2017) sau khi phân lập mẫu vi khuẩn gây bệnh từ mang, chất nhầy, và vây của cá rô ở Bangladesh, xác định được các chủng *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella* spp., và *Vibrio* spp, ... Tình trạng lây nhiễm vi khuẩn trong trang trại cá ở nghiên cứu này rất quan trọng đối với hệ thống ao nuôi cá giống, người chủ trang trại và người tiêu dùng. Sự hiện diện của các mầm bệnh này đồng nghĩa với việc bùng phát dịch bệnh nghiêm trọng trên cá ở Bangladesh. Kết quả định danh 04 chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này lưu ý, những chủng đang lây nhiễm bệnh trên cá rô đồng *A. testudineus* thu thập ở các trang trại trên địa bàn TP.HCM rất đa dạng với rất nhiều chủng vi khuẩn không trùng lặp nhau và đều có khả năng gây bệnh trên con người như *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas dhakensis*, và *Edwardsiella ictaluri*. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy loài *A. dhakensis* phân bố rộng rãi trong môi trường và có thể gây ra nhiều loại bệnh nhiễm trùng cho cả người và động vật (P. L. Chen, Lamy, & Ko, 2016). *A. dhakensis* thường bị xác định nhầm là *A. hydrophila*, *A. veronii*, hoặc *A. caviae* bằng các xét nghiệm kiểu hình thương mại trong phòng thí nghiệm lâm sàng (Figueras & ctg., 2009). *A. dhakensis* đã cho thấy độc lực mạnh trên các mô hình động vật khác nhau và các bệnh nhiễm trùng lâm sàng. Đặc trưng, *A. dhakensis* là loài chính gây nhiễm trùng mô mềm và nhiễm khuẩn huyết, đặc biệt là ở những bệnh nhân bị xơ gan hoặc bệnh ác tính, nhiễm trùng huyết do *A. dhakensis* gây chết người cao hơn nhiễm trùng huyết do các loài *Aeromonas* khác (P. L. Chen & ctg., 2016). Hầu hết các chủng *Aeromonas* phân lập được là *A. dhakensis* (37, 46.3%), và 13 (16.3%) là *A. hydrophila*, *A. dhakensis* là loài chiếm ưu thế trong số các chủng vi khuẩn *Aeromonas* vết thương, và độc lực mạnh hơn *A. hydrophila* (M. Chen & ctg., 2014). Kế tiếp thường được biết đến là chủng gây bệnh nhiễm trùng đường ruột của cá da trơn được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1976 như một bệnh dịch ảnh hưởng đến kinh tế sản xuất cá da trơn thương mại. Ban đầu, *Edwardsiella ictaluri* là vật chủ gây bệnh cụ thể cho các loài cá da trơn (Chuah, Effarizah, Goni, & Rusul, 2016; Ikpi & Offem, 2011). Tuy nhiên báo cáo của Adepoju, Adelaja, Amoo, Orimadegun, và Akinyinka (2021), đã chỉ ra rằng *E. ictaluri* có thể là mầm bệnh có thể lây nhiễm sang người, đặc biệt là trẻ em như các loài *Edwardsiella* và *Enterobacteriaceae* khác (Adepoju & ctg., 2021). Còn *Pseudomonas aeruginosa* khi xâm nhiễm vào cơ thể gây nhiễm khuẩn tiết niệu, nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới, viêm màng não, viêm màng trong tim, viêm tai giữa, ... và gây bệnh nhiễm trùng máu, với tỷ lệ tử vong rất cao (N. D. Nguyen & Nguyen, 2017). Còn lại chủng *Kosakonia sacchari* được tìm ra trong nghiên cứu này chỉ mới được biết đến là vi khuẩn cố định đạm trên cây mía hay vi khuẩn phân lập trên ruộng lúa nông nghiệp, hoặc là vi khuẩn dùng trong công nghệ lên men. Tính đến nay, vẫn chưa có công bố nào về tình trạng *Kosakonia sacchari* gây bệnh trên động vật thủy sản. Do đó, đây chính là điểm mới hoàn toàn cần được chú trọng khai thác chuyên sâu làm rõ thêm (M. Chen & ctg., 2014; Mertschnigg & ctg., 2020). Việc phát hiện ra chủng vi khuẩn góp phần xây dựng bộ dữ liệu các vi khuẩn đang lưu hành trên cá rô đồng tại trang trại nuôi trên địa bàn TP. HCM, và tìm ra chủng khuẩn mới là *Kosakonia sacchari* trên cá rô đồng *A. testudineus* sẽ là tiền đề cho các hướng nghiên cứu tiếp theo.

4. Kết luận và kiến nghị

Từ 110 mẫu cá thu nhận, nghiên cứu đã tiến hành phân lập được 65 khuẩn lạc nghi ngờ ban đầu và chọn lọc ra 11 nhóm vi khuẩn thuần nhất. Các vi khuẩn được kiểm tra các đặc điểm, hình thái, sinh lý và sinh hóa, và kiểm tra mức độ đa kháng nêu ra kháng sinh thuộc Nhóm beta-lactam cho kết quả các vi khuẩn kháng lần lượt Am (10/11, chiếm 90.9%), Ax (10/11, chiếm 90.9%), và Ci (05/11 chiếm 45.45%). Nhóm lincosamide, cụ thể với kháng sinh clindamycin có tỷ lệ kháng 10/11 nhóm vi khuẩn (chiếm 90.9%). Dựa vào các đặc điểm, hình thái, sinh lý và sinh hóa sơ bộ ban đầu và mức độ đa kháng kháng sinh cao, 04 chủng vi khuẩn được định danh phân tử tiếp theo và lần lượt cho kết quả *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas dhakensis*, *Kosakonia sacchari*, và *Edwardsiella ictaluri*. Cá rô đồng *A. testudineus* và cá nước ngọt hiện là một trong những nguồn thực phẩm phổ biến nhưng đang bị nhiễm nhiều vi sinh vật gây bệnh khác nhau nguy hiểm trên người, điều này giống lên hồi chuông cảnh báo cho các trang trại nuôi cá giống và một số khu vực phân phối thủy sản ở TP. HCM. Từ những mối nguy trên, nhóm nghiên cứu đề xuất tiếp tục đánh giá các nhóm vi khuẩn còn lại chưa định danh để lập thành một cơ sở dữ liệu tham khảo cho cá bệnh gây ra trên thủy sản nước ngọt nói chung và trên cá rô đồng *A. testudineus* nói riêng.

LỜI CẢM ƠN

Quý nghiên cứu đề tài Khoa học và Công nghệ cấp cơ sở trường đại học Nguyễn Tất Thành tài trợ cho nghiên cứu này với mã số 2021.01.110/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Brazani, O., & Zilberg, D. (2004). Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 238(1/4), 97-105.
- Adepoju, A. A., Adelaja, A. O., Amoo, A., Orimadegun, A. E., & Akinyinka, O. O. (2021). *Edwardsiella ictaluri*, an unusual cause of bacteraemia in a Nigerian child with acute bloody diarrhoea. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 9(10), 3175-3178.
- Ahmed, G. U., Dhar, M., Khan, M. N. A., & Choi, J. S. (2007). Investigation of diseases of Thai koi, *Anabas testudineus* (Bloch) from farming conditions in winter. *Journal of Life Science*, 17(10), 1309-1314.
- Bailly, N., Reyes, R., Jr., Atanacio, R., & Froese, R. (2010). Simple identification tools in FishBase. In *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems*, 31-36.
- Banerjee, G., Nandi, A., & Ray, A. K. (2017). Assessment of hemolytic activity, enzyme production and bacteriocin characterization of *Bacillus subtilis* LR1 isolated from the gastrointestinal tract of fish. *Archives of Microbiology*, 199(1), 115-124.
- Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. (2016). *Thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT ngày 01 tháng 06 năm 2016 về Ban hành danh mục thuốc thú y được phép lưu hành, cấm sử dụng ở Việt Nam, công bố mã hs đối với thuốc thú y nhập khẩu được phép lưu hành tại Việt Nam [Circular No. 10/2016/TT-BNNPTNT dated June 1, 2016 promulgating the list of veterinary drugs permitted for circulation and banned from use in Vietnam, announcing the HS code for imported veterinary drugs permitted to be stored. practice in Vietnam]*. Truy cập ngày 10/01/2022 tại <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Xuat-nhap-khau/Thong-tu-10-2016-TT-BNNPTNT-thuoc-thu-y-duoc-phép-lưu-hành-cấm-sử-dụng-o-Việt-Nam-315674.aspx>

- Bottone, E. J., & Robin, T. (1978). *Vibrio parahaemolyticus*: Suspicion of presence based on aberrant biochemical and morphological features. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(6), 760-763.
- Boxall, A. B., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E. J., & Croxford, A. (2004). Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-91.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiol*, 8(7), 1137-1144.
- Chen, M., Zhu, B., Lin, L., Yang, L., Li, Y., & An, Q. (2014). Complete genome sequence of *Kosakonia sacchari* type strain SP1T. *Standards in Genomic Sciences*, 9(3), 1311-1318.
- Chen, P. L., Lamy, B., & Ko, W. C. (2016). *Aeromonas dhakensis*, an increasingly recognized human pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 793.
- Chen, P. L., Wu, C. J., Chen, C. S., Tsai, P. J., Tang, H. J., & Ko, W. C. (2014). A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), O428-O434.
- Chhanda, M. S., Parvez, I., Rumi, N. A., Hosen, M. H. A., & Islam, M. R. (2019). Identification of pathogenic bacteria from infected Thai koi (*Anabas testudineus*). *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 5(1), 56-62.
- Chuah, L. O., Effarizah, M. E., Goni, A. M., & Rusul, G. (2016). Antibiotic application and emergence of Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in global catfish aquaculture. *Current Environmental Health Reports*, 3(2), 118-127.
- Cipriano, R. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Washington, D.C.: US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fishery Research.
- CLSI. (2018). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute Consensus Process*, 38(3).
- Dang, O. T. H., Nguyen, H. D., & Truong, N. Q. (2012). Phân lập và xác định khả năng gây bệnh xuất huyết trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) của vi khuẩn *streptococcus agalactiae* [Isolation and determination of the ability to cause haemorrhagic disease in perch (*Anabas testudineus*) of *Streptococcus agalactiae*]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (22c), 194-202.
- Dang, T. T. M., Nguyen, H. D., Tran, C. T. T., & Dang, O. T. H. (2012). Đặc điểm mô bệnh học cá rô (*Anabas testudineus*) nhiễm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Streptococcus* sp. trong điều kiện thực nghiệm [Histopathological characteristics of perch (*Anabas testudineus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. under experimental conditions]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (22c), 183-193.
- FAO. (2003). *The state of world fisheries and aquaculture 2002*. Rome, Italy: FAO.
- Figueras, M. J., Alperi, A., Saavedra, M. J., Ko, W. C., Gonzalo, N., Navarro, M., & Martínez-Murcia, A. J. (2009). Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas aquariorum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3742-3746.
- Haque, S., Bandyopadhyay, P. K., & Mondal, K. (2021, March). Studies on growth, behavior and blood profile in *Anabas testudineus* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Springer India*, 74(1), 19-27.

- Harikrishnan, R., Kim, J. S., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2012) Protection of *Vibrio harveyi* infection through dietary administration of *Pueraria thunbergiana* in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture*, 324, 27-32.
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., & Angulo, F. J. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8), 1248-1253.
- Hossain, M. S., Hashem, S., Halim, M. A., Chowdhury, P., Sultana, S., & Khan, M. N. (2017). Aterial community structure and infection in cultured Koi (*Anabas testudineus*) fish species. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(3), 520-524.
- Hudzicki, J. (2016). Kirby-bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology*, 15, 55-63.
- Ikpi, G., & Offem, B. (2011). Bacterial infection of mudfish *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) fingerlings in tropical nursery ponds. *Revista de Biologia Tropical*, 59(2), 751-759.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Jang, H. M., Kim, Y. B., Choi, S., Lee, Y., Shin, S. G., Unno, T., & Kim, Y. M. (2018). Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea. *Environmental Pollution*, 233, 1049-1057.
- Khalil, S. A., Khalil, R. H., Saad, T. T., & Safaa, M. H. (2010). Studies on *Pseudomonas* septicemia among cultured *Oreochromus niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 5(1), 55-64.
- Le, S. X., & Do, C. M. (2009). *Khảo sát các mô hình nuôi cá lóc (Channa micropelte và Channa striata) ở Đồng bằng sông Cửu Long [Survey on farming models of snakehead fish (Channa micropelte and Channa striata) in the Mekong Delta]*. Can Tho, Vietnam: Khoa Thủy sản - Trường Đại học Cần Thơ.
- Lio-Po, G. D., & Lim, L. S. (2014). Infectious diseases of warmwater fish in fresh water. In *Diseases and disorders of finfish in cage culture* (2nd ed., pp. 193-253). Wallingford, UK: CABI.
- Luong, K. N., Doan, P. M., & Nguyen, T. V. (2017). *Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng [Practical guide to clinical microbiology testing techniques]*. Hanoi, Vietnam: Nhà xuất bản Y học.
- Mertschnigg, T., Patz, S., Becker, M., Feierl, G., Ruppel, S., Bunk, B., ... Zarfel, G. (2020). First report of *kosakonia radicincitans* bacteraemia from Europe (Austria)-identification and whole-genome sequencing of strain DSM 107547. *Scientific Reports*, 10(1), 1-6.
- Meyer, F., & Bullock, G. (1973). *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied Microbiology*, 25(1), 155-156.
- Nguyen, L. T. (2020). Characterization of multi-antibiotic resistant bacteria isolated from climbing perch (*Anabas testudineus*) and therapeutic potential of phytochemicals. *Veterinary Science and Technology*, 27(1), 68-74.
- Nguyen, L. T. (2020). Effects of erythromycin in treatment for climbing perch (*Anabas testudineus*) infected experimentally with multi-antibiotic resistance *Aeromonas dhakensis*. *Veterinary Science and Technology*, 27(6), 42-49.

- Nguyen, N. D., & Nguyen, A. H. (2017). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đánh giá kết quả điều trị viêm phổi bệnh viện do *Pseudomonas aeruginosa* tại bệnh viện Bạch Mai từ tháng 9-2016 đến tháng 6-2017 [Study on clinical and subclinical characteristics and evaluation of treatment results for hospital-acquired pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* at Bach Mai hospital from September 2016 to June 2017]. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học thường niên hội Hô hấp Việt Nam 2017*. Truy cập ngày 10/02/2022 tại <https://hoihohapvietnam.org/upload/attach/vnrs-20215189327jof.pdf>
- Panda, S., Bandyopadhyay, P. K., & Chatterjee, S. N. (2012). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PB112 (JN996498) isolated from infected *Labeo bata* (Hamilton) by 16S rRNA gene sequence analysis and fatty acid methyl ester (FAME) analysis. *African Journal of Biotechnology*, 12(4), 400-405.
- Sahoo, P. K., Swain, P., Sahoo, S. K., Mukherjee, S. C., & Sahu, A. K. (2000). Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in *Anabas testudineus* (Bloch). *Asian Fisheries Science*, 13(2000), 357-362.
- Sørum, H. (2005). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, 213-238.
- Tổng cục Thủy sản Việt Nam. (2013). *Tài liệu tập huấn khuyến nông hướng dẫn sử dụng thuốc kháng sinh, sản phẩm xử lý và cải tạo môi trường trong nuôi trồng thủy sản [Training manual for agricultural extension guiding the use of antibiotics, products to treat and improve the environment in aquaculture]*. Truy cập ngày 10/02/2022 tại <https://www.fistenet.gov.vn>
- Tu, D. T., Haesebrouck, F., Nguyen, T. A., Sorgeloos, P., Baele, M., & Decostere, A. (2010). Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mủ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng Bằng Sông Cửu Long [Current status of antibiotic resistance in bacteria *Edwardsiella ictaluri* causing liver and kidney disease in catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in the Mekong Delta]. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (15a), 162-171.
- Tu, D. T., Huynh, T. T. N., & Nguyen, D. K. (2013). *Streptococcus iniae*, tác nhân gây bệnh đen thân trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) [*Streptococcus iniae*, the causative agent of black body disease in perch (*Anabas testudineus*)]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (26), 96-103.
- Wejdan, R. T. A., Al-Rubaia, A. F., Oruba, K. H. A., & Noor, S. N. (2014). PCR Detection of putative hemolysin and aerolysin genes in an *Aeromonas hydrophila* isolates from diarrhea in Babylon Province. *Journal of Natural Sciences Research*, 4, 41-47.
- Woo, P. T., & Gregory, D. W. B. (2014). *Diseases and disorders of finfish in cage culture*. Wallingford, UK: CABI.
- Zaman, B. S., Khatun, M. M., Islam, M. A., Sharmin, S., Kulsum U., & Hoq, M. E. (2013). Bacterial Flora of Koi (*Anabas testudineus*) Harvested from Ponds and Their Antibiotogram. *Microbes and Health*, 2(1), 8-11.

