

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**QUÁCH VĂN CAO THI**

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM BỆNH HỌC VÀ CƠ CHẾ  
ĐA KHÁNG THUỐC CỦA HAI LOÀI VI KHUẨN  
*Edwardsiella ictaluri* VÀ *Aeromonas hydrophila* GÂY BỆNH  
TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*) NUÔI  
THÂM CANH Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC  
CHUYÊN NGÀNH: VI SINH VẬT HỌC  
MÃ NGÀNH: 62 42 01 07**

**CẦN THƠ, 2017**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**QUÁCH VĂN CAO THI**

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM BỆNH HỌC VÀ CƠ CHẾ  
ĐA KHÁNG THUỐC CỦA HAI LOÀI VI KHUẨN  
*Edwardsiella ictaluri* VÀ *Aeromonas hydrophila* GÂY BỆNH  
TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*) NUÔI  
THÂM CANH Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC  
CHUYÊN NGÀNH: VI SINH VẬT HỌC  
MÃ NGÀNH: 62 42 01 07**

**CÁN BỘ HƯỚNG DẪN KHOA HỌC  
PGS.TS. TỪ THANH DUNG**

**CẦN THƠ, 2017**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án “**Nghiên cứu đặc điểm bệnh học và cơ chế đa kháng thuốc của hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh ở Đồng bằng sông Cửu Long**” là công trình nghiên cứu của tôi với sự hướng dẫn của PGS.TS. Từ Thanh Dung. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án này là trung thực và chưa từng được người khác công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

**TÁC GIẢ LUẬN ÁN**

**NCS. QUÁCH VĂN CAO THI**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến:

Cô PGS.TS. Từ Thanh Dung đã dành nhiều thời gian, công sức và tận tình hướng dẫn tôi trong thời gian thực hiện luận án và theo học tại trường.

Thầy PGS.TS. Trần Nhân Dũng đã động viên, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi nhất cho việc nghiên cứu và học tập tại Viện.

Cô PGS.TS. Trần Thị Tuyết Hoa, Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ đã nhiệt tình hướng dẫn chuyên đề nghiên cứu sinh.

Xin được gửi lời biết ơn sâu sắc đến Ban Giám hiệu trường Cao đẳng Cộng đồng Vĩnh Long; Ban lãnh đạo Viện NC&PT Công nghệ Sinh học và Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ; quý Thầy/Cô và các Anh/Chị phòng Thanh tra và Pháp chế đã sắp xếp công việc cũng như tạo điều kiện thuận lợi về thời gian để tôi có thể hoàn thành chương trình học tập đúng tiến độ.

Cảm ơn các hộ nuôi cá tra ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long đã cung cấp mẫu cá bệnh để phân lập vi khuẩn.

Chân thành biết ơn anh Trần Văn Bé Năm (phòng Sinh học phân tử, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học); em Nguyễn Bảo Trung và quý Thầy/Cô quản lý các phòng Thí nghiệm của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản đã hỗ trợ và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành luận án.

Vô cùng biết ơn anh Trần Duy Phương (Công ty Pharmaq Việt Nam, chi nhánh Đồng Tháp) đã cung cấp cá tra giống sạch bệnh cho các thí nghiệm cảm nhiễm. Cảm ơn các Anh/Chị nghiên cứu sinh khóa 2012; sự hỗ trợ tích cực của các em học viên cao học: Huỳnh Thị Diễm Trang và Trần Tiến Lực và các em sinh viên: Đặng Phạm Hòa Hiệp, Trần Minh Khá, Hồ Văn To, Dương Thanh Quy, Lâm Cẩm Oanh, Bùi Thụy Hạnh Nguyên, Nguyễn Lâm Viên, Võ Trung Hiếu, Trần Quốc Hảo, Thị Mỹ Hạnh và Nguyễn Thị Hoa Đăng.

Cuối cùng, sự thành công của luận án không thể không kể đến sự đóng góp không nhỏ của các thành viên trong gia đình, những người luôn ủng hộ, động viên và giúp tôi vượt qua rất nhiều khó khăn trong thời gian học tập.

Chân thành cảm ơn./.

**NCS. QUÁCH VĂN CAO THI**

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định các đặc điểm bệnh học cảm nhiễm kép (coinfection/super infection/concurrent infection/dual infection hay mixed infection) và cơ chế đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra nuôi thâm canh ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Bằng các kỹ thuật sinh hóa truyền thống (bao gồm bộ kit API 20E) và sinh học phân tử (PCR và giải trình tự gen), đề tài đã phân lập và định danh được 141 chủng vi khuẩn (gồm 67 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và 74 chủng vi khuẩn *A. hydrophila*) từ các mẫu cá tra bệnh gan thận mũ (GTM) và bệnh xuất huyết (XH). Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được thì có 22/67 (chiếm 32,84%) chủng *E. ictaluri* và 22/74 (chiếm 29,73%) chủng *A. hydrophila* có nguồn gốc từ cá tra nhiễm kép 2 loại bệnh này. Kết quả giải trình tự gen cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập có tỷ lệ tương đồng với các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên ngân hàng GenBank dao động từ 99-100% và 98-100%.

Kết quả thí nghiệm xác định độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* với mật số tiêm vi khuẩn từ  $10^2$  đến  $10^6$  CFU/cá cho thấy cá tra sau khi cảm nhiễm có dấu hiệu biểu hiện bệnh đặc trưng của 2 loài vi khuẩn. Các đốm trắng nhỏ li ti xuất hiện trên các cơ quan như gan, thận và tỳ tạng của cá tra cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*; trong khi đó các dấu hiệu của bệnh XH do vi khuẩn *A. hydrophila* gồm mắt lồi, các đốm XH xuất hiện quanh các vây, miệng, hậu môn và trong xoang bụng cá bệnh thường có dịch màu hồng. Qua kết quả thí nghiệm cũng đã xác định được độc lực và liều gây chết LD<sub>50</sub> của 4 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* 1ED3, 3ED3, 8ED3 và 10ED3 lần lượt là  $1,58 \times 10^4$ ,  $1,23 \times 10^5$ ,  $1,67 \times 10^4$  và  $1,19 \times 10^5$  CFU/mL, trong khi độc lực và liều gây chết LD<sub>50</sub> của 4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* 1A3, 2A3, 4A3 và 5A3 lần lượt là  $1,47 \times 10^4$ ,  $2,37 \times 10^3$ ,  $1,29 \times 10^3$  và  $1,52 \times 10^4$  CFU/mL.

Hai chủng 1ED3 và 4A3 có độc lực cao nhất trong thí nghiệm trên được chọn gây cảm nhiễm kép trên cá tra bằng phương pháp ngâm và tiêm. Kết quả thí nghiệm cho thấy việc cảm nhiễm kết hợp 2 chủng vi khuẩn này đã làm gia tăng độc lực gây bệnh của vi khuẩn. Bệnh bộc phát mạnh với tỷ lệ cá chết ở các nghiệm thức (NT) nhiễm kép (tỷ lệ cá chết tích lũy dao động từ 80% đến 93,33%) cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với phương pháp cảm nhiễm đơn. Thời gian vi khuẩn gây cá chết trong NT ngâm kép là 12 giờ, sớm hơn so với NT ngâm đơn 2 chủng 1ED3 và 4A3 lần lượt là 96 giờ và 36 giờ. Cá nhiễm kép trong nghiên cứu có các dấu hiệu bệnh tương tự với các dấu hiệu bệnh của cá nhiễm kép ngoài tự nhiên và chủ yếu là các dấu hiệu kết hợp của 2 loại bệnh này. Cá nhiễm kép thường có các dấu hiệu như mắt lồi, các đốm XH xuất hiện quanh các vây, miệng, hậu môn, dịch màu hồng trong xoang bụng và các đốm trắng nhỏ li ti xuất hiện trên các cơ quan như gan, thận

và tỳ tạng. Ngoài ra, kết quả nhuộm Haematoxylin và Eosin (H&E) cho thấy có sự biến đổi cấu trúc tế bào và vùng mô của các cơ quan như gan, thận và tỳ tạng với các hiện tượng thường xuất hiện như sung huyết, XH và hoại tử mất cấu trúc. Tuy nhiên, cấu trúc tế bào và vùng mô ở các mẫu da-cơ và mang của cá nhiễm kép không hoặc ít bị biến đổi trong thời gian theo dõi thí nghiệm.

Kết quả thực hiện kháng sinh đồ trên 67 chủng *E. ictaluri* và 74 chủng *A. hydrophila* cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* đã kháng hầu hết các kháng sinh với tỷ lệ cao như chloramphenicol (94,03%), florfenicol (94,03%), tetracycline (92,54%), streptomycin (74,63%), enrofloxacin (71,64%), gentamicin (46,27%) và norfloxacin (46,27%). Trong khi đó, vi khuẩn *A. hydrophila* kháng hoàn toàn và kháng cao với với các kháng sinh như ampicillin (100%), amoxicillin (100%), cefalexin (100%), tetracycline (90,54%), florfenicol (60,81%) và neomycin (54,05%). Đặc biệt, qua kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập được đều thể hiện tính đa kháng với nhiều loại thuốc kháng sinh. Ngoài ra, kết quả luận án cũng cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong nghiên cứu thường xuyên tiếp xúc với kháng sinh trong môi trường nuôi cá tra với chỉ số đa kháng (MAR) ở các địa điểm thu mẫu đều lớn hơn 0,2.

Nghiên cứu đã xác định các yếu tố di truyền liên quan đến cơ chế đa kháng thuốc của vi khuẩn như sự hiện diện của các integron nhóm 1 ở 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* với tỷ lệ lần lượt là 51,35% và 35,82%. Sử dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen, luận án đã xác định nhiều vùng gen cassette mã hóa cho các enzyme dihydrofolate reductase, aminoglycoside adenylyltransferase, aminoglycoside N(6)-acetyltransferase và  $\beta$ -lactamase kháng lại nhiều loại kháng sinh khác nhau ở 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. Ngoài ra, sự hiện diện của các gen kháng tetracycline như *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetK* và *tetS* đã được phát hiện ở 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* với tỷ lệ lần lượt là 82,5%, 8,75%, 31,25%, 33,75%, 8,75% và 7,5%; trong khi tần số xuất hiện các gen kháng florfenicol là 72,5% và 87,5%. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* có khả năng truyền gen kháng thuốc của chúng sang vi khuẩn *E. coli* trong môi trường ao nuôi cá tra. Tuy nhiên, giữa các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* không có khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc cho nhau.

**Từ khóa:** *Aeromonas hydrophila*, cá tra, *Edwardsiella ictaluri*, integron, sự kháng thuốc.

## SUMMARY

This study was carried out to determine the experimentally pathological characteristics of coinfecting fish and identify the molecular elements related to mechanism of multiple antimicrobial resistance in *E. ictaluri* and *A. hydrophila* cause diseases on intensively cultured striped catfish in the Mekong Delta. By using conventional biochemical tests (including the API 20E identification kit) and molecular biology techniques (PCR and gene sequencing), total of 141 strains of *E. ictaluri* and *A. hydrophila* from bacillary necrosis of *Pangasius* and hemorrhagic infected fish samples were isolated and identified. In which, there were 67 *E. ictaluri* and 74 *A. hydrophila* strains. Among these, there were 22/67 (32.84%) strains of *E. ictaluri* and 22/74 (29.73%) strains of *A. hydrophila* recovered from fish samples infected by both diseases. The gene sequencing results showed that the similarity of isolated bacterial sequence with the reference sequences in the GenBank ranged from 99 to 100% for *E. ictaluri* and from 98 to 100% for *A. hydrophila* strains.

The virulence and pathogenicity of *E. ictaluri* and *A. hydrophila* strains were evaluated by intraperitoneal injection with 0.1 mL/fish at bacterial densities from  $10^2$  to  $10^6$  CFU/fish. The results showed that the moribund fish displayed typical clinical signs of single bacterial infection. Tiny white spots appeared on internal organs such as livers, kidneys and spleens of fish exposed to *E. ictaluri*. Meanwhile, the exophthalmic eyes and petechial spots appeared around the fins, mouth, anus and pinkish fluid in abdominal cavity were also recorded in hemorrhagic disease infected fish by *A. hydrophila*. The virulence and LD<sub>50</sub> values of four strains of *E. ictaluri* (1ED3, 3ED3, 8ED3 and 10ED3) were  $1.58 \times 10^4$ ,  $1.23 \times 10^5$ ,  $1.67 \times 10^4$ , and  $1.19 \times 10^5$  CFU/mL, respectively; while the virulence and LD<sub>50</sub> values of four strains of *A. hydrophila* (1A3, 2A3, 4A3 and 5A3) were  $1.47 \times 10^4$ ,  $2.37 \times 10^3$ ,  $1.29 \times 10^3$  and  $1.52 \times 10^4$  CFU/mL, respectively.

Two isolates (1ED3 and 4A3) with the highest virulence were chosen to conduct coinfection experiments by immersion and injection methods. The results indicated that concurrent infection of two bacterial species significantly increased the virulence of bacteria, compared to single bacterial infection. Severe disease outbreak with high mortality was also observed in dual-infection experiment (cumulative mortality percentage in concurrent infection test ranged from 80% to 93.33%), which were statistically significantly higher than single injection. The duration that caused fish mortality in the mixed infection test using immersion method was 12 hours which was shorter than single infection by separate immersion of 1ED3 (96 hours) and 4A3 (36 hours). The clinical and gross signs of experimentally co-infected fish were similar to those of natural co-infected fish. The typical signs of diseased fish included bulging eyes, petechial hemorrhages around the fins, mouth, anus,

and pinkish fluid in abdominal cavity and tiny white spots in the internal organs such as livers, kidneys, and spleens. Additionally, Haematoxylin and Eosin (H&E) staining results also showed histopathological changes in tissues of organs such as the livers, kidneys and spleens with the phenomenon of congestion, hemorrhage and structural loose necrosis. However, the structural changes strongly took place in the liver, kidney and spleen tissues, whereas muscles-skins and gills of infected fish were significantly not or less affected through the whole experiment.

The antimicrobial susceptibility testing results of 67 strains of *E. ictaluri* and 74 strains of *A. hydrophila* displayed that most of *E. ictaluri* strains were relatively highly resistant to chloramphenicol (94.03%), florfenicol (94.03%), tetracycline (92.54%), streptomycin (74.63%), enrofloxacin (71.64%), gentamicin (46.27%) and norfloxacin (46.27%). Meanwhile, *A. hydrophila* was relatively high resistant to tetracycline (90.54%), florfenicol (60.81%) and neomycin (54.05%) and completely resistant to ampicillin, amoxicillin, cefalexin and trimethoprim/sulfamethoxazole. Particularly, all of two bacterial strains in this study expressed multiple drug resistance. Besides, this research found that the bacterial strains frequently exposed to antibiotics had the MAR index (multiple antibiotic resistance) greater than 0.2 in all sampling sites.

This study detected genetic elements related to the mechanisms of multi-drug resistance of *E. ictaluri* and *A. hydrophila* such as the presence of class 1 integrons with the ratio of 51.35% and 35.82%, respectively. Using PCR technique and gene sequencing, the study identified many different gene cassette regions encoding to dihydrofolate reductase, aminoglycoside adenylyltransferase, aminoglycoside N(6')-acetyltransferase and  $\beta$ -lactamase enzymes resistant to different antibiotics in both bacterial species. Furthermore, this research found the presence of tetracycline resistance genes such as *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetK* and *tetS* of two bacterial species with the ratio of 82.5%, 8.75%, 31.25%, 33.75%, 8.75% and 7.5%, respectively; while the frequency of occurrence of florfenicol resistance gene in *A. hydrophila* and *E. ictaluri* was 72.5% and 87.5%, respectively. Besides, this study demonstrated that *A. hydrophila* and *E. ictaluri* strains were capable of transferring their resistance genes into *E. coli* collected from catfish aquatic environment. However, conjugation and transferability of drug resistance genes between *A. hydrophila* and *E. ictaluri* were not found in this research.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, antibiotic resistance, *Edwardsiella ictaluri*, integron, striped catfish.



# MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
<b>LỜI CAM ĐOAN</b> .....	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN</b> .....	<b>ii</b>
<b>TÓM TẮT</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>v</b>
<b>MỤC LỤC</b> .....	<b>vii</b>
<b>DANH SÁCH BẢNG</b> .....	<b>x</b>
<b>DANH SÁCH HÌNH</b> .....	<b>xi</b>
<b>DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Chương I. GIỚI THIỆU</b> .....	<b>1</b>
1.1 Tính cấp thiết của luận án.....	1
1.2 Mục tiêu của luận án .....	3
1.3 Nội dung nghiên cứu .....	3
1.4 Phạm vi nghiên cứu và giới hạn của luận án.....	3
1.5 Những đóng góp mới của luận án .....	4
1.6 Ý nghĩa thực tiễn của luận án .....	5
<b>Chương II. LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU</b> .....	<b>6</b>
2.1 Tình hình sản xuất và tiêu thụ cá tra nuôi ở ĐBSCL .....	6
2.2 Một số bệnh thường gặp trên cá tra nuôi thâm canh ở ĐBSCL .....	7
2.2.1 Bệnh do KST .....	7
2.2.2 Bệnh do tác nhân vi khuẩn.....	8
2.2.3 Bệnh do vi nấm.....	18
2.2.4 Các bệnh không truyền nhiễm .....	19
2.3 Các nghiên cứu độc lực vi khuẩn nhiễm kép.....	19
2.4 Các biện pháp kiểm soát bệnh do vi khuẩn trên cá tra nuôi ở ĐBSCL .....	20
2.5 Kháng sinh và cơ chế tác động của kháng sinh.....	21
2.5.1 Kháng sinh và sự kháng thuốc của vi khuẩn .....	21
2.5.2 Cơ chế tác động của kháng sinh .....	22
2.5.3 Cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn .....	23
2.6 Sự kháng thuốc của vi khuẩn trong NTTS .....	24
2.6.1 Sự kháng thuốc của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	25
2.6.2 Sự kháng thuốc của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	26
2.7 Hiện tượng và cơ chế đa kháng thuốc của vi khuẩn.....	27
2.8 Các yếu tố di truyền vận động liên quan đến sự kháng thuốc của vi khuẩn ....	28
2.8.1 Plasmid.....	28
2.8.2 Các integron .....	29

2.9	Hiện tượng trao đổi gen kháng thuốc giữa các loài vi khuẩn trong tự nhiên.....	32
2.9.1	Các quá trình tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc của vi khuẩn.....	32
2.9.2	Các kết quả nghiên cứu liên quan đến khả năng truyền gen kháng thuốc giữa nhóm vi khuẩn gây bệnh ở ĐVTS và vi khuẩn <i>E. coli</i> .....	33
2.10	Sự kháng tetracycline của vi khuẩn.....	35
2.10.1	Tổng quan về kháng sinh nhóm tetracycline .....	35
2.10.2	Cơ chế hoạt động của kháng sinh nhóm tetracycline .....	35
2.10.3	Cơ chế kháng tetracycline của vi khuẩn .....	35
2.11	Sự kháng florfenicol của vi khuẩn.....	37
2.11.1	Tổng quan về kháng sinh nhóm phenicol .....	37
2.11.2	Cơ chế hoạt động của kháng sinh nhóm phenicol .....	38
2.11.3	Cơ chế kháng florfenicol của vi khuẩn .....	38
<b>Chương III. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>		<b>39</b>
3.1	Nội dung nghiên cứu .....	39
3.2	Phương tiện nghiên cứu.....	39
3.2.1	Thời gian và địa điểm thí nghiệm .....	39
3.2.2	Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm.....	39
3.2.3	Môi trường và hóa chất thí nghiệm.....	40
3.2.4	Vật liệu thí nghiệm .....	42
3.3	Phương pháp nghiên cứu .....	42
3.3.1	Địa điểm và phương pháp thu mẫu cá tra bệnh .....	42
3.3.2	Phân lập và định danh vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	43
3.3.3	Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	46
3.3.4	Nghiên cứu đặc điểm bệnh học cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> trên cá tra .....	48
3.3.5	Xác định tính nhạy cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	51
3.3.6	Xác định các đặc điểm phân tử liên quan đến sự đa kháng thuốc ở 2 loài vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	53
3.3.7	Thành phần chung cho các phản ứng PCR.....	59
3.3.8	Phương pháp phân tích và xử lý số liệu.....	59
<b>Chương IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>		<b>60</b>
4.1	Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn .....	60
4.1.1	Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	60
4.1.2	Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	60
4.1.3	Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn <i>E. coli</i> .....	71
4.2	Kết quả cảm nhiễm cá tra với vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	72

4.2.1	Kết quả cảm nhiễm cá tra với các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	72
4.2.2	Kết quả cảm nhiễm cá tra với các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	728
4.3	Đặc điểm bệnh học cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> trên cá tra .....	83
4.3.1	Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn.....	83
4.3.2	Dấu hiệu bệnh lý của cá bệnh .....	84
4.3.3	Khả năng gây bệnh khi gây cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn .....	86
4.3.4	Kết quả quan sát mẫu bằng phết kính tiêu bản tươi.....	90
4.3.5	Biến đổi cấu trúc mô của 1 số cơ quan cá bệnh.....	91
4.4	Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	98
4.4.1	Sự kháng thuốc của vi khuẩn của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	98
4.4.2	Sự đa kháng thuốc của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	104
4.4.3	Các kiểu hình đa kháng thuốc phổ biến của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	106
4.4.4	Chỉ số đa kháng thuốc MAR của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	107
4.5	Sự hiện diện các integron nhóm 1, 2 và 3 ở vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	109
4.5.1	Sự hiện diện các integron nhóm 1, 2 và 3 .....	109
4.5.2	Đặc điểm vùng gen cassette của các chủng <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> dương tính với integron nhóm 1 .....	118
4.5.3	Khảo sát vùng 3'-conserved segment (CS) của các integron nhóm 1 .....	123
4.6	Sự hiện diện của các gen kháng florfenicol và tetracycline ở 2 loài vi khuẩn.....	126
4.6.1	Sự hiện diện của các gen kháng tetracycline ở vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	126
4.6.2	Sự hiện diện của các gen kháng florfenicol ở vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	135
4.7	Sự hiện diện của các plasmid ở vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	136
4.7.1	Sự hiện diện của các plasmid ở vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	137
4.7.2	Sự hiện diện của các plasmid ở vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	137
4.8	Kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc của các vi khuẩn .....	141
	<b>Chương V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>145</b>
5.1	Kết luận .....	145
5.2	Đề nghị .....	146
	<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>147</b>
	<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>175</b>

## DANH SÁCH BẢNG

	<b>Trang</b>
Bảng 2.1: Một số đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	9
Bảng 2.2: Một số đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	13
Bảng 2.3: Ước tính lượng kháng sinh sử dụng trong NTTS ở các quốc gia trên thế giới .....	22
Bảng 2.4: Các gen kháng đáp ứng tetracycline .....	37
Bảng 3.1: Thông tin các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> được chọn thí nghiệm cảm nhiễm .....	47
Bảng 3.2: Trình tự các cặp môi dùng để phát hiện các integron nhóm 1, 2 và 3 ...	57
Bảng 3.3: Các đoạn môi và điều kiện phản ứng PCR xác định các gen kháng tetracycline và florfenicol ở vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	578
Bảng 3.4: Thành phần các hóa chất chung để thực hiện phản ứng PCR .....	59
Bảng 4.1: Số chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> phân lập từ cá tra bệnh GTM hoặc cá nhiễm kép bệnh XH và GTM ở 1 số tỉnh ĐBSCL .....	60
Bảng 4.2: Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh hóa và định danh vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> bằng bộ kit API 20E .....	64
Bảng 4.3: Số chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập từ cá tra bệnh XH hoặc cá nhiễm kép 2 bệnh XH và GTM ở 1 số tỉnh ĐBSCL .....	66
Bảng 4.4: Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh hóa và định danh vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được .....	69
Bảng 4.5: Giá trị LD <sub>50</sub> của các chủng <i>E. ictaluri</i> cảm nhiễm trên cá tra .....	77
Bảng 4.6: Giá trị LD <sub>50</sub> của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> cảm nhiễm trên cá tra .....	81
Bảng 4.7: Số lượng cá chết tích lũy và kết quả phân lập vi khuẩn trong thí nghiệm cảm nhiễm kép bằng phương pháp ngâm và tiêm .....	83
Bảng 4.8: Các kiểu hình đa kháng phổ biến của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	107
Bảng 4.9: Các kiểu hình đa kháng phổ biến của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	107
Bảng 4.10: Chỉ số đa kháng MAR của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> ở 1 số tỉnh ĐBSCL .....	108
Bảng 4.11: Sự hiện diện các integron nhóm 1 và kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	112
Bảng 4.12: Sự hiện diện các integron nhóm 1 và kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	113
Bảng 4.13: Kết quả so sánh trình tự các vùng gen cassette của 2 loài vi khuẩn trên ngân hàng NCBI .....	120
Bảng 4.14: Sự hiện diện các gen kháng florfenicol và tetracycline ở các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> .....	129
Bảng 4.15: Số lượng và kích thước plasmid ở các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> ....	138
Bảng 4.16: Số lượng và kích thước plasmid ở các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	140
Bảng 4.17: Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn nhận gen kháng thuốc sau khi tiếp hợp .....	143

## DANH SÁCH HÌNH

Trang

Hình 2.1: Sản lượng và kim ngạch xuất khẩu cá tra của ĐBSCL giai đoạn 1997-2014 .....	7
Hình 2.2: Các loại bệnh phổ biến trên cá tra nuôi ở ĐBSCL .....	8
Hình 2.3: Sơ đồ minh họa quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn <i>Aeromonas</i> vào vật chủ qua vết thương .....	16
Hình 2.4: Các nhóm kháng sinh và cơ chế tác động của chúng lên tế bào vi khuẩn.....	23
Hình 2.5: Cơ chế đề kháng tự nhiên của vi khuẩn .....	24
Hình 2.6: Cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn.....	25
Hình 2.7: Các hệ thống bơm đa kháng của vi khuẩn.....	28
Hình 2.8: Sự trao đổi gen kháng thuốc qua plasmid .....	29
Hình 2.9: Cấu trúc chung của các integron và cơ chế thu nhận các gen cassette của integron .....	30
Hình 2.10: Cấu trúc chung của các integron nhóm 1 .....	31
Hình 2.11: Các quá trình chuyển gen ngang ở vi khuẩn .....	33
Hình 2.12: Cơ chế hoạt động của các kháng sinh thuộc nhóm tetracycline.....	36
Hình 2.13: Các cơ chế kháng tetracycline ở vi khuẩn.....	36
Hình 3.1: Sơ đồ minh họa các nội dung nghiên cứu chính của luận án .....	39
Hình 3.2: Các địa điểm thu mẫu cá tra công nghiệp ở vùng ĐBSCL .....	43
Hình 3.3: Sơ đồ minh họa phương pháp bố trí thí nghiệm cảm nhiễm đơn và cảm nhiễm kép các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> trên cá tra.....	51
Hình 3.4: Sơ đồ minh họa vị trí khuếch đại 1 số gen trên các integron nhóm 1 và 2.....	55
Hình 4.1: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	61
Hình 4.2: Kết quả định danh vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> phân lập được bằng bộ kit API 20E.....	652
Hình 4.3: Phổ điện di ADN của các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> .....	65
Hình 4.4: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	67
Hình 4.5: Hình 4.5: Kết quả định danh vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được bằng bộ kit API 20E.....	67
Hình 4.6: Phổ điện di ADN của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	70
Hình 4.7: Các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn <i>E. coli</i> phân lập được từ ruột và nước ao nuôi cá tra ở Đồng Tháp.....	72

Hình 4.8: Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> sau khi cảm nhiễm trên cá tra.....	73
Hình 4.9: Dấu hiệu biểu hiện bệnh GTM của cá tra cảm nhiễm với vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> chủng 1ED3. ....	75
Hình 4.10: Tỷ lệ (%) cá tra chết tích lũy theo thời gian cảm nhiễm của 4 chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> . ....	76
Hình 4.11: Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> . ....	79
Hình 4.12: Dấu hiệu biểu hiện bệnh XH của cá tra cảm nhiễm với vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> chủng 4A3. ....	80
Hình 4.13: Tỷ lệ (%) cá chết tích lũy theo thời gian của cá tra cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> . ....	81
Hình 4.14: Kết quả tái phân lập và định danh 2 loài vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> sau khi cảm nhiễm kết hợp trên cá tra. ....	85
Hình 4.15: Các dấu hiệu bên ngoài của cá bệnh do nhiễm kép 2 chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> (4A3) và <i>E. ictaluri</i> (1ED3). ....	85
Hình 4.16: Dấu hiệu bên trong cá cảm nhiễm kép 2 chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> (4A3) và <i>E. ictaluri</i> (1ED3). ....	86
Hình 4.17: Tỷ lệ (%) cá chết tích lũy qua các ngày cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> trên cá tra bằng phương pháp ngâm... ..	87
Hình 4.18: Tỷ lệ cá (%) cá chết tích lũy qua các ngày cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> trên cá tra bằng phương pháp tiêm.... ..	88
Hình 4.19: Các mẫu phết kính cá nhiễm kép 2 loài vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> (Wright-Giemsa, 100X) .....	932
Hình 4.20: Đặc điểm mô da-cơ cá tra nhiễm kép (H&E).....	93
Hình 4.21: Đặc điểm mô mang cá tra nhiễm kép (H&E).....	95
Hình 4.22: Đặc điểm mô thận cá tra nhiễm kép (H&E).....	96
Hình 4.23: Đặc điểm mô tỳ tạng cá tra nhiễm kép (H&E).....	97
Hình 4.24: Đặc điểm mô gan cá tra cá nhiễm kép (H&E). ....	98
Hình 4.25: Kết quả thực hiện kháng sinh đồ vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> . ....	99
Hình 4.26: Tỷ lệ (%) các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> nhạy cảm với các kháng sinh .....	99
Hình 4.27: Kết quả thực hiện kháng sinh đồ vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> . ....	100
Hình 4.28: Tỷ lệ (%) các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> kháng, nhạy với các loại kháng sinh .....	100
Hình 4.29: Tỷ lệ (%) kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> đối với các loại kháng sinh. ....	101

Hình 4.30: Tỷ lệ (%) vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> đa kháng thuốc. ....	105
Hình 4.31: Tỷ lệ (%) vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> đa kháng thuốc. ....	105
Hình 4.32: Tỷ lệ (%) vi khuẩn đa kháng thuốc ở 2 loài vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> . ....	106
Hình 4.33: So sánh chỉ số đa kháng MAR của vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> và <i>A. hydrophila</i> ở 1 số tỉnh ĐBSCL. ....	109
Hình 4.34: Kết quả PCR xác định các gen <i>IntI1</i> ở vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	111
Hình 4.35: Tỷ lệ (%) xuất hiện các các integron nhóm 1 ở 2 loài vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	116
Hình 4.36: Vùng gen cassette của các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> dương tính với các integron nhóm 1. ....	118
Hình 4.37: Vùng gen cassette của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> dương tính với các integron nhóm 1. ....	119
Hình 4.38: Gen <i>qacEΔ1</i> của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	126
Hình 4.39: Gen <i>sul1</i> của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	126
Hình 4.40: Gen <i>sul2</i> của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	126
Hình 4.41: Gen <i>sul3</i> của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	126
Hình 4.42: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen <i>tetA</i> ở các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	127
Hình 4.43: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen <i>tetB</i> ở các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	127
Hình 4.44: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen <i>tetC</i> ở các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	127
Hình 4.45: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen <i>tetG</i> ở các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	128
Hình 4.46: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen <i>tetK</i> ở các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	128
Hình 4.47: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen <i>tetS</i> ở các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> . ....	128
Hình 4.48: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen kháng florfenicol ở vi khuẩn. ....	136
Hình 4.49: Kết quả điện di plasmid các chủng vi khuẩn <i>E. ictaluri</i> . ....	137
Hình 4.50: Kết quả điện di plasmid các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> . ....	139
Hình 4.51: Kết quả tiếp hợp giữa vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> và <i>E. ictaluri</i> với vi khuẩn <i>E. coli</i> . ....	142

## DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
ADH	Arginine hidrolate
ADN	Acid deoxyribonucleic
AMO	Amoxicillin
AMP	Ampicillin
AMY	Amygdalin
ARA	Arabinose
BHIA	Brain heart infusion agar
BHIB	Brain heart infusion broth
BKD	Bacterial Kidney Disease
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNN-PTNT	Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
BNP	Bacillary Necrosis of <i>Pangasius</i>
Bp	Base pairs
CFL	Cefalexin
CFU	Colony forming unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)
CIP	Ciprofloxacin
CIT	Sodium citrate
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
CTX	Cefotaxime
ĐBSCL	Đồng bằng sông Cửu Long
ĐHCT	Đại học Cần Thơ
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphate
DOX	Doxycycline
ĐVTS	Động vật thủy sản
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. ictaluri</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
EIM	Edwardsiella ictaluri medium
ENR	Enrofloxacin
ESC	Enteric Septicemia of Catfish
EtBr	Ethidium bromide
EUS	Epizootic ulcerative syndrome (hội chứng/bệnh lở loét)
FFC	Florfenicol
GEL	Gelatin
GEN	Gentamicin
GLU	Glucose
GTM	Gan thận mủ
H&E	Haematoxyline và Eosin
H <sub>2</sub> S	Hydrogen sulfide
CHL	Chloramphenicol
IND	Indole
INO	Inositol



Kbp	Kilobase pairs
KST	Ký sinh trùng
LD <sub>50</sub>	Lethal dose, 50% (liều gây chết 50)
LDC	Lysine decarboxylate
MAN	Mannitol
MAR	Multiple antibiotic resistance index (chỉ số đa kháng)
MAS	Motile aeromonad septicaemia (nhiễm trùng huyết do nhóm <i>Aeromonas</i> di động)
MCK	MacConkey agar
MEL	Melibiose
MHA	Muller-Hinton agar
MIC	Minimal inhibitory concentration (nồng độ ức chế tối thiểu)
NB	Nutrient broth
NBF	Neutral buffer formalin (dung dịch đệm formol trung tính)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEO	Neomycin
NOR	Norfloxacin
NT	Nghiệm thức
NTTS	Nuôi trồng thủy sản
ODC	Ornithine decarboxylate
ONPG	Ortho-nitrophenyl galactosidase
PCR	Polymerase chain reaction (phản ứng PCR)
RHA	Rhamnose
SAC	Sucrose
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Scanning Electron Microscope
SOR	Sorbitol
STR	Streptomycin
SXT	Trimethoprim/sulfamethoxazole
TDA	Tryptophane deaminase
TET	Tetracycline
THIO	Thioglycollate
TSA	Tryptic soy agar
URE	Urease
VASEP	Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam
VP	Voges-Proskauer
XH	Xuất huyết

# Chương I. GIỚI THIỆU

## 1.1 Tính cấp thiết của luận án

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là 1 trong những loài cá da trơn nước ngọt có giá trị kinh tế cao được nuôi phổ biến ở ĐBSCL (Phan *et al.*, 2009). Tuy nhiên, trong những năm gần đây, việc sản xuất và tiêu thụ cá tra đang phải đối mặt với nhiều khó khăn và thách thức do giá cả bấp bênh, thị trường xuất khẩu không ổn định và việc thâm canh hóa với mật số nuôi cao đã làm cho bệnh trên cá xảy ra thường xuyên hơn (Dung *et al.*, 2008; Le and Cheong, 2010). Nhiều tác nhân gây bệnh (chủ yếu là các bệnh do vi khuẩn và ký sinh trùng (KST) xuất hiện trên cá tra nuôi ở ĐBSCL đã được báo cáo (Crumlish *et al.*, 2002; Dung *et al.*, 2008; Nguyễn Thị Thu Hằng và *ctv.*, 2008; Ly *et al.*, 2009; Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2012). Đặc biệt, các kết quả nghiên cứu gần đây đã xác định 2 loài vi khuẩn gây bệnh phổ biến và gây thiệt hại lớn cho nghề nuôi cá tra là bệnh GTM do vi khuẩn *E. ictaluri* (Crumlish *et al.*, 2002; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2004) và bệnh XH do vi khuẩn *A. hydrophila* (Ly *et al.*, 2009; Crumlish *et al.*, 2010). Đây là 2 bệnh có thể xảy ra trên cá tra ở tất cả các giai đoạn nuôi với tỷ lệ hao hụt có thể lên đến 90% (Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2015).

Cho đến nay, kháng sinh vẫn là giải pháp chủ yếu để kiểm soát 2 bệnh này. Tuy nhiên, việc sử dụng quá nhiều thuốc kháng sinh (Nguyễn Chính, 2005; Nguyễn Quốc Thịnh và *ctv.*, 2014; Phu *et al.*, 2015) là 1 thách thức không nhỏ đang đặt ra cho nghề nuôi cá tra ở ĐBSCL do nhiều báo cáo cho thấy việc tồn dư của kháng sinh trong thực phẩm và vấn đề kháng thuốc của vi khuẩn (Cabello, 2006; Sarter *et al.*, 2007; Akinbowale *et al.*, 2007). Các nghiên cứu gần đây cho thấy 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra đã kháng với nhiều loại kháng sinh sử dụng trong nuôi trồng thủy sản (NTTS) (Crumlish *et al.*, 2002; Dung *et al.*, 2008; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2010). Ngoài ra, vi khuẩn kháng thuốc có thể là nguồn để truyền và phát tán các gen kháng thuốc của chúng cho các loài vi khuẩn khác (van Elsas and Bailey, 2002; Heuer *et al.*, 2009; Aminov, 2011; Marshall and Levy, 2011; Van Meervenne *et al.*, 2012), đặc biệt là các loài vi khuẩn có tiềm năng, nguy cơ gây bệnh cho con người như vi khuẩn *Escherichia coli*, *Aeromonas* sp. và *Pseudomonas* sp. (DePaola *et al.*, 1995; Dung *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2014). Điều này có thể ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến sức khỏe người tiêu dùng.

Bên cạnh đó, người nuôi còn sử dụng kết hợp nhiều loại kháng sinh (Phu *et al.*, 2015) để điều trị bệnh trên cá tra dẫn đến hiện tượng đa kháng thuốc (multi-drug resistance/multiple antibiotic resistance) của vi khuẩn (kháng ít nhất 2 hoặc 3 loại kháng sinh trở lên) (McPhearson *et al.*, 1991; DePaola *et al.*, 1995; Sarter *et al.*, 2007). Kết quả nghiên cứu của Dung *et al.* (2008) đã xác định 73% vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra bệnh biểu hiện sự đa kháng thuốc. Trong khi đó, nghiên cứu của Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2010) cho thấy có đến 96% vi khuẩn *E. ictaluri* và 23% vi khuẩn *A. hydrophila* thể hiện sự đa kháng. Hậu quả của trình trạng vi khuẩn đa kháng thuốc dẫn đến việc điều trị trở nên khó khăn và kém hiệu quả do liều lượng kháng sinh sử dụng tăng và thời gian điều trị kéo dài hơn (Phu *et al.*, 2015).

Đặc biệt, trong vài năm trở lại đây hiện tượng nhiễm kép xuất hiện rất phổ biến trên các động vật thủy sản (ĐVTS): vật chủ bị nhiễm 2 hay nhiều tác nhân gây bệnh khác nhau và mỗi tác nhân cùng ảnh hưởng có hại đến vật chủ (Bakaletz, 2004; Kotob *et al.*, 2016). Trên cá tra nuôi ở ĐBSCL thì hiện tượng nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đã gây nhiều thiệt hại và tổn thất cho người nuôi do tỷ lệ cá chết cao đã được Crumlish and Dung (2002) ghi nhận. Kết quả nghiên cứu của Nusbaum and Morrison (2002) cho thấy cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) khi bị nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* chưa biểu hiện bệnh nhưng bệnh sẽ bộc phát mạnh khi cá nhiễm thêm vi khuẩn *E. ictaluri*. Hiện nay, việc chẩn đoán bệnh trên cá của người nuôi chủ yếu dựa vào các dấu hiệu biểu hiện lâm sàng thường hay xuất hiện hoặc gửi mẫu xét nghiệm. Điều này không thể đáp ứng được yêu cầu điều trị khi bệnh bùng phát do phải mất thời gian xét nghiệm hoặc do việc chẩn đoán sai tác nhân gây bệnh vì các dấu hiệu bệnh ngoài tự nhiên thường giống nhau có thể do 1 hoặc nhiều tác nhân cùng gây bệnh.

Do đó, để ngành nuôi cá tra thâm canh ở ĐBSCL phát triển bền vững thì việc tìm ra các giải pháp kiểm soát, quản lý dịch bệnh và cuối cùng là đưa ra các biện pháp hiệu quả trong việc phòng và trị đối với 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra là rất cần thiết. Để thực hiện được điều đó, trước hết cần phải có những kiến thức về đặc điểm bệnh học do 2 loài vi khuẩn này cùng gây bệnh trên cá tra. Ngoài ra, cơ chế đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn cũng cần được làm sáng tỏ nhằm quản lý và sử dụng kháng sinh hiệu quả và an toàn hơn. Cho đến nay, việc nghiên cứu các đặc điểm bệnh học nhiễm đơn và hiện tượng kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn trên đã được thực hiện bởi nhiều tác giả (Ferguson *et al.*, 2001; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2009; Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010; Nguyễn Thiện Nam và *ctv.*, 2010). Tuy nhiên, các thông tin về bệnh học

cá tra nhiễm kép và các đặc điểm phân tử liên quan đến cơ chế đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn trên chưa được nghiên cứu ở nước ta. Xuất phát từ thực tế trên, đề tài: “**Nghiên cứu đặc điểm bệnh học và cơ chế đa kháng thuốc của hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh ở Đồng bằng sông Cửu Long**” được thực hiện.

## **1.2 Mục tiêu của luận án**

Xác định được 1 số đặc điểm bệnh học cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra nuôi thâm canh ở ĐBSCL nhằm làm cơ sở cho việc phát hiện và chẩn đoán bệnh.

Xác định được cơ chế đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* nhằm mục đích kiểm soát, quản lý và sử dụng kháng sinh hiệu quả trên các ao nuôi cá tra ở ĐBSCL.

## **1.3 Nội dung nghiên cứu**

Để đạt được 2 mục tiêu trên, nghiên cứu đã thực hiện các nội dung sau:

Phân lập và định danh vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh GTM và XH trên cá tra nuôi thâm canh ở 1 số tỉnh ĐBSCL. Ngoài ra, đề tài còn phân lập các chủng vi khuẩn *E. coli* từ ruột và nước ao nuôi cá tra để khảo sát khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đối với vi khuẩn này.

Nghiên cứu 1 số đặc điểm bệnh học (dấu hiệu biểu hiện bệnh, thời gian vi khuẩn gây bệnh, tỷ lệ cá chết và các đặc điểm mô bệnh học) cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

Khảo sát tính nhạy cảm kháng sinh và hiện tượng đa kháng thuốc của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập từ cá tra bệnh.

Nghiên cứu các đặc điểm phân tử liên quan đến cơ chế đa kháng thuốc của vi khuẩn như xác định sự hiện diện các integron nhóm 1, 2 và 3; sự hiện diện của các plasmid kháng thuốc và xác định 1 số gen kháng thuốc kháng sinh ở 2 loài vi khuẩn này.

Khảo sát khả năng tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* với vi khuẩn *E. coli* cũng như khả năng tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn này với nhau.

## **1.4 Phạm vi nghiên cứu và giới hạn của luận án**

Nghiên cứu chỉ phân lập các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ các cơ quan gan, thận và tỳ tạng của cá tra bệnh GTM và XH hoặc cá nhiễm kép 2 bệnh này ở 1 số tỉnh có diện tích và sản lượng nuôi thâm canh lớn của

vùng ĐBSCL mà không phân lập 2 loài vi khuẩn này từ môi trường ao nuôi cá tra (nước và bùn).

Đề tài chỉ khảo sát độc lực của 4 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và 4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* đại diện cho các chủng vi khuẩn được phân lập ở các vùng nuôi cá tra khác nhau của ĐBSCL có số lượng cá nhiễm bệnh và tỷ lệ chết cao và chỉ thực hiện thí nghiệm cảm nhiễm kép trên 2 chủng có độc lực cao nhất. Thêm vào đó, luận án chỉ khảo sát sự hiện diện của các integron nhóm 1, 2 và 3 (liên quan đến kiểu hình kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn) mà không xác định các integron nhóm 4 và 5 do các integron nhóm 4 và 5 không phổ biến như các integron nhóm 1, 2 và 3.

Ngoài ra, nghiên cứu chỉ xác định sự hiện diện của các gen kháng tetracycline và florfenicol (đây là 2 trong số nhiều loại kháng sinh được sử dụng phổ biến trước đây cũng như ở thời điểm hiện tại trong các ao nuôi cá tra ở ĐBSCL).

### **1.5 Những đóng góp mới của luận án**

Luận án góp phần cung cấp các thông tin quan trọng về các đặc điểm bệnh học của việc nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra nuôi ở ĐBSCL như thời gian vi khuẩn gây bệnh, tỷ lệ cá chết và các đặc điểm bệnh học ở mức đại thể và vi thể như các dấu hiệu biểu hiện bệnh (bên ngoài và bên trong) và các biến đổi về mặt mô bệnh học của 1 số cơ quan cá bệnh.

Cung cấp các thông tin mới về tính nhạy cảm kháng sinh, đặc biệt là hiện trạng đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra nuôi ở ĐBSCL. Ngoài ra, luận án còn cung cấp các thông tin liên quan đến khả năng kháng thuốc kháng sinh của 2 loài vi khuẩn trên ở mức độ phân tử như xác định 1 số gen kháng tetracycline (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetK* và *tetS*), florfenicol và sulfonamide (*sul1*, *sul2* và *sul3*) mà các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn.

Luận án góp phần làm sáng tỏ cơ chế đa kháng thuốc ở mức phân tử của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* như xác định sự hiện diện của các plasmid kháng thuốc, các integron nhóm 1 cũng như xác định được các vùng gen cassette của vi khuẩn mã hóa cho các gen kháng thuốc khác nhau mà các nghiên cứu trước đây trong và ngoài nước chưa đề cập đến. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* có khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc cho vi khuẩn vi khuẩn *E. coli* thông qua các plasmid và integron. Tuy nhiên, giữa 2 loài vi khuẩn này thì không có khả năng tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc với nhau.

## 1.6 Ý nghĩa thực tiễn của luận án

Nghiên cứu đặc điểm bệnh học cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn này là cơ sở và tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc tìm ra các giải pháp kiểm soát, quản lý dịch bệnh và cuối cùng là đưa ra các biện pháp phòng trị bệnh GTM và bệnh XH trên cá tra hiệu quả và an toàn. Đặc biệt, kết quả của nghiên cứu này là cơ sở khoa học để ứng dụng công nghệ cao cho việc sản xuất vaccine đa giá có thể phòng cùng lúc 2 loài vi khuẩn nguy hiểm này trên cá tra trong tương lai.

Các thông tin về tính nhạy cảm kháng sinh và hiện trạng đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra giúp người nuôi cá có thể lựa chọn kháng sinh thích hợp trong việc điều trị bệnh do 2 loài vi khuẩn này 1 cách hiệu quả và sẽ tiết kiệm được chi phí điều trị, góp phần nâng cao thu nhập cho người nuôi.

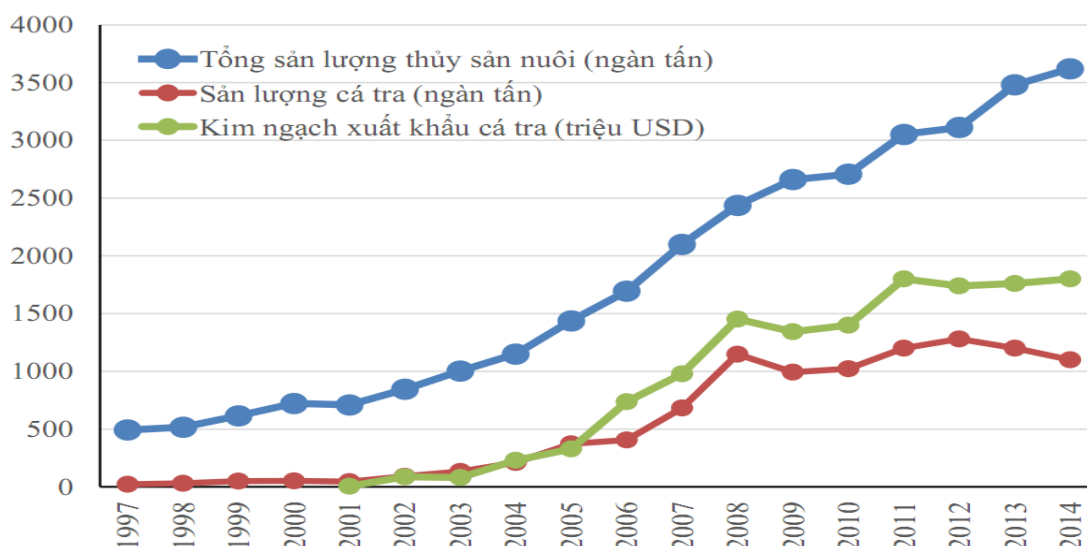
Việc làm sáng tỏ bản chất phân tử của cơ chế đa kháng thuốc, hiện tượng kháng thuốc kháng sinh được truyền qua integron và plasmid của vi khuẩn, khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn này với vi khuẩn *E. coli* và giữa 2 loài vi khuẩn này với nhau sẽ giúp cho các nhà khoa học và cơ quan quản lý thuốc kháng sinh có các giải pháp tương lai để ngăn chặn và kiểm soát sự bùng phát mạnh mẽ hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn hiện nay nhằm hướng đến việc sản xuất cá tra an toàn và bền vững.

## Chương II. LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU

### 2.1 Tình hình sản xuất và tiêu thụ cá tra nuôi ở ĐBSCL

Nghề nuôi cá tra thương phẩm ở ĐBSCL bắt đầu xuất hiện từ những năm của thập niên 1950 với quy mô nhỏ và cá nuôi chủ yếu là dựa vào nguồn cá giống sẵn có trong tự nhiên (Nguyễn Thanh Phương và *ctv.*, 2015). Tuy nhiên, từ cuối thập niên 1990 nghề nuôi cá tra đã phát triển vượt bậc do sự thành công trong việc sản xuất giống nhân tạo loài cá này cùng với các hệ thống và phương pháp nuôi đa dạng như từ nuôi đăng quảng, nuôi bè cho đến nuôi trong ao đất (Phan *et al.*, 2009). Theo báo cáo của Phan *et al.* (2009) thì cá tra đạt sản lượng kỷ lục 683 nghìn tấn với giá trị xuất khẩu hơn 645 triệu đô la Mỹ vào năm 2007, đến năm 2010 thì sản lượng cá tra là 1.141.000 tấn và đạt kim ngạch xuất khẩu khoảng 1,4 tỉ đô la Mỹ (De Silva and Phuong, 2011). Trong 10 năm, từ năm 1997 đến 2007 được xem là giai đoạn hoàng kim của nghề nuôi cá tra với diện tích nuôi tăng 8 lần (từ 1.250 ha lên hơn 9.000 ha), sản lượng cá tra thương phẩm tăng 45 lần (từ 22.500 tấn lên hơn 1.200.000 tấn) và giá trị xuất khẩu tăng 50 lần (từ 19,7 triệu đô la Mỹ lên đến 979.036 triệu đô la Mỹ) (Phuong and Oanh, 2010). Hình 2.1 trình bày chi tiết sản lượng và kim ngạch xuất khẩu cá tra của ĐBSCL giai đoạn 1997-2014.

Một trong những nguyên nhân làm diện tích và sản lượng cá tra ở ĐBSCL tăng cao là do chúng có khả năng thích nghi tốt với điều kiện môi trường, khí hậu khắc nghiệt và đặc biệt chúng là loài cá rất thích hợp sinh trưởng của vùng này (Đỗ Thị Thanh Hương và *ctv.*, 2015). Ngoài ra, cá tra có thịt ngon và được ưa chuộng bởi người tiêu dùng của nhiều nước trên thế giới. Hiện tại, cá tra đã được nuôi thâm canh ở hầu hết các tỉnh ở ĐBSCL, trong đó An Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ là các tỉnh có diện tích và sản lượng cá tra lớn nhất của vùng (Phan *et al.*, 2009). Theo báo cáo thì phần lớn (trên 90%) sản lượng cá tra nuôi ở nước ta được chế biến và xuất khẩu (De Silva and Phuong, 2011). Hiện tại, cá tra nước ta đã được xuất khẩu sang hơn 180 quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới (Nguyễn Thanh Phương và *ctv.*, 2015). Trong những năm gần đây, việc sản xuất và tiêu thụ cá tra ở ĐBSCL mặc dù gặp nhiều khó khăn do giá nguyên liệu giảm nhưng diện tích và sản lượng cá tra vẫn duy trì ở mức cao, theo đó diện tích nuôi hiện nay khoảng 5.100 ha, sản lượng nuôi dao động từ 1,1-1,2 triệu tấn/năm và kim ngạch xuất khẩu đạt khoảng 1,8 tỉ đô la Mỹ /năm (Nguyễn Thanh Phương và *ctv.*, 2015).



Hình 2.1: Sản lượng và kim ngạch xuất khẩu cá tra của ĐBSCL giai đoạn 1997-2014 (Nguyễn Thanh Phương và *ctv.*, 2015).

## 2.2 Một số bệnh thường gặp trên cá tra nuôi thâm canh ở ĐBSCL

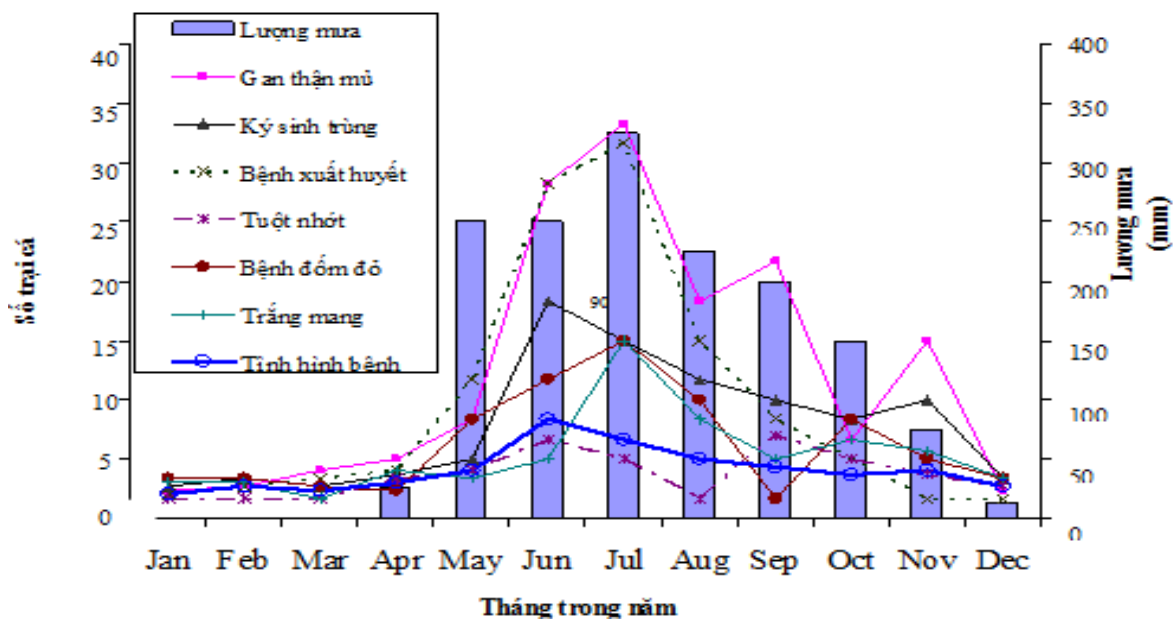
### 2.2.1 Bệnh do KST

Các bệnh do KST gây ra cũng thường hay xuất hiện trên cá tra nuôi ở ĐBSCL (Dung *et al.*, 2008). Trên cá tra, KST thường hay ký sinh trên da, vây, mang, hốc mũi và xoang miệng của cá làm cho cá khó thở, bỏ ăn, sinh trưởng chậm và sức đề kháng giảm (Nguyễn Thị Thu Hằng và *ctv.*, 2008). Ở giai đoạn cá bột và cá hương nếu nuôi mật độ dày, cơ thể cá còn non nên thường có cường độ và tỷ lệ cảm nhiễm cao và gây thiệt hại lớn cho sản xuất (Dung *et al.*, 2008; Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012). Kết quả điều tra của Phan *et al.* (2009) cho thấy trên 80% cá tra nhiễm KST trong quá trình nuôi (Hình 2.2). Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và *ctv.* (2008) đã xác định 19 loài KST (gồm 13 loài nội ký sinh và 6 loài ngoại ký sinh) xuất hiện trên các hệ thống nuôi cá tra nuôi thâm canh ở An Giang, trong khi đó kết quả điều tra về thành phần KST trên cá tra ở Đồng Tháp của Vũ Đặng Hạ Quyên và *ctv.* (2014) đã xác định 9 loài KST (gồm 7 loài nội ký sinh và 2 loài ngoại ký sinh).

Nhìn chung, qua các kết quả nghiên cứu trên cho thấy các loại KST phổ biến được tìm thấy trên cá tra nuôi ở ĐBSCL gồm nhóm thích bào tử trùng *Myxozoa* (*Myxobolus* và *Henneguya*); vi bào tử trùng (*Microsporidium*); trùng bánh xe hay trùng mặt trời (*Trichodina*); trùng quả dưa (*Ichthyophthirius*), sán lá 16 móc (*Dactylogyrus*), trùng loa kèn (*Apiosoma*), trùng roi (*Trypanosoma*), trùng lông (*Balantidium*) và nhóm *Epistylis* (Dung *et al.*, 2008; Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012; Phu *et al.*, 2015). Gần đây, nghiên



cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2016) cũng đã xác định vi bào tử trùng là tác nhân gây bệnh “gạo” trên cá tra.



Hình 2.2: Các loại bệnh phổ biến trên cá tra nuôi ở ĐBSCL (Phan *et al.*, 2009).

## 2.2.2 Bệnh do tác nhân vi khuẩn

### 2.2.2.1 Bệnh GTM do vi khuẩn *E. ictaluri*

#### a. Phân loại và đặc điểm sinh học của vi khuẩn *E. ictaluri*

Vi khuẩn *E. ictaluri* thuộc giống *Edwardsiella*, họ *Enterbacteriaceae*, bộ *Enterobacteriales*, lớp *Gammaproteobacteria* và ngành *Proteobacteria* (Abbott and Janda, 2006). Giống *Edwardsiella* lần đầu tiên được mô tả vào năm 1965 bởi Ewing *et al.* (1965). Trong giống này, ngoài vi khuẩn *E. ictaluri* còn có 2 loài khác là *E. hoshinae* và *E. tarda* (Sakazaki, 2001). Cho đến nay, nhiều báo cáo cho thấy 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *E. tarda* là các tác nhân gây bệnh nguy hiểm cho nhiều loài cá và ảnh hưởng nghiêm trọng cho ngành công nghiệp NTTS của nhiều nước trên thế giới (Crumlish *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 2003; Yamada and Wakabayashi, 1999; Sakai *et al.*, 2009; Shetty *et al.*, 2014). Trong khi đó, vi khuẩn *E. hoshinae* được báo cáo là chỉ gây bệnh trên các loài bò sát và chim (Grimont *et al.*, 1980).

*E. ictaluri* thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, hình que, kích thước biến đổi từ 1,2-1,5 x 0,4-0,6  $\mu\text{m}$  (Waltman *et al.*, 1986; Ye *et al.*, 2009). Vi khuẩn *E. ictaluri* có thể phát triển trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau như môi trường MacConkey agar (MCK), tryptic soy agar (TSA), brain heart infusion agar (BHIA) và thioglycollate (THIO) (Shotts and Waltman, 1990). Vi khuẩn phát triển chậm trên các môi trường như TSA hay BHIA, sau 48 giờ cấy

khuẩn lạc có dạng hình tròn, kích thước tương đối nhỏ (đường kính dao động từ 1-2 mm). Vi khuẩn có khả năng di động yếu, không sinh bào tử, yếm khí tùy tiện, lên men trong môi trường glucose, phản ứng catalase dương tính, âm tính trong phản ứng oxidase (Bảng 2.1). Chúng phát triển tốt ở 28°C và tăng trưởng chậm hoặc không tăng trưởng ở 37°C (Hawke *et al.*, 1981; Waltman *et al.*, 1986). Nhìn chung, vi khuẩn *E. ictaluri* có 1 số đặc điểm sinh hóa giống với vi khuẩn *E. tarda*. Tuy nhiên, vi khuẩn *E. ictaluri* cho phản ứng indole và H<sub>2</sub>S âm tính, trong khi vi khuẩn *E. tarda* cho phản ứng dương tính với indole và H<sub>2</sub>S (Abbott and Janda, 2006).

Bảng 2.1: Một số đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn *E. ictaluri*

TT	Chỉ tiêu	Đặc điểm*	TT	Chỉ tiêu	Đặc điểm*
1	Gram	-	11	Nitrate	+
2	Hình dạng	Que	12	Phản ứng VP	-
3	Di động	+	13	Thủy phân gelatin	-
4	Oxidase	-	14	Sinh indole	-
5	Catalase	+	15	Sinh H <sub>2</sub> S	-
6	Phản ứng O/F	+/+	16	Glucose	+
7	Arginine	-	17	Xylose	-
8	Lysine	+	18	Arabinose	-
9	Ornithine	+	19	Sucrose	-
10	Citrate	-	20	Manitol	-

-: âm tính; +: dương tính; O/F (oxidation/fermentation): phản ứng oxid hóa và lên men đường glucose; VP: Voges-Proskauer (phản ứng sinh acetoin); \* được tổng hợp từ Hawke *et al.* (1981) và Waltman *et al.* (1986).

### b. Phổ loài cảm nhiễm của vi khuẩn *E. ictaluri*

Vi khuẩn *E. ictaluri* lần đầu tiên được phân lập bởi Hawke vào năm 1979 trên cá nheo Mỹ nhiễm bệnh ESC (Enteric Septicemia of Catfish: nhiễm trùng máu” (Hawke, 1979). Tuy nhiên, đến năm 1981 tác nhân gây bệnh này mới được định danh là vi khuẩn *E. ictaluri* (Hawke *et al.*, 1981). Bệnh ESC ảnh hưởng trên 60% các trại nuôi và hàng năm thiệt hại cho ngành công nghiệp nuôi cá da trơn ở Mỹ hàng chục triệu đô la Mỹ (Wagner *et al.*, 2002; Shoemaker *et al.*, 2009). Trên cá tra, bệnh GTM hay bệnh BNP (Bacillary Necrosis of *Pangasius*) do vi khuẩn *E. ictaluri* còn được gọi là bệnh mũ gan, bệnh trắng gan hay bệnh ung thư gan. Vi khuẩn *E. ictaluri* chủ yếu xuất hiện trên cá tra (thỉnh thoảng xuất hiện trên cá basa) và gây chết cá với tỷ lệ rất cao (Crumlish *et al.*, 2002; Nguyễn Quốc Thịnh và *ctv.*, 2004; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2015), đặc biệt bệnh gây hao hụt lớn ở giai đoạn cá giống (tỷ lệ chết có thể lên đến 90%) và trên cá tra nuôi thương phẩm (tỷ lệ chết có thể lên đến 50%) (Nguyễn Hữu Thịnh và Trương Thanh Loan, 2007). Theo Phan *et al.* (2009) thì bệnh xuất hiện trên tất cả các giai đoạn phát triển của cá, thường

bùng phát mạnh mẽ vào mùa lũ và cao điểm vào tháng 6 và 7 (Hình 2.2). Tuy nhiên, trong những năm gần đây thì bệnh này xuất hiện trên cá tra hầu như quanh năm. Trong 1 vụ nuôi, bệnh GTM có thể xuất hiện từ 3-5 lần (Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2015).

Cho đến nay, ngoài cá nheo và cá tra Việt thì vi khuẩn *E. ictaluri* được báo cáo là xâm nhiễm và gây bệnh trên nhiều loài cá da trơn khác như cá nheo nâu (*Silurus glanis*) ở Châu Âu và Mỹ (Hawke *et al.*, 1981; Plumb and Hilge, 1987; Iwanowicz *et al.*, 2006), cá nheo trắng (*Ameiurus catus*) ở Mỹ (Hawke *et al.*, 1981), cá trê trắng (*Clarius batrachus*) ở Thái Lan (Kasornchandra, 1987), cá *Noturus gyrinus* ở Mỹ (Klesius *et al.*, 2003), cá tra ở Indonesia và Thái Lan (Yuasa *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2015). Gần đây, vi khuẩn *E. ictaluri* được báo cáo là xuất hiện và gây bệnh đốm đỏ (red sores) trên cá Bò đen (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Ye *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010) và cá *Silurus soldatovi meridionalis* ở Trung Quốc (Geng and Wang, 2013), cá lai (hybrid catfish) của loài *Clarias macrocephalus* (Gunther) và *Clarias gariepinus* (Burchell) ở Thái Lan (Suanyuk *et al.*, 2014). Ngoài ra, các loài cá khác cũng được ghi nhận sự xâm nhiễm của vi khuẩn này như cá hồi vân (*Oncorhynchus myliss*) ở Thổ Nhĩ Kỳ (Keskin *et al.*, 2004), cá ayu (*Plecoglossus altivelis*) ở Nhật (Sakai *et al.*, 2008; Hassan *et al.*, 2012), cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) ở Basseterre, St. Kitts (Soto *et al.*, 2012) và cá ngựa vằn (*Danio rerio*) ở Mỹ (Petrie-Hansen, 2007; Hawke *et al.*, 2013).

### **c. Đường lây truyền và dấu hiệu bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri***

Nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* có thể xâm nhiễm vào vật chủ qua nhiều con đường khác nhau. Nghiên cứu của Morrison and Plumb (1994) cho thấy mũi là con đường để vi khuẩn *E. ictaluri* xâm nhiễm vào cá, trong khi các nghiên cứu khác cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* xâm nhiễm vào cá qua mang và đường tiêu hóa (Miyazaki and Plumb, 1985; Shotts *et al.*, 1986; Newton *et al.*, 1989; Baldwin and Newton, 1993; Klesius, 1994; Nusbaum and Morrison, 1996). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu gần đây của Dung *et al.* (2012) và Pirarat *et al.* (2016) cho thấy hệ tiêu hóa và mang có thể là đường xâm nhập của vi khuẩn *E. ictaluri* vào cơ thể cá tra.

Mô tả về đặc điểm của cá bệnh ESC do vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá nheo Mỹ đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Nhìn chung, cá bệnh ESC thường xuất hiện các vết loét đỏ và trắng nhỏ, các đốm xuất huyết (petechial haemorrhage) quanh miệng, các vây, mặt bụng hoặc mặt bên (ventral and lateral surface), mang nhạt và trương phình, mắt lồi và bụng trương (Areechon and Plumb 1983; Jacrboe *et al.*, 1984; Hawke *et al.*, 1998). Cá bệnh ESC trên cá nheo thường có 2 dạng: cấp tính (acute form) và mãn tính (chronic form) (Newton

*et al.*, 1989). Ở dạng cấp tính, cá thường chết nhanh (2 ngày sau khi nhiễm vi khuẩn), tỷ lệ cá chết cao với các dấu hiệu bệnh gồm viêm ruột (enteritis) và nhiễm trùng huyết (septicemia), trong khi viêm não và màng não (meningoencephalitis) với các vết thương ở đầu (được gọi là “hole in the head”) là đặc điểm bệnh ESC ở dạng mãn tính (Miyazaki and Plumb 1985; Shotts *et al.*, 1986; Newton *et al.*, 1989).

Ở Việt Nam, bệnh GTM được ghi nhận xuất hiện trên cá tra nuôi ở DBSCL vào cuối năm 1998 (Ferguson *et al.*, 2001; Crumlish *et al.*, 2002). Cá bệnh có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài là cá gầy và mắt hơi lồi. Trường hợp bệnh nặng cá bỏ ăn và bơi lờ đờ trên mặt nước (Dung *et al.*, 2012; Pirarat *et al.*, 2016). Tuy nhiên, các dấu hiệu bệnh bên ngoài của cá thường không rõ ràng (Dung *et al.*, 2008). Khi giải phẫu bên trong cá xuất hiện nhiều đốm trắng đục kích cỡ 1-3 mm trên gan, thận và tỳ tạng (Ferguson *et al.*, 2001). Ngoài ra, ở giai đoạn đầu mới nhiễm bệnh, những đốm trắng được ghi nhận là chỉ xuất hiện trên thận hoặc tỳ tạng của cá (Dung *et al.*, 2008).

#### **d. Khả năng gây bệnh và độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri***

Khả năng gây bệnh và độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* đã được nhiều tác giả trên thế giới nghiên cứu. Nhìn chung, hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy các chủng vi khuẩn khác nhau sẽ có khả năng gây bệnh và độc lực khác nhau. Nghiên cứu về độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh GTM trên cá tra của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2009) cho thấy độc lực của các chủng vi khuẩn thí nghiệm cao nhất là  $<10^2$  CFU/mL và thấp nhất là  $10^6$  CFU/mL. Gần đây, thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra của Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh (2010) cũng cho thấy chủng *E. ictaluri* Ei1 gây chết cá với tỷ lệ cao nhất (100%) ở mật số  $<10^2$  CFU/mL, trong khi đó chủng *E. ictaluri* Ei4 ở mật số  $6,4 \times 10^5$  CFU/mL gây chết với tỷ lệ thấp nhất (53%).

Bên cạnh đó, các nghiên cứu khác cho thấy thời gian và tỷ lệ cá chết đều khác nhau trên các loài cá khác nhau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Chẳng hạn, thí nghiệm của Plumb and Sanchez (1983) cho thấy cá nheo chết 100% trong 10 ngày sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* ở mật số vi khuẩn là  $1,5 \times 10^3$  CFU/mL. Baxa *et al.* (1990) gây cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* với các loài cá khác nhau bằng phương pháp ngâm ở nồng độ  $1 \times 10^8$  CFU/mL. Kết quả sau 14 ngày thí nghiệm cho thấy vi khuẩn đã gây chết cá nheo với tỷ lệ là 32%, cá hồi trắng là 75% và cá vược sọc là 5% nhưng vi khuẩn không gây chết ở cá tầm trắng. Tương tự, cá nheo khi ngâm với vi khuẩn *E. ictaluri* ở mật độ  $1 \times 10^7$  CFU/mL trong thời gian một giờ cho thấy

sau 5-20 ngày thí nghiệm, cá bị chết với tỷ lệ là 28% (Klesius and Sealey, 1995). Gần đây, Crumlish *et al.* (2010) tiến hành cảm nhiễm trên cá tra bằng phương pháp tiêm và ngâm với vi khuẩn *E. ictaluri* ở nồng độ vi khuẩn lần lượt là  $1 \times 10^6$  và  $1 \times 10^8$  CFU/mL. Kết quả cho thấy sau 12 ngày thí nghiệm tỷ lệ cá chết ở phương pháp tiêm là 95%, còn ở phương pháp ngâm là 80%.

#### **e. Các biến đổi về mô học của cá nhiễm bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri***

Cho đến nay, các biến đổi về cấu trúc mô học khi nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* đã được mô tả và báo cáo trên 1 số loài cá. Nhìn chung, các nghiên cứu đều cho thấy hiện tượng hoại tử các nội quan là biến đổi xuất hiện phổ biến khi cá nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* (Jarboe *et al.*, 1984; Miyazaki and Plumb, 1985; Crumlish *et al.*, 2010; Từ Thanh Dung, 2011). Trên cá nheo Mỹ, kết quả nghiên cứu của Areechon and Plumb (1983) cho thấy gan, thận, tỷ tạng và tế bào tuyến tụy bị hoại tử khi cá được tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*. Nghiên cứu của Sakai *et al.* (2008) cho thấy cấu trúc mô gan, thận và tỷ tạng của cá ayu (*Plecoglossus altivelis*) ở Nhật bị biến đổi khi nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu này còn cho thấy màng ngoài của tỷ tạng bị hoại tử và nhiều vùng tế bào gan của cá bị chết. Trên cá tra, các nghiên cứu về cấu trúc mô học khi bị bệnh GTM do vi khuẩn *E. ictaluri* cũng được thực hiện nhiều từ khi bệnh này xuất hiện trên cá tra ở nước ta (Ferguson *et al.*, 2001; Từ Thanh Dung, 2011; Pirarat *et al.*, 2016). Nghiên cứu của Nguyễn Quốc Thịnh và *ctv.* (2004) cho thấy nhiều thay đổi về cấu trúc, đặc biệt là gan, thận và tỷ tạng có hiện tượng sung huyết, XH và hoại tử xuất hiện ở các vùng chức năng của các cơ quan kể trên. Ngoài ra, ở cá bệnh có hiện tượng dính lại của các tia mang nhưng không tìm thấy các biến đổi ở cơ và tim của cá bệnh. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Ferguson *et al.* (2001) cho thấy ngoài hiện tượng hoại tử ở gan, thận và tỷ tạng thì vi khuẩn *E. ictaluri* còn gây hoại tử trên cơ của cá. Các đặc điểm về mô học cá tra nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* cũng được mô tả và báo cáo tương tự qua các nghiên cứu của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2009), Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh (2010). Nhìn chung, qua kết quả nghiên cứu của các tác giả này cho thấy khi bị nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* thì các cơ quan như gan, thận và tỷ tạng thường dễ bị thay đổi và các biểu hiện thường gặp là sung huyết, XH và hoại tử. Trong khi đó, các cơ quan như mang, da-cơ ít hay không bị biến đổi.

#### **2.2.2.2 Bệnh XH do vi khuẩn *A. hydrophila***

##### **a. Phân loại và đặc điểm sinh học của vi khuẩn *A. hydrophila***

Vi khuẩn *A. hydrophila* thuộc giống *Aeromonas*, họ *Aeromonadaceae*, bộ *Aeromonadales*, lớp *Gamma proteobacteria* và ngành *Proteobacteria* (Janda

and Abbott, 2010). Cho đến nay, có ít nhất 26 loài trong giống này đã được báo cáo (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013; <http://www.bacterio.net>). Các loài vi khuẩn trong giống *Aeromonas* được chia thành 2 nhóm: nhóm các loài *Aeromonas* ưa lạnh (psychrophilic) và nhóm các loài *Aeromonas* ưa nhiệt trung bình (mesophilic). Nhóm ưa lạnh phát triển tốt nhất ở 15-20°C hoặc ở nhiệt độ thấp hơn: 0-5°C (Aberoum and Jooyandeh, 2010), không có tiêm mao và không di động, phổ biến là loài *A. salmonicida* gây bệnh nhọt (furunculosis) và nhiễm trùng máu (septicaemia) trên nhiều loài cá, đặc biệt gây bệnh trên các loài cá hồi (Lee *et al.*, 2002; Nomura *et al.*, 2002; Lund and Mikkelsen, 2004; Kim *et al.*, 2011b; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). Trong khi đó, các loài *Aeromonas* ưa nhiệt trung bình (phổ biến là các loài *A. hydrophila*, *A. caviae* và *A. sorbia*) có thể phát triển tốt nhất ở 35-37°C hoặc có khả năng phát triển nhiệt độ cao hơn (40-45°C) nhưng nhìn chung các loài vi khuẩn thuộc nhóm này sẽ không phát triển ở nhiệt độ dưới 10°C (Aberoum and Jooyandeh, 2010) và là các vi khuẩn có khả năng di động (Korbsrisate *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2007; Parker and Shaw, 2011).

*A. hydrophila* thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, có hình que ngắn với kích thước dao động từ 0,8-1,0 x 1,0-3,5 µm (Austin and Austin, 2007). Vi khuẩn *A. hydrophila* thường phát triển rất nhanh trên các môi trường dinh dưỡng. Chúng phát triển tốt ở nhiệt độ 28-30°C. Sau 18-24 giờ cấy trên các môi trường TSA, BHIA hoặc môi trường GSP (Glutamate Starch Phenol Red Agar), khuẩn lạc vi khuẩn có dạng tròn, to (đường kính 2-3 mm), màu vàng kem (Austin and Austin, 2007; Phạm Thanh Hương, 2010). Vi khuẩn *A. hydrophila* có khả năng di động, yếm khí tùy tiện, phản ứng dương tính với oxidase, catalase, Voges-Proskauer, lysine, arginine và ornithine (Janda and Abbott, 2010) (Bảng 2.2). Chúng có khả năng lên men các môi trường đường và sinh khí từ glucose nhưng không có khả năng tạo khí H<sub>2</sub>S (Austin and Austin, 2007; Janda and Abbott, 2010).

#### **b. Phổ loài cảm nhiễm của vi khuẩn *A. hydrophila***

Vi khuẩn *A. hydrophila* được xem là tác nhân gây bệnh cho nhiều động vật dưới nước và trên cạn (Janda and Abbott, 2010). Nhiều báo cáo cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh này trên cá, lưỡng cư và bò sát (Vivas *et al.*, 2004), đặc biệt là chúng còn gây bệnh cho con người (Janda and Abbott, 2010). Ngoài ra, vi khuẩn *A. hydrophila* còn được tìm thấy trên nhiều loại thực phẩm mà chúng sản sinh nhiều độc tố (toxin) gây độc như các exotoxin (haemolysin và enterotoxin), cytotoxin và các độc tố khác (Yucel *et al.*, 2005; Daskalov, 2006). Cho đến nay, ngoài cá nheo Mỹ thì vi khuẩn *A. hydrophila* còn được phân lập trên 1 số loài cá da trơn khác như cá trê trắng (*Clarias*

*batrachus*) (Ashiru *et al.*, 2011) và cá trê phi (*Clarias gariepinus*) ở Malaysia (Laith and Najiah, 2013), cá *Heteropneustes fossilis* ở Bangladesh (Sarkar and Rashid, 2012). Ngoài ra, vi khuẩn *A. hydrophila* còn được tìm thấy trên các loài cá khác như cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) ở Ai Cập (Noor El Deen *et al.*, 2014), cá rầm *Puntius* sp. ở Ấn Độ (Mohanty *et al.*, 2008), cá Koi *Carrassius auratus* và cá chép (*Cyprinus carpio*) ở Ấn Độ (Citarasu *et al.*, 2011), cá bon (*Paralichthys lethostigma*) ở Mỹ (Pridgeon *et al.*, 2014), cá Pacu *Piaractus mesopotamicus* ở Brazil (Carraschi *et al.*, 2012), các loài cá chép như cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idellus*) ở Trung Quốc (Zheng *et al.*, 2012), cá trôi (*Labeo rohita*), cá catla (*Catla catla*) và cá trôi trắng (*Cirrhinus cirrhosus*) (Sarkar and Rashid, 2012) và cá rô đồng (*Anabas testudineus*) (Sarkar and Rashid, 2012) ở Bangladesh. Ở Việt Nam, vi khuẩn *A. hydrophila* cho đến nay không chỉ gây bệnh trên cá tra mà các nhà khoa học còn phân lập được vi khuẩn trên cá basa, cá bông tượng, cá trê lai và ếch (Đặng Thị Hoàng Oanh, 2006), cá rô đồng (*Anabas testudineus*) (Đặng Thụy Mai Thy và *ctv.*, 2012), lươn đồng (*Monopterus albus*) (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Đức Hiền, 2012), cá thát lát còm (*Chitala Chitala* Hamilton, 1822) (Trần Thị Mỹ Hân, 2013) và gần đây nhất là trên cá lóc (Duc *et al.*, 2013).

Bảng 2.2: Một số đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn *A. hydrophila*

TT	Chỉ tiêu	Đặc điểm*	TT	Chỉ tiêu	Đặc điểm*
1	Gram	-	13	Sinh H <sub>2</sub> S	+
2	Hình dạng	Que ngắn	14	Urease	-
3	Di động	+	15	Indole	+
4	Phát triển ở 37°C	+	16	Phản ứng VP	+
5	Oxidase	+	17	Thủy phân gelatin	+
6	Catalase	+	18	Thủy phân aesculin	+
7	Phản ứng O/F	+/+	19	Glucose	+
8	β-galactosidase	+	20	Mannitol	+
9	Arginine dihydrolase	+	21	Inositol	-
10	Lysine decarboxylase	v	22	Sorbitol	v
11	Ornithine decarboxylase	-	23	Sucrose	+
12	Simmon's citrate	v	24	Arabinose	+

-: âm tính; +: dương tính và v (variable reaction): phản ứng thay đổi; VP: Voges-Proskauer (phản ứng sinh acetoin); \* được tổng hợp bởi English *et al.* (1993).

### c. Đường lây truyền và dấu hiệu bệnh do vi khuẩn *A. hydrophila*

Cho đến nay chưa có bất kỳ công trình nghiên cứu nào cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* xâm nhiễm vào vật chủ qua con đường nào là chủ yếu mặc dù đây là loài vi khuẩn gây bệnh trên nhiều loài cá và đã được nghiên cứu nhiều. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu khác cho thấy các vi khuẩn thuộc giống

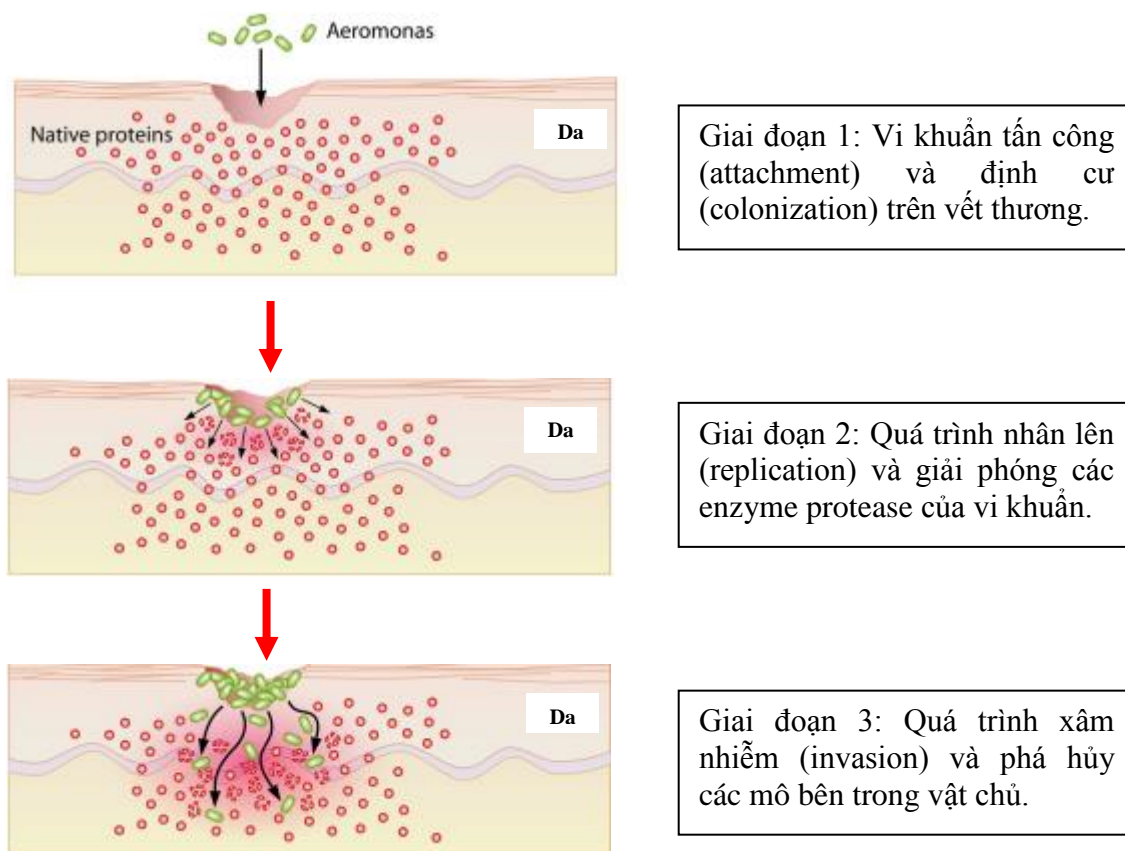
*Aeromonas* như vi khuẩn *A. salmonicida* có thể xâm nhiễm vào vật chủ qua mang, da và các vết thương (Hình 2.3) hoặc qua đường tiêu hóa (Hodgkinson *et al.*, 1987, Svendsen *et al.*, 1999; Janda and Abbott, 2010). Bệnh nhiễm trùng huyết do nhóm *Aeromonas* di động (motile aeromonad septicemia, MAS) (Harikrishnan *et al.*, 2003) hay còn được biết đến với tên gọi khác bệnh nhiễm trùng XH (haemorrhagic septicemia) do nhóm vi khuẩn *A. hydrophila*, *A. caviae* và *A. sorbia* đã được báo cáo ở nhiều nước trên thế giới (Camus *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2016). Ngoài ra, vi khuẩn *A. hydrophila* cũng đã phân lập được từ các loài cá bị hội chứng hội chứng lở loét (epizootic ulcerative syndrome, EUS) (Pathiratne *et al.*, 1994; Lio-Po *et al.*, 1998; Harikrishnan *et al.*, 2003; Mastan and Qureshi, 2001). Cá bệnh MAS thường có các triệu chứng như sưng phồng của các mô (tissue swelling), phù (dropsy), xuất hiện các đốm đỏ/XH (red sores), hoại tử (necrosis), lở loét (ulceration) và nhiễm trùng XH (haemorrhagic septicaemia) (Karunasagar *et al.*, 1989; Aguilar *et al.*, 1997; Azad *et al.*, 2001).

Trên cá nheo Mỹ, bệnh MAS do vi khuẩn *A. hydrophila* được báo cáo là bùng phát mạnh vào năm 2009 ở Tây Alabama (Pridgeon and Klesius, 2011; Pridgeon *et al.*, 2013). Hiện tại, bệnh này đã lây lan sang các vùng nuôi cá nheo khác như Đông Mississippi và Arkansas (Hanson *et al.*, 2014) và gây thiệt hại cho ngành nuôi cá nheo Mỹ trên 1,3 triệu tấn cá thương phẩm, tương đương khoảng 3 tỉ đô la (Pridgeon and Klesius, 2011; Pridgeon *et al.*, 2013). Các dấu hiệu bên ngoài của các bệnh MAS gồm các vây đỏ (reddened fins), viêm ở hậu môn, XH khắp trên da, mắt lồi (exophthalmia) và phình bụng (abdominal swelling). Một dấu hiệu khác cũng thường xuất hiện ở cá da trơn bệnh MAS là XH ở mắt (iridial haemorrhage). Các dấu hiệu bên trong gồm xoang bụng chứa dịch màu đỏ (bloody ascite), xuất huyết trên ruột, tỳ tạng và thận sưng, nhũn (swollen friable kidney and spleen) (Zhang *et al.*, 2016).

Trên cá tra, vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh XH còn được gọi là bệnh đốm đỏ, bệnh đỏ mỏ đỏ kỳ hoặc bệnh nhiễm trùng máu (Tù Thanh Dung và *ctv.*, 2015). Đây là 1 trong những bệnh xuất hiện tần số cao nhất trên cá tra ở ĐBSCL (Hình 2.2). Bệnh xuất hiện hầu như quanh năm, đặc biệt là khi cá bị sốc và môi trường ao nuôi không đảm bảo (Tù Thanh Dung và *ctv.*, 2015). Bệnh XH trên cá tra thường có các biểu hiện đặc trưng như xuất hiện các đốm XH (petechial haemorrhage) ở da, tập trung nhiều ở gốc vây, xung quanh miệng, hầu và hậu môn. Bên cạnh đó, cá bệnh XH có bụng phình to, bên trong chứa dịch màu vàng hoặc màu hồng. Các nội tạng như bóng hơi, ruột và tuyến sinh dục cũng có hiện tượng XH. Ngoài ra, cá bệnh XH còn ghi nhận được các



dấu hiệu khác như gan tái nhạt, thận và tỳ tạng sưng to, mềm nhũn và có màu đỏ sậm (Ly *et al.*, 2009; Crumlish *et al.*, 2010; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2015).



Hình 2.3: Sơ đồ minh họa quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn *Aeromonas* vào vật chủ qua vết thương (Janda and Abbott, 2010).

#### d. Khả năng gây bệnh và độc lực của vi khuẩn *A. hydrophila*

Cho đến nay, nhiều nghiên cứu về khả năng gây bệnh và độc lực của vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá đã được công bố (Azad *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2000; Nusbaum and Morrison, 2002; Crumlish *et al.*, 2010). Thí nghiệm cảm nhiễm trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) của Figueirredo and Plumb (1977) cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá bệnh sẽ có độc lực (giá trị LD<sub>50</sub> là 6,4x10<sup>4</sup> CFU/mL) cao hơn những chủng *A. hydrophila* phân lập từ môi trường bên ngoài (LD<sub>50</sub> là 1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL). Tương tự, thí nghiệm trên cá chình (*Anguilla anguilla*) cũng thu được giá trị LD<sub>50</sub> khá cao (10<sup>5.4</sup>-10<sup>7.2</sup> CFU/mL) (Esteve *et al.*, 1993). Ngoài ra, Sirirat *et al.* (1999) cũng đã xác định được độc lực của các chủng *A. hydrophila* khi cảm nhiễm trên cá trê giống với giá trị LD<sub>50</sub> cao nhất là khoảng 10<sup>5</sup> CFU/mL sau 18 giờ cảm nhiễm. Qua các nghiên cứu này cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập khác nhau sẽ có độc lực khác nhau và độc lực của chúng cũng khác nhau trên các loài cá khác nhau được gây cảm nhiễm.

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác còn cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* khi kết hợp với các vi khuẩn khác sẽ làm tăng độc lực gây bệnh trên cá được cảm nhiễm. Chẳng hạn, nghiên cứu của Nusbaum and Morrison (2002) cho thấy cá nheo sẽ bộc phát bệnh mạnh và các dấu hiệu lâm sàng của bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* sẽ trở nên rõ ràng hơn khi có sự xuất hiện và hiện diện của vi khuẩn *A. hydrophila*. Nghiên cứu của Đặng Thụy Mai Thy và ctv. (2012) cũng cho thấy khi tiêm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. trên cá rô đồng thì tỷ lệ chết của cá sẽ tăng lên đáng kể (90%) so với nghiệm thức tiêm riêng biệt từng chủng vi khuẩn (25% và 45%). Thí nghiệm gây cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* bằng phương pháp ngâm và tiêm của Crumlish *et al.* (2010) trên cá tra cũng cho kết quả tương tự. Trong cả 2 phương pháp được thực hiện thì tỷ lệ cá chết ở NT chỉ ngâm/tiêm *A. hydrophila* hoặc *E. ictaluri* luôn thấp hơn đáng kể so với NT tiêm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*, cụ thể tỷ lệ cá chết tích lũy ở NT chỉ ngâm vi khuẩn *A. hydrophila* (10%) hoặc *E. ictaluri* (80%) thấp hơn NT ngâm kép là 95%.

#### **e. Các biến đổi về mô học của cá nhiễm bệnh do vi khuẩn *A. hydrophila***

Cho đến nay, các kết quả nghiên cứu biến đổi về mô học của cá tra bệnh XH do vi khuẩn *A. hydrophila* vẫn còn hạn chế. Tuy nhiên, các biến đổi về mô học trên các loài cá khác thì được nhiều tác giả trong nước và trên thế giới công bố. Nghiên cứu mô bệnh học cá trê phi (*C. gariepinus*, Burchell) nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* của Laith and Najiah (2013) cho thấy da bị hoại tử, sự tăng sinh (hyperplasia) và dính lại của các sợi mang thứ cấp, đồng thời có sự thoái hóa các không bào ở gan. Báo cáo của Noor El Deen *et al.* (2014) cho thấy hầu hết các nội quan cá rô phi vằn (*O. niloticus*) như gan, thận và tỳ tạng bị hoại tử, phản ứng viêm (inflammatory reaction) cùng với hiện tượng hemosiderosis khi nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila*. Nghiên cứu mô bệnh học ở cá thát lát còm (*Chitala chitala*) nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* của Đặng Thụy Mai Thy và ctv. (2014) cho thấy mang, gan, thận, tỳ tạng và cơ cho thấy nhiều cụm vi khuẩn được tìm thấy trong mô mang, gan, thận và tỳ tạng và các cơ quan này có biểu hiện sung huyết, XH và hoại tử ở nhiều vùng mô. Hiện tượng mất cấu trúc và hoại tử ở các ống thận cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Ngoài ra, mô da cơ bị XH và cấu trúc giữa các sợi cơ rời rạc. Mô mang có hiện tượng trương phồng dính lại của các sợi mang thứ cấp, vi khuẩn trong sợi mang sơ cấp và có hiện tượng sung huyết. Nghiên cứu khác trên cá rô đầu vuông (*Anabas testudineus*) của Đặng Thụy Mai Thy và ctv. (2012) cho thấy mô gan, thận và tỳ tạng cá bệnh ở các NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* có

các hiện tượng như sung huyết, XH và hoại tử với các mức độ biến đổi khác nhau phụ thuộc thời gian gây cảm nhiễm. Tuy nhiên, cấu trúc của gan biến đổi chậm hơn thận và tỳ tạng. Gần đây, kết quả phân tích mô bệnh học cá lóc (*Channa striata*) bệnh XH trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh (2016) cho thấy nhiều vùng mô của các cơ quan gan, thận và tỳ tạng bị thay đổi cấu trúc, có hiện tượng XH và sung huyết. Bên cạnh đó, mô cơ bị hoại tử nhẹ và mô mang có hiện tượng sợi mang thứ cấp dính lại với nhau.

### 2.2.2.3 Bệnh trắng đuôi do vi khuẩn *F. columnare*

Vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trắng đuôi thỉnh thoảng cũng xuất hiện trên cá tra nuôi (Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2012, Trần Nguyễn Diễm Tú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012) nhưng với tần số thấp hơn 2 loài vi khuẩn trên. Tuy nhiên, khi bệnh này xuất hiện cũng gây hao hụt rất cao trong ao ương nuôi cá tra thâm canh ở ĐBSCL. Cá tra bệnh trắng đuôi có biểu hiện đặc trưng như cá mất nhớt, có vệt trắng trên thân, đuôi bị ăn mòn, mang xám nhạt (Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2012). Bệnh xảy ra chủ yếu trên cá tra ở giai đoạn nhỏ và tỷ lệ chết rất cao trong vài ngày nhiễm bệnh, đặc biệt sau khi vận chuyển cá về thả nuôi. Bệnh diễn ra thường xuyên trong năm nhưng mạnh nhất vào thời điểm nhiệt độ tăng cao.

### 2.2.3 Bệnh do vi nấm

Vi nấm cũng là 1 trong những tác nhân thường hay xuất hiện và gây bệnh trên ĐVTS (Yanong, 2003; Khoa and Hatai, 2005). Cá tra nuôi nhiễm vi nấm khó nhận biết bằng mắt thường và thường xảy ra sau thời gian nuôi 3-5 tháng (Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2015). Nghiên cứu của Phạm Minh Đức và *ctv.* (2013) cho thấy nấm *Fusarium* sp. gây bệnh trên cá tra nuôi thương phẩm có dấu hiệu bệnh lý là cá thường bơi lơ dờ, bỏ ăn, bụng trương to, bên trong nội quan thấy bóng hơi trương to, mềm, có màu vàng sẫm và có dịch vàng. Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy vi nấm gây bệnh trên cá tra cũng rất đa dạng về thành phần giống loài. Nghiên cứu của Duc *et al.* (2016) đã phân lập được 2 nhóm vi nấm bậc thấp thuộc nhóm nấm thủy mi là *Achlya* spp. và *Saprolegnia* spp. trên cá tra ở giai đoạn trứng và cá bột. Ngoài ra, nhóm nấm bậc cao *Fusarium* spp. xuất hiện trên cá tra bệnh trương bong bóng hơi (swollen swim bladder) cũng được báo cáo bởi Duc *et al.* (2015). Nghiên cứu mới nhất của Đặng Thụy Mai Thy và *ctv.* (2016) cho thấy 5 giống nấm gồm *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp. và *Mucor* sp. đã được xác định nhiễm trên cá tra giống.

#### 2.2.4 Các bệnh không truyền nhiễm

Ngoài KST, vi khuẩn và vi nấm thì 1 số bệnh không truyền nhiễm (non-infectious diseases) cũng xuất hiện với tần số tương đối thấp trên cá tra nuôi ở ĐBSCL như hội chứng vàng da (yellow fillet syndrome) và bệnh trắng gan trắng mang (pale gill and liver syndrome) (Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011; Luu Thi Thanh Truc, 2013; Phu *et al.*, 2015). Tuy nhiên, cho đến nay các nhà khoa học vẫn chưa xác định chính xác tác nhân gây hội chứng vàng da (Luu Thi Thanh Truc, 2013) cũng như bệnh trắng gan trắng mang. Theo Dung *et al.* (2008) thì những hội chứng này có thể liên quan đến chế độ dinh dưỡng hoặc ảnh hưởng của các yếu tố môi trường như chất lượng nước và hàm lượng oxy hòa tan trong nước.

#### 2.3 Các nghiên cứu độc lực vi khuẩn nhiễm kép

Cho đến nay, trên thế giới có nhiều nghiên cứu và báo cáo về hiện tượng nhiễm kép của vi khuẩn trên ĐVTS (Crumlish *et al.*, 2010; Karlsen *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2015). Nhìn chung, các nghiên cứu đều cho thấy hiện tượng nhiễm kép có thể có môi tương tác hiệp lực (synergistic) hoặc đối kháng (antagonistic) khi các vi khuẩn gây bệnh cùng xuất hiện trên vật chủ (Kotob *et al.*, 2016). Nghiên cứu của Nusbaum and Morrison (2002) cho thấy cho thấy cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) khi bị nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* chưa biểu hiện bệnh nhưng bệnh sẽ bộc phát mạnh khi cá nhiễm thêm vi khuẩn *E. ictaluri*. Nghiên cứu của Đặng Thụy Mai Thy và *ctv.* (2012) cho thấy cá rô khi được tiêm kép 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* (chủng A11-02) và *Streptococcus* sp. (chủng S11-01) đã làm cá chết với tỷ lệ là 90%, cao hơn so với cá chỉ được tiêm *A. hydrophila* hoặc *Streptococcus* sp. với tỷ lệ chết lần lượt là 25% và 45%. Ngoài ra, qua kết quả nghiên cứu cũng cho thấy thời gian cá chết ở NT tiêm kép xuất hiện sớm hơn so với phương pháp tiêm đơn. Tương tự, kết quả cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* bằng phương pháp tiêm và ngâm trên cá tra của Crumlish *et al.* (2010) cho thấy trong cả 2 phương pháp được thực hiện thì tỷ lệ cá chết ở NT chỉ tiêm/ngâm vi khuẩn *A. hydrophila* hoặc *E. ictaluri* luôn thấp hơn đáng kể so với NT tiêm/ngâm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. Nghiên cứu của Loch *et al.* (2012) cho thấy vi khuẩn *Aeromonas* spp. di động (được xem như là tác nhân gây bệnh cơ hội) hiện diện với số lượng lớn trên cá hồi chinook/cá hồi vua (*Oncorhynchus tshawytscha*) nhưng chúng tương tác hiệp lực với vi khuẩn *Renibacterium salmoninarum* gây bệnh BKD (Bacterial Kidney Disease) đã làm tăng tỷ lệ chết cá. Gần đây, nghiên cứu của Dong *et al.* (2015) cho thấy tỷ lệ cá chết tích lũy ở NT ngâm hay tiêm kép 2 loài vi

khuẩn *F. columnare* và *E. ictaluri* trên cá tra ở Thái Land cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với NT ngâm/tiêm đơn *F. columnare* hay *E. ictaluri*. Tuy nhiên, nghiên cứu của Karlsen *et al.* (2014) cho thấy việc nhiễm kép vi khuẩn *Moritella viscosa* và *Aliivibrio wodanis* phân lập từ cá hồi Đại Tây dương (*Salmo salar*) bị hội chứng lở loét mùa đông (Winter Ulcer Syndrome) (Lunder *et al.*, 1995) có tác dụng đối kháng (antagonistic) không làm tăng tỷ lệ chết cá nếu so sánh với việc cá chỉ nhiễm *M. viscosa*. Vi khuẩn *A. wodanis* cạnh tranh dinh dưỡng, nơi ở cũng như tiết chất ức chế bacteriocin để ức chế quá trình sinh trưởng của vi khuẩn *M. viscosa* làm giảm độc lực *M. viscosa* (Karlsen *et al.*, 2014; Hjerde *et al.*, 2015).

## **2.4 Các biện pháp kiểm soát bệnh do vi khuẩn trên cá tra nuôi ở ĐBSCL**

Cho đến nay, việc kiểm soát các loại bệnh do vi khuẩn gây ra trên cá tra chủ yếu vẫn dựa vào kháng sinh (Nguyễn Chính, 2005; Nguyễn Quốc Thịnh và *ctv.*, 2014). Kết quả điều tra gần đây nhất của Phu *et al.* (2015) cho thấy có 24 loại kháng sinh khác nhau được sử dụng trong ao nuôi cá tra, trong đó các kháng sinh như enrofloxacin, florfenicol, doxycycline, amoxicillin và cefalexin đang được người nuôi sử dụng nhiều. Ngoài ra, qua kết quả điều tra trên cũng cho thấy hầu hết các kháng sinh thường được sử dụng kết hợp với nhau để xử lý, trong đó 2 kháng sinh sulfamethoxazole và trimethoprim được sử dụng nhiều nhất. Tuy nhiên, hiệu quả điều trị của các kháng sinh không cao do vi khuẩn đã kháng hầu hết với các loại kháng sinh này. Hiện tại, vaccine ALPHAJECT *Panga 1* phòng bệnh GTM cho cá tra do công ty PHARMAQ sản xuất đã được Cục Thú Y-Bộ Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn Việt Nam (BNN-PTNT) cấp phép lưu hành vào ngày 10/04/2013 ([www.vietfish.org](http://www.vietfish.org)). Kết quả thử nghiệm vaccine phòng bệnh *E. ictaluri* cho cá tra của Từ Thanh Dung (2011) cho thấy việc tiêm vaccine trên là an toàn và không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của cá tra trong ao nuôi thương phẩm. Ngoài ra, vaccine còn kích thích hình thành miễn dịch đặc hiệu chống lại vi khuẩn *E. ictaluri* và bảo hộ được cá khi bệnh xảy ra trong thời gian thí nghiệm ([www.vietfish.org](http://www.vietfish.org)). Tuy nhiên, vaccine vẫn chưa được sử dụng phổ biến do giá tương đối cao, mất nhiều công lao động do phải tiêm cho cá và người nuôi vẫn còn hoài nghi về hiệu quả của nó (Phu *et al.*, 2015). Trong khi đó, việc nghiên cứu và sản xuất vaccine phòng bệnh XH trên cá tra ở nước ta cho đến nay vẫn còn hạn chế và chưa có nhiều thông tin. Hiện nay, do việc ứng dụng các vaccine đơn giá cũng như đa giá phòng bệnh GTM và XH chưa được phổ biến, trong khi việc sử dụng kháng sinh đang phải đối mặt với nhiều khó khăn thì các nghiên cứu và ứng dụng chất kích thích

miễn dịch (immunostimulant) trên ĐVTS ngày càng được quan tâm (Nya and Austin, 2009; Mohomad et al., 2010; Nya and Austin, 2010; Mastan, 2015; Baba *et al.*, 2016). Nghiên cứu gần đây của Bùi Thị Bích Hằng và *ctv.* (2015) cho thấy việc bổ sung vitamin C ở mức 500-1000mg/kg thức ăn đã kích thích gia tăng 1 số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu và tăng khả năng kháng vi khuẩn của cá tra đối với vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. Do đó, tỷ lệ cá chết giảm ở các NT có bổ sung vitamin C vào thức ăn so với NT đối chứng không có bổ sung vitamin C. Ngoài ra, việc phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có tiềm năng sản xuất chế phẩm sinh học phòng bệnh trên cá tra và các ĐVTS khác cũng được thực hiện bởi nhiều tác giả trong và ngoài nước (Ran *et al.*, 2012; Nguyễn Thành Tâm và *ctv.*, 2014; Trần Thị Ngọc Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016; Ngô Thị Ngọc Trân và *ctv.*, 2016). Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai (2012) cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus* sp. phân lập từ ruột cá tra và cá rô phi có tác dụng ức chế vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra. Nhìn chung, hầu hết các nghiên cứu về lĩnh vực này vẫn chỉ dừng ở giai đoạn phân lập, tuyển chọn vi khuẩn hoặc thử nghiệm ở phòng thí nghiệm mà chưa được ứng dụng thực tế ngoài ao nuôi 1 cách rộng rãi.

## **2.5 Kháng sinh và cơ chế tác động của kháng sinh**

### **2.5.1 Kháng sinh và sự kháng thuốc của vi khuẩn**

Theo Prescott *et al.* (2000) thì kháng sinh (antibiotic) là 1 hợp chất được sản xuất bởi sinh vật mà ở nồng độ thấp có thể ức chế hoặc giết chết sinh vật khác. Thuật ngữ kháng sinh đôi khi được sử dụng với tên gọi khác là chất kháng khuẩn (antimicrobial agents). Kháng sinh có thể là các chất tự nhiên, bán tổng hợp hoặc là các chất hoàn toàn tổng hợp nhưng chúng gây ít hoặc không làm tổn thương tế bào chủ (Prescott *et al.*, 2000; Walsh, 2003). Các kháng sinh có tác dụng làm ngừng sự sinh trưởng của vi khuẩn hoặc nấm được gọi là chất kiềm khuẩn (bacteriostatic agents) hoặc giết chết chúng, gọi là chất diệt khuẩn (bactericidal agents) (Walsh, 2003).

Cho đến nay, nhiều loại kháng sinh mới được sản xuất và ra đời nhằm đáp ứng các nhu cầu khác nhau của con người. Trong lĩnh vực NTTS và thú y, 1 số lượng lớn thuốc kháng sinh được sử dụng thường xuyên như trị bệnh, phòng bệnh và thậm chí kháng sinh được dùng như là chất kích thích tăng trưởng (growth promotion) (Teuber, 2001; Marshall and Levy, 2011). Nhìn chung, hầu hết các nước phát triển như Mỹ, Canada, Thụy Sĩ và các quốc gia là thành viên của châu Âu hiện nay đang có khuynh hướng giảm sử dụng hay sử dụng rất ít kháng sinh trong NTTS (Burka *et al.*, 1997; Lillehaug *et al.*, 2003). Trong khi đó, khoảng 90% việc sản xuất thủy sản ở các quốc gia đang

phát triển sử dụng kháng sinh phổ biến vào trong việc phòng và kiểm soát mầm bệnh (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). Theo Defoirdt *et al.* (2011) có khoảng 500-600 tấn kháng sinh được sử dụng ở các trại nuôi tôm ở Thái Lan vào năm 1994. Ngoài ra, tác giả còn nhấn mạnh có sự khác biệt rất lớn về lượng kháng sinh được sử dụng ở các quốc gia khác nhau trên thế giới (Bảng 2.3).

Song song với việc sử dụng 1 lượng lớn kháng sinh để kiểm soát mầm bệnh thì việc xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng thuốc đang ngày 1 gia tăng (Wegener, 2003; Serrano, 2005; Marshall and Levy, 2011). Cho đến nay, nhiều loại vi khuẩn kháng với các loại thuốc kháng sinh khác nhau đã được báo cáo (White *et al.*, 2000; Cloeckert *et al.*, 2000, 2001; Schmidt *et al.*, 2001a; Miranda and Zemelman, 2002; Miranda *et al.*, 2003). Nhìn chung, sự kháng thuốc của vi khuẩn trong thời gian qua diễn ra rất nhanh. Nguyên nhân của hiện tượng này là do áp lực chọn lọc của kháng sinh từ môi trường sống của vi khuẩn. Theo Burridge *et al.* (2010) và Cabello *et al.* (2013) thì có khoảng 75-80% kháng sinh được phóng thích vào trong môi trường qua thức ăn. Do đó, vi khuẩn phải gia tăng sự kháng thuốc để tồn tại và thích nghi với môi trường chứa hàm lượng cao của kháng sinh. Ngoài ra, sự trao đổi của các gen kháng thuốc giữa các vi khuẩn với nhau trong các môi trường cũng là nguyên nhân làm cho sự kháng thuốc của vi khuẩn trở nên nhanh chóng (Wegener, 2003; Cabello, 2006; Heuer *et al.*, 2009; Marshall and Levy, 2011).  
Bảng 2.3: Ước tính lượng kháng sinh sử dụng trong NTTS ở các quốc gia trên thế giới

Quốc gia	Ước tính lượng kháng sinh sử dụng (g/tấn sản xuất)	Tác giả
Thụy Sĩ	1	Lunestad <i>et al.</i> (2005)
Thụy Điển	2	Turnidge and Paterson (2007)
Hy Lạp	100	Rigos <i>et al.</i> (2004)
Canada	156	Fraser <i>et al.</i> (2004)
Chile	200	Bravo <i>et al.</i> (2005)
Việt Nam	700	Van (2005)

Các số liệu trong Bảng 2.3 được tổng hợp bởi Smith (2008).

### 2.5.2 Cơ chế tác động của kháng sinh

Nhìn chung, các loại thuốc kháng sinh khác nhau sẽ có cơ chế tác động khác nhau lên tế bào vi khuẩn (Prescott *et al.*, 2000; Walsh, 2003). Tuy nhiên, theo Tenover (2006); Levy and Marshall (2004) thì kháng sinh tác động lên tế bào vi khuẩn theo 1 số cơ chế (Hình 2.4) chủ yếu sau: (1) can thiệp vào quá trình tổng hợp vách tế bào (nhóm  $\beta$ -lactam: penicillin, ampicillin, amoxicillin, cephalosporin, monobactams; nhóm glycopeptide: vancomycin, teicoplanin), (2) ức chế sinh tổng hợp protein (nhóm macrolide, chloramphenicol,

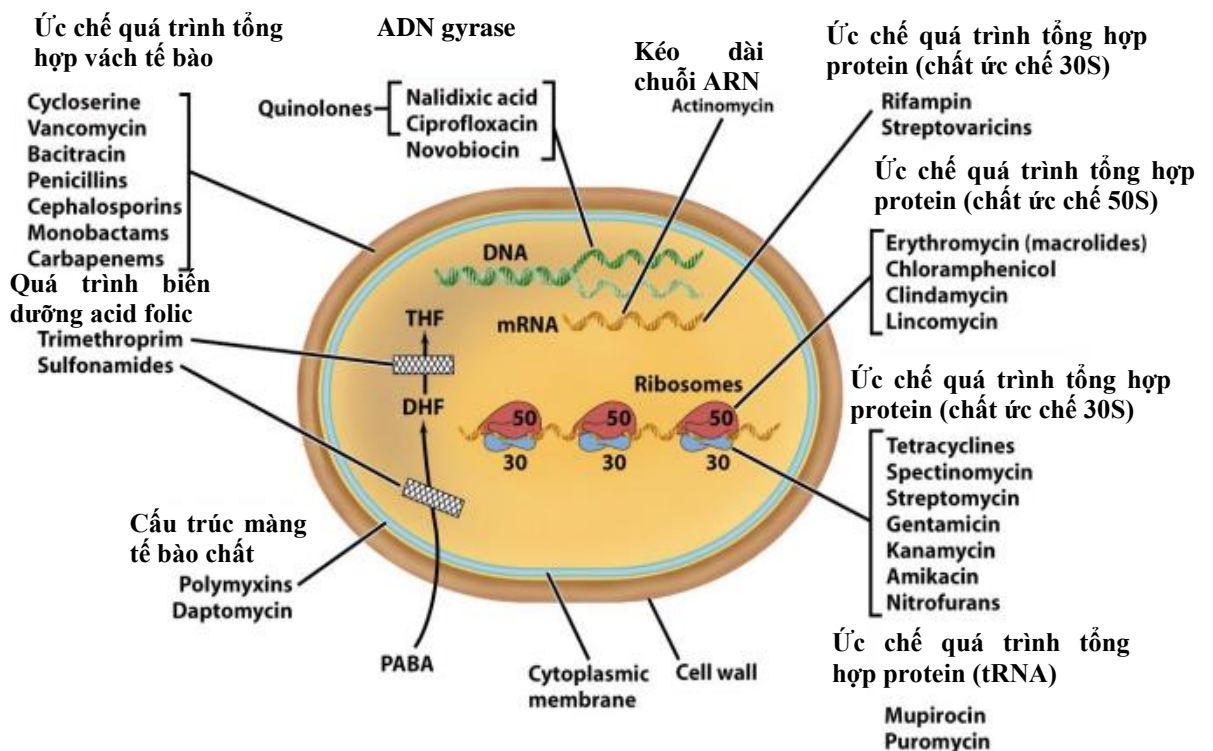
clindamycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid), (3) can thiệp vào quá trình tổng hợp acid nucleic (nhóm flouroquinolone và rifampin) và (4) ức chế quá trình biến dưỡng acid folic (nhóm sulfonamide, trimethoprim và nhóm đồng phân của acid folic). Ngoài ra, (5) kháng sinh có thể phá hủy cấu trúc màng tế bào vi khuẩn Gram âm (các kháng sinh polymyxin và daptomycin).

### 2.5.3 Cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn

Vi khuẩn kháng thuốc thường được thực hiện qua 2 cơ chế: đề kháng tự nhiên (intrinsic/innate resistance) hoặc đề kháng thu nhận (acquired resistance).

#### 2.5.3.1 Đề kháng tự nhiên

Đề kháng tự nhiên là do bản chất bẩm sinh hay có sẵn của vi khuẩn, tức là tình trạng 1 giống hoặc 1 loài vi khuẩn kháng với 1 loại kháng sinh nào đó mà không có bất kỳ biến đổi về cấu trúc di truyền của chúng (Hình 2.5). Điều này có thể do vi khuẩn thiếu vị trí đích cho tác động của kháng sinh. Chẳng hạn, vi khuẩn *Pseudomonas* spp. và *Mycoplasma* đề kháng tự nhiên với các kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam (Hancock, 1998; Livermore, 2002; Hatha *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2010), vi khuẩn thuộc giống *Edwardsiella* (gồm *E. ictaluri* và *E. tarda*) kháng tự nhiên với colistin (Muyembe *et al.*, 1973; Waltman *et al.*, 1986). Ngoài ra, sự đề kháng tự nhiên của vi khuẩn có thể do thành tế bào của chúng không cho kháng sinh thấm qua. Vi khuẩn Gram âm đề kháng tự nhiên với kháng sinh nhóm glycopeptide vì phân tử thuốc quá lớn nên không thể xuyên qua màng tế bào vi khuẩn.

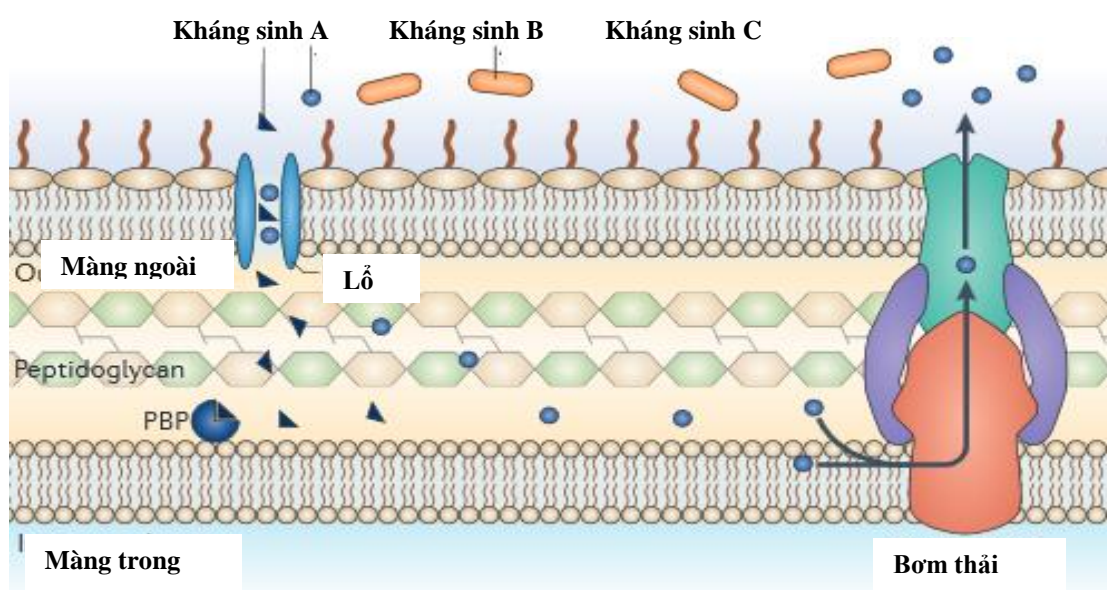


Hình 2.4: Các nhóm kháng sinh và cơ chế tác động của chúng lên tế bào vi khuẩn (Bbosa *et al.*, 2014).



### 2.5.3.2 Đề kháng thu nhận

Đề kháng thu nhận hay kháng đáp ứng là trường hợp vi khuẩn trước đây nhạy cảm với kháng sinh nhưng sau 1 thời gian tiếp xúc với kháng sinh đó làm cho chúng trở nên kháng. Đề kháng thu nhận có thể là kết quả của sự thay đổi trong hệ thống gen bởi quá trình đột biến hoặc do sự du nhập gen mã hóa tính kháng thuốc từ bên ngoài qua quá trình chuyển gen ngang (horizontal gene transfer, HGT) (Rowe-Magnus *et al.*, 1999; Sykes, 2010). Nhìn chung, vi khuẩn có thể kháng với bất kỳ kháng sinh qua 3 cơ chế chủ yếu sau (Hình 2.6): (1) sản xuất enzyme làm bất hoạt hoặc biến đổi kháng sinh (enzymatic inactivation or modification of the drug); (2) đẩy kháng sinh ra ngoài tế bào bằng hệ thống bơm protein (efflux pump) trước khi kháng sinh đến vị trí đích (decreased cell permeability and/or increased efflux from the cell surface); (3) thay đổi điểm tiếp nhận làm giảm sự gắn kết của kháng sinh với điểm tiếp nhận; giảm hấp thu kháng sinh vào tế bào vi khuẩn (alteration/modification of its targets) (Tenover, 2006; Kunz and Brook, 2010).

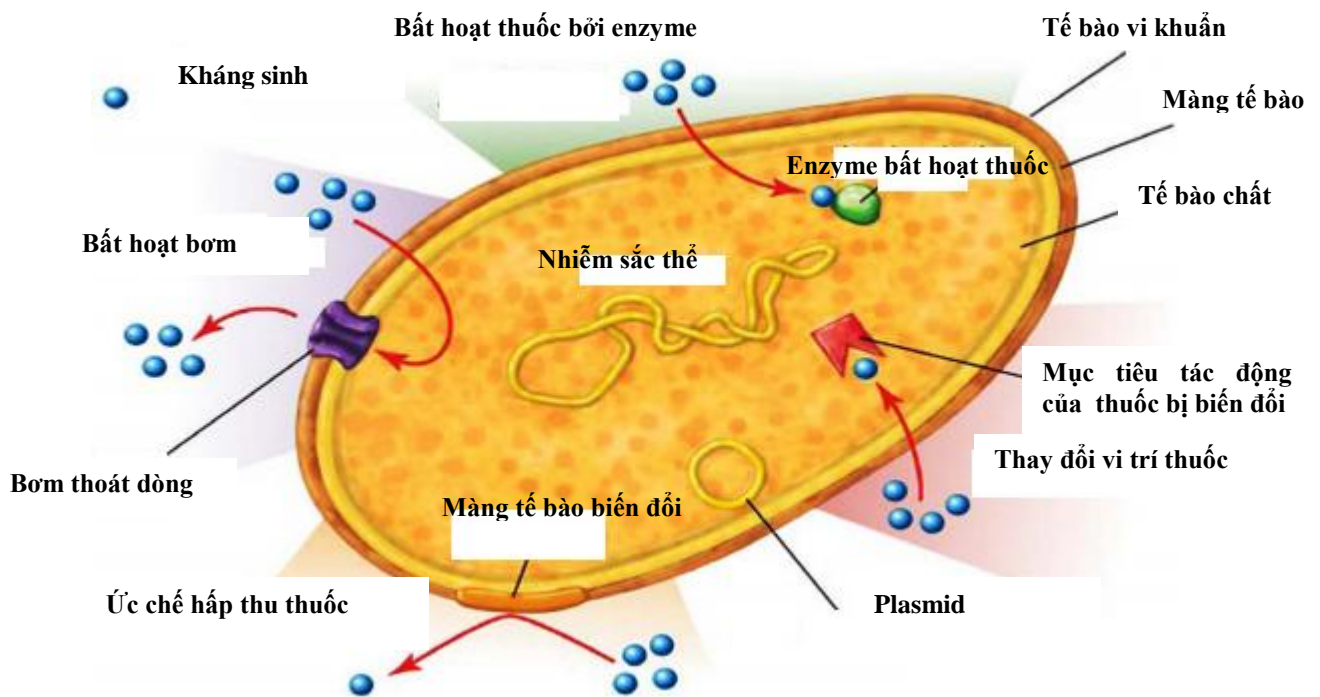


Hình 2.5: Cơ chế đề kháng tự nhiên của vi khuẩn (Blair *et al.*, 2015).

### 2.6 Sự kháng thuốc của vi khuẩn trong NTTS

Việc sử dụng thường xuyên và liên tục kháng sinh trong NTTS với mục đích phòng trị bệnh và bổ sung vào trong thức ăn với 1 liều lượng thấp như là chất kích thích tăng trưởng đã tạo ra áp lực chọn lọc và dẫn đến hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn (Kerry *et al.*, 1995; Marshall and Levy, 2011). Cho đến nay, trên thế giới có nhiều báo cáo về vi khuẩn kháng thuốc trên các loài ĐVTS như cá nheo Mỹ (Waltman and Shotts, 1986; Stock and Wiedemann, 2001), trên các loài cá vây (fin fish) (Starliper *et al.*, 1993; Son *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Mirand and Zemelman, 2002; Michel *et*

*al.*, 2003; Hatha *et al.*, 2005; Akinbowale *et al.*, 2006, 2007), lươn (Alcaide *et al.*, 2005), động vật có vỏ (shellfish) (Ho *et al.*, 2000) và thậm chí là trong các môi trường nuôi thủy sản (Petersen *et al.*, 2000; Tendencia and de la Pena, 2001; Chelossi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Ở Việt Nam, nhiều báo cáo cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn kháng thuốc trong các hệ thống nuôi thủy sản như *E. coli*, *Pseudomonas spp.* và *Aeromonas spp.* và các loài vi khuẩn khác (Đặng Thị Hoàng Oanh và *ctv.*, 2005; Sarter *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2012; Trần Thị Mỹ Hân, 2013).



Hình 2.6: Cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn (Bbosa *et al.*, 2014).

### 2.6.1 Sự kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri*

Hiện tại, nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đã được thực hiện để đánh giá hiện trạng kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri*. Kết quả nghiên cứu của Waltman and Shotts (1986) cho thấy phần lớn vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập trên cá nheo Mỹ nhạy đối với hầu hết các loại kháng sinh dùng để kiểm soát nhóm vi khuẩn Gram âm như aminoglycoside, cephalosporin, penicillin, quinolone, tetracycline, chloramphenicol và nitrofurantoin. Nghiên cứu cũng cho thấy vi khuẩn chỉ kháng với kháng sinh colistin và sulfonamide. Nghiên cứu tiếp theo của Reger *et al.* (1993) cũng cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* nhạy với enrofloxacin, gentamicin và doxycycline. Báo cáo của Stock and Wiedemann (2001) cho thấy các vi khuẩn thuộc giống *Edwardsiella*, kể cả vi khuẩn *E. ictaluri* còn nhạy với các kháng sinh thuộc nhóm quinolone nhưng

gần đây vi khuẩn *E. ictaluri* đã bắt đầu kháng với nhóm kháng sinh này (Akinbowale *et al.*, 2007).

Ở ĐBSCL, sự kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra cũng được nhiều tác giả nghiên cứu. Crumlish *et al.* (2002) đã tiến hành kiểm tra kháng sinh đồ vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra nuôi ở tỉnh An Giang và Cần Thơ. Kết quả cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập trên cá tra ở tỉnh An Giang chỉ kháng với oxolinic acid trong khi vi khuẩn được phân lập từ Cần Thơ thì kháng với oxytetracycline và sulfonamide. Nghiên cứu của Từ Thanh Dung và *ctv.* (2004) cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra bệnh tại An Giang, Cần Thơ, Đồng Tháp và Vĩnh Long cũng kháng với oxytetracycline, oxolinic acid và sulfonamide. Tuy nhiên, đến năm 2008, ngoài 2 loại kháng sinh oxytetracycline và sulfonamide thì vi khuẩn này đã kháng thêm với streptomycin, trimethoprim, flumequine và enrofloxacin (Dung *et al.*, 2008). Điểm nổi bật trong nghiên cứu này là đã xác định có trên 73% chủng vi khuẩn *E. ictaluri* biểu hiện sự đa kháng thuốc. Gần đây nhất, theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thiện Nam và *ctv.* (2010) cho thấy hầu hết vi khuẩn *E. ictaluri* kháng với streptomycin, chloramphenicol (95%), florfenicol, enrofloxacin (77,5%) và doxycycline (67,5%). Đặc biệt, nghiên cứu này đã xác định 97,5% chủng vi khuẩn biểu hiện sự đa kháng thuốc. Tuy nhiên, nghiên cứu của Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2010) cho thấy có đến 96% các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* thể hiện sự đa kháng thuốc.

### 2.6.2 Sự kháng thuốc của vi khuẩn *A. hydrophila*

Tương tự, nhiều nghiên cứu về sự kháng thuốc của vi khuẩn *A. hydrophila* trên thế giới đã được thực hiện (Guz and Kozinska, 2004; Akinbowale *et al.*, 2007; Ashiru *et al.*, 2011; Tipmongkolsilp *et al.*, 2012). Đặc biệt, các nghiên cứu gần đây cho thấy hiện tượng đa kháng thuốc của vi khuẩn này đã xuất hiện ở nhiều nơi trên thế giới (Akibowale *et al.*, 2006, 2007; Kaskhedilar and Chhabra, 2010; Stratev *et al.*, 2013). Trên cá nheo Mỹ, vi khuẩn *A. hydrophila* đã kháng với nhiều loại kháng sinh như ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, tetracycline, nitrofurantoin và oxytetracycline (Aoki, 1988; DePaola *et al.*, 1988). Các nghiên cứu khác cũng cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* đã kháng với các loại thuốc kháng sinh như chloramphenicol, terramycin, ampicillin, amoxicillin, sulfamethoxazole, cefalexin, oxytetracycline, oxolinic acid và erythromycin (McPheason *et al.*, 1991; Akibowale *et al.*, 2006; Akinbowale *et al.*, 2007; Vivekanandhan *et al.*, 2002).

Ở nước ta, sự kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn *A. hydrophila* cũng được các nhà khoa học quan tâm và nghiên cứu, đặc biệt là vi khuẩn gây bệnh

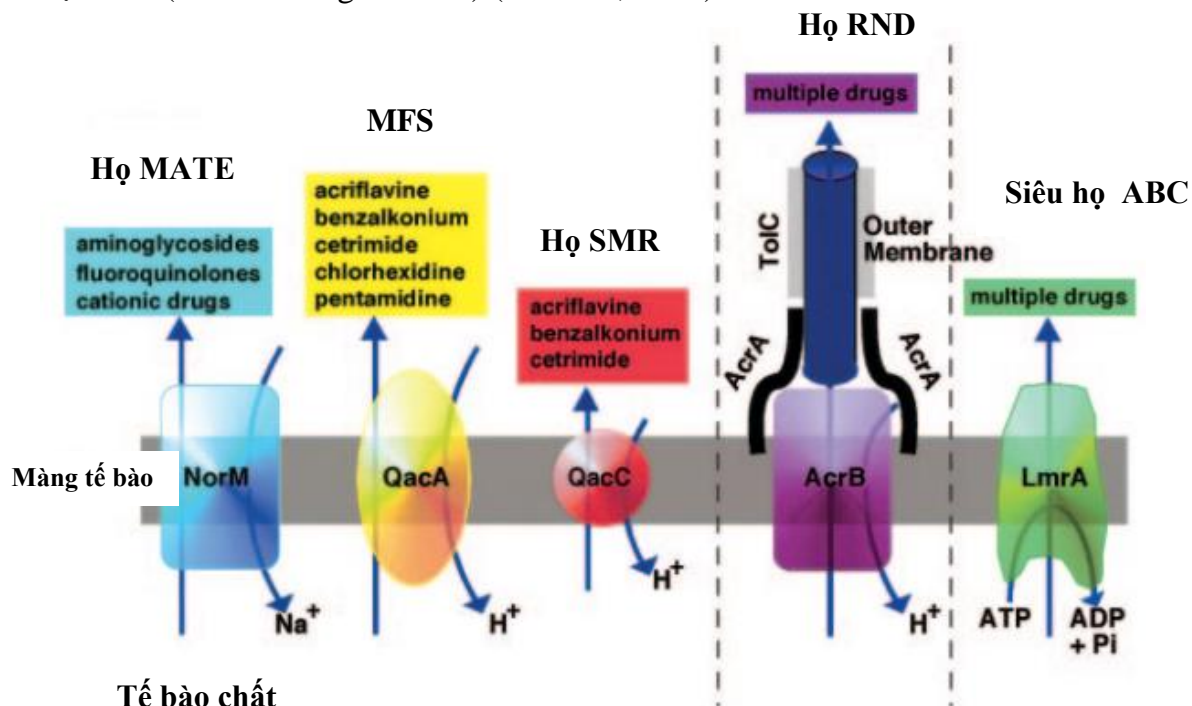
trên cá tra ở ĐBSCL. Nghiên cứu của Crumlish *et al.* (2007) cho thấy vi khuẩn này đã kháng thêm với oxytetracycline, erythromycin và acid oxolinic. Nghiên cứu của Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2010) với kết quả là các chủng *A. hydrophila* phân lập trên cá tra tại Cần Thơ, Đồng Tháp và Sóc Trăng đã kháng cao với trimethoprim/sulfamethoxazole, streptomycin, đặc biệt trong nghiên cứu này cho thấy có đến 23% vi khuẩn *A. hydrophila* thể hiện sự đa kháng. Ngoài ra, nghiên cứu gần đây của Trần Thị Mỹ Hân (2013) cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập trên cá thát lát còm (*Chitala Chitala* Hamilton, 1822) đã kháng với ampicillin, cefazolin, colistin và streptomycin.

## 2.7 Hiện tượng và cơ chế đa kháng thuốc của vi khuẩn

Việc sử dụng thường xuyên các loại kháng sinh để điều trị bệnh cho người cũng như trong lĩnh vực thú y và NTTS đã làm cho vi khuẩn không chỉ kháng với 1 loại kháng sinh mà còn làm cho chúng có khả năng kháng cùng lúc với nhiều loại kháng sinh (Akinbowale *et al.*, 2007). Nhìn chung, hiện tượng đa kháng thuốc đang trở nên phổ biến ở vi khuẩn Gram âm và Gram dương (White *et al.*, 2001; Alekshun and Levy, 2007) và gây khó khăn cho việc điều trị bệnh (Alekshun and Levy, 2007; Nikaido, 2009). Cho đến nay, ngoài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* thì hiện tượng đa kháng thuốc cũng được báo cáo ở nhiều loài vi khuẩn khác như *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Stenotrophomonas* và *Burkholderia* (Alekshun and Levy, 2007; Džidic *et al.*, 2008; Giedraitienė *et al.*, 2011).

Nhìn chung, sự đa kháng thuốc của vi khuẩn có thể được thực hiện thông qua 2 cơ chế chủ yếu: cơ chế thu nhận (acquired mechanism) và cơ chế tự nhiên (intrinsic mechanism). Cơ chế thu nhận là do sự hiện diện của các gen kháng thuốc khác nhau (mỗi gen mã hóa tính kháng đối với 1 kháng sinh) trên cùng bộ gen vi khuẩn (multiple antibiotic resistance genes). Cơ chế này thường liên quan đến sự đột biến ở những gen mục tiêu của kháng sinh và sự truyền gen kháng thuốc thông qua các plasmid, thực khuẩn thể (bacteriophage), gen nhảy (transposon) và các integron (Alekshun and Levy, 2007). Sự truyền gen kháng thuốc thông qua các yếu tố di truyền vận động như plasmid, transposon và integron được cho là cơ chế phổ biến nhất trong sự đa kháng thuốc của vi khuẩn xảy ra trong môi trường (Davies, 1994; White *et al.*, 2001; Alekshun and Levy, 2007). Trong khi đó, ở cơ chế tự nhiên (intrinsic mechanism) thì vi khuẩn đa kháng thuốc được thực hiện nhờ hệ thống bơm thoát dòng (multidrug efflux pumps) (Alekshun and Levy, 2007;

Nikaido, 2009). Hiện nay, ít nhất 5 họ protein (Hình 2.7) liên quan đến hệ thống bơm thoát dòng đã được báo cáo, gồm họ RND (resistance nodulation division), họ MFS (major facilitator superfamily), họ SMR (staphylococcal multiresistance), họ MATE (multidrug and toxic compound extrusion) và siêu họ ABC (ATP binding cassette) (Piddock, 2006).



Tế bào chất

Hình 2.7: Các hệ thống bơm đa kháng của vi khuẩn (Piddock, 2006).

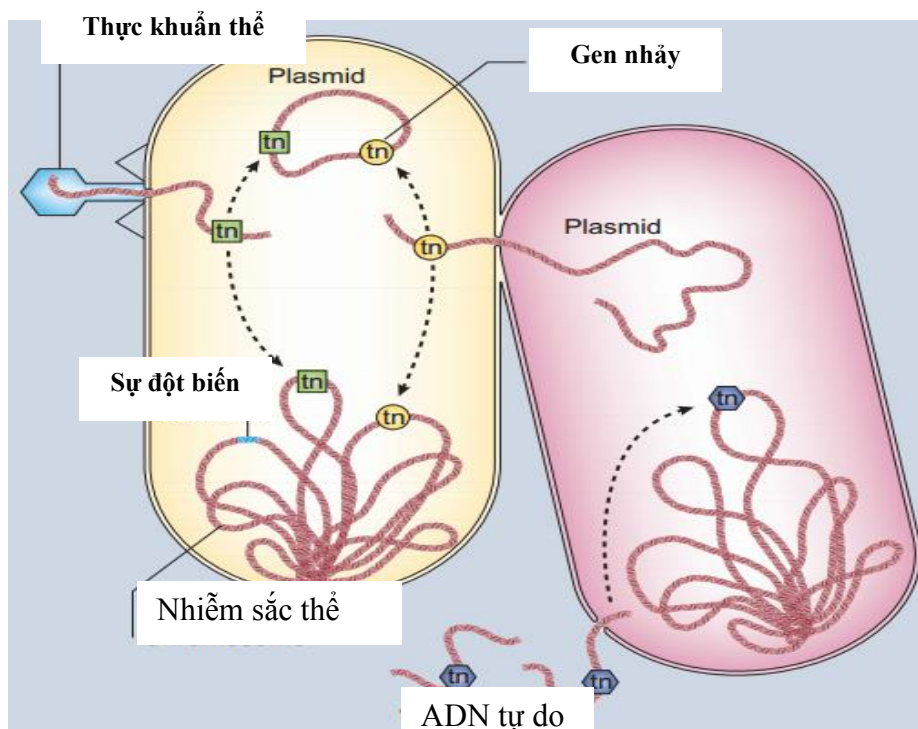
## 2.8 Các yếu tố di truyền vận động liên quan đến sự kháng thuốc của vi khuẩn

### 2.8.1 Plasmid

Plasmid là các phân tử ADN mạch đôi, dạng vòng hoặc thẳng (circular/linear double-stranded DNA) nằm ngoài ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Chúng có thể tự nhân lên độc lập với tế bào chủ (extra-chromosomal DNA self-replicating genetic element) do có vị trí khởi đầu sao chép (ori hay origin of replication) (Leplae *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2005). Các plasmid thường có kích thước từ vài kilobase pairs (kbp) đến vài trăm kbp (Waters, 1999). Trong 1 tế bào vi khuẩn có thể có từ 1 đến nhiều loại plasmid khác nhau và mỗi loại có thể có nhiều bản sao trong tế bào. Nhìn chung, các plasmid đóng vai trò quan trọng đến việc phát tán của các gen kháng kháng sinh do chúng mang các gen kháng kháng sinh (các R-plasmid, resistance plasmid) và trên plasmid có chứa gen *tra* (transfer gene) giúp cho plasmid có thể di chuyển từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác trong cùng 1 loài hoặc khác loài với nhau (Hình 2.8). Tuy nhiên, ngày nay các plasmid được xem là nhân tố quan trọng gây nên hiện tượng đa kháng thuốc ở vi khuẩn do chúng mang



các gen mã hóa cho việc kháng lại nhiều loại kháng sinh như  $\beta$ -lactam, macrolide, aminoglycoside, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole và phenicol (Nikaido, 2009). Thêm vào đó, các yếu tố di truyền vận động khác như gen nhảy (transposon), đoạn xen/đoạn chèn (insertion sequence) và các integron mang các gen kháng thuốc thường định vị trên các plasmid nên việc phát tán và truyền gen kháng thuốc của vi khuẩn có thể xảy ra ở tần suất cao (Waters, 1999; Cambray *et al.*, 2010).



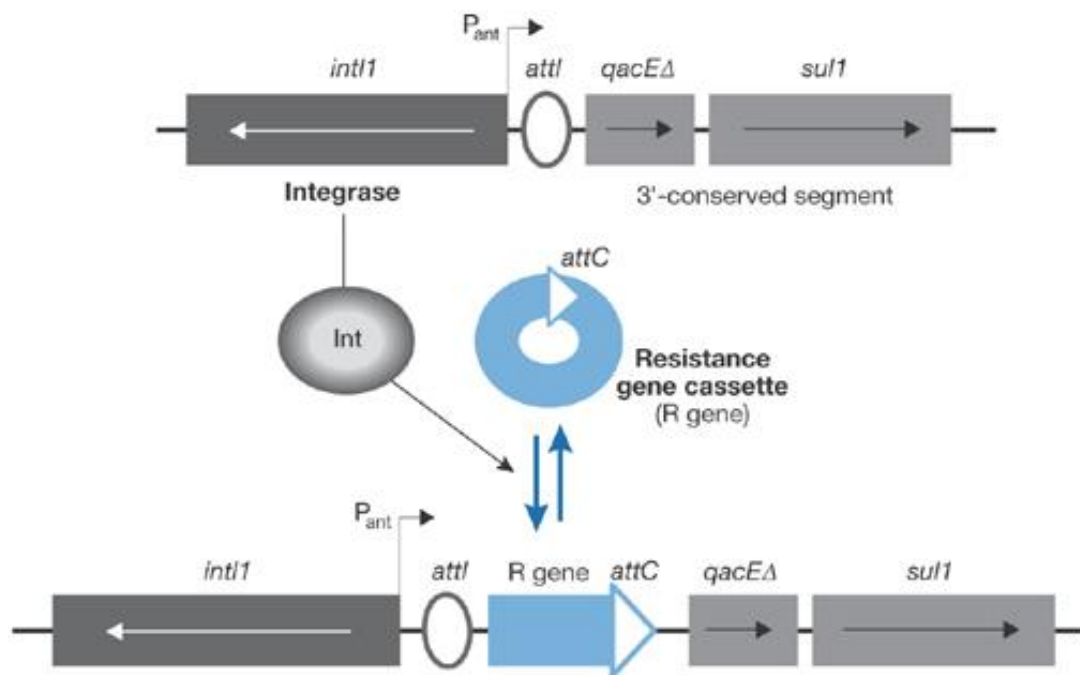
Hình 2.8: Sự trao đổi gen kháng thuốc qua plasmid ở vi khuẩn (Levy and Marshall, 2004).

### 2.8.2 Các integron

Stokes and Hall (1989) lần đầu tiên đã phát hiện và mô tả các yếu tố di truyền vận động, được gọi là integron có khả năng thu nhận gen (gene capture system) ở nhiều loài vi khuẩn. Các integron có khả năng nhận biết, bắt giữ 1 hay nhiều gen cassette (gen cassette thường là các gen mã hóa sự đề kháng với kháng sinh) (Cambray *et al.*, 2010). Do integron có khả năng thu giữ 1 hay nhiều gen cassette, các vi khuẩn mang integron thường có hiện tượng đa kháng thuốc (Collis and Hall, 1992; Collis and Hall, 1995). Các integron thường hiện diện phổ biến ở vi khuẩn Gram âm, đặc biệt là ở các loài vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* (White *et al.*, 2001).

Cấu trúc chung của các integron bao gồm 1 vùng chức năng (functional platform, vùng bảo tồn 5'-CS: 5'-conserved segment): mang các thành phần cần thiết cho hệ thống hoạt động và 1 vùng biến đổi (variable region) chứa

nhiều gen cassette mã hóa tính kháng kháng sinh (Hình 2.9). Vùng chức năng của integron gồm có 3 vị trí quan trọng: vị trí mang gen tổng hợp enzyme tyrosine recombinase (*IntI* gene) có chức năng xúc tác quá trình cắt và định hướng sự gắn vào integron của các gen cassette (Stokes and Hall, 1989), điểm gắn vào của gen cassette ở 1 vị trí chuyên biệt được gọi là *attI* (Collis *et al.*, 1993) và 1 promotor ( $P_{ant}$ ). Các integron bản thân chúng không thể di chuyển nhưng chúng thường gắn với các yếu tố di truyền vận động khác như các gen nhảy (transposon) hoặc các plasmid tiếp hợp (conjugative plasmid), nhờ đó mà chúng có thể phát tán gen kháng thuốc trong cùng 1 loài (intraspecies) và giữa các loài với nhau (interspecies) (Davies and Davies, 2010).



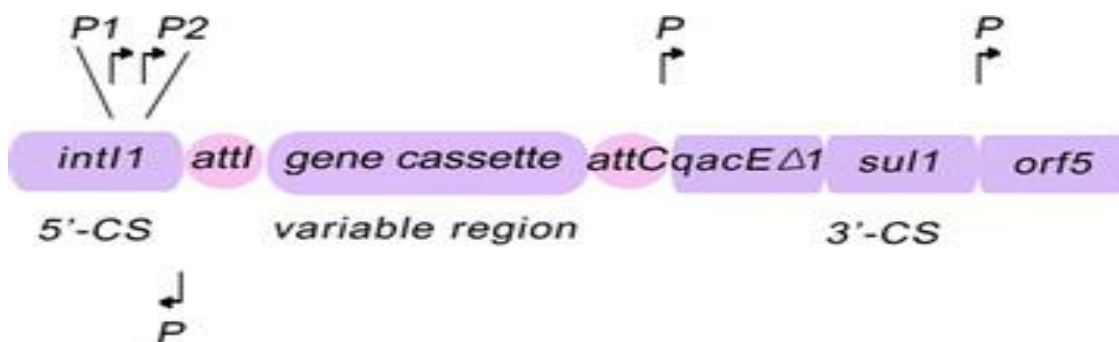
Hình 2.9: Cấu trúc chung của các integron và cơ chế thu nhận các gen cassette của integron (Davies, 2008).

Các integron được chia làm 2 loại: loại liên kết với các yếu tố di truyền vận động như gen nhảy hoặc các plasmid tiếp hợp, gọi là các integron di động (mobile integron/MIs) và loại nằm trên nhiễm sắc thể, gọi là integron nhiễm sắc thể (chromosomal integron-CIs hoặc super-integron). Các integron nhiễm sắc thể thường không liên quan đến kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn (Cambray *et al.*, 2010). Các integron di động được chia thành nhiều nhóm khác nhau dựa trên trình tự amino acid của các gen integrase tương ứng, các gen này thường tương đồng từ 45-58% (Rowe-Magnus *et al.*, 2002). Cho đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã phát hiện được ít nhất 5 nhóm integron di động, trong số đó thì các integron nhóm 1 và nhóm 2 là những integron hiện diện phổ biến ở các vi khuẩn có kiểu hình đa kháng thuốc và chúng thu hút sự

quan tâm của các nhà khoa học do có khả năng phát tán các gen kháng thuốc có thể xảy ra trong cùng 1 loài và giữa các loài với nhau (White *et al.*, 2001).

### 2.8.2.1 Các integron nhóm 1

Cấu trúc chung của các integron nhóm 1 (class 1 integrons) gồm vùng 5'-CS và 3'-CS bị chia cắt bởi vùng biến đổi chứa 1 hoặc nhiều gen cassette (Rodríguez *et al.*, 2006) (Hình 2.10). Vùng 5'-CS là vùng chức năng chứa gene integrase (*intI1*), điểm tiếp hợp (*attI1*) và 1 promoter (Pc) cho phép gen cassette gắn vào *attI1* ở 1 hướng thích hợp. Vùng 3'-CS của các integron nhóm 1 bao gồm gen *qacEΔ1* (*qacEΔ1* gene) mã hóa tính kháng đối với các hợp chất ammonia bậc 4 (quaternary ammonium compounds) và gen *sul1* (*sul1* gene) mã hóa gen kháng với kháng sinh nhóm sulfonamide và 2 khung đọc mở: *orf5* và *orf6* (open reading frame) (Partridge *et al.*, 2009). Các integron nhóm 1 thường hiện diện phổ biến ở vi khuẩn đa kháng thuốc và được phát hiện ở nhiều loài vi khuẩn Gram âm như *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* và *Vibrio* (Fluit and Schmitz, 2004).



Hình 2.10: Cấu trúc chung của các integron nhóm 1 (Aleskshun and Levy, 2007).

### 2.8.2.2 Các integron nhóm 2

Các integron nhóm 2 (class 2 integron) thường liên kết với tranposon Tn7 (Collis and Hall, 1995). Integron nhóm 2 không chứa gen *sul1* nhưng nó chứa các gen có vai trò thúc đẩy sự chuyển vị của Tn7 (Radstrom *et al.*, 1994; Recchia and Hall, 1995). Theo Hansson *et al.* (2002) thì gen integrase của integron nhóm 2 (*IntI2*) có tỷ lệ tương đồng với gen integrase của integron nhóm 1 là 46%. Các integron nhóm 2 thường xuất hiện ở các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*, đặc biệt là ở vi khuẩn *E. coli* (White *et al.*, 2001; Crespo *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2006). Integron nhóm 2 thường chứa các gen *ereA* (kháng với erythromycin); *catB2* (kháng chloramphenicol), *aadB* (kháng gentamicin, tobramycin và kanamycin), *dfr*



(kháng trimethoprim), *sat* (kháng streptothrycin) và *estX* (mã hóa cho esterase giả định) (Partridge *et al.*, 2009).

### 2.8.2.3 Các integron nhóm 3, 4 và 5

Ngoài các integron nhóm 1 và 2 thì các integron nhóm 3, 4 và 5 cũng được phát hiện ở vi khuẩn. Tuy nhiên, chỉ 1 số ít các nghiên cứu về các integron nhóm này được báo cáo. Các integron nhóm 3 lần đầu tiên được phát hiện bởi Arakawa *et al.* (1995) từ các chủng vi khuẩn *Serratia marcescens* kháng carbapenem. Trong khi, các integron nhóm 4 và 5 đã được báo cáo từ 1 số loài *Vibrio* kháng với trimethoprim (Hochhut *et al.*, 2001; Cambray *et al.*, 2010).

### 2.8.2.4 Các gen cassette

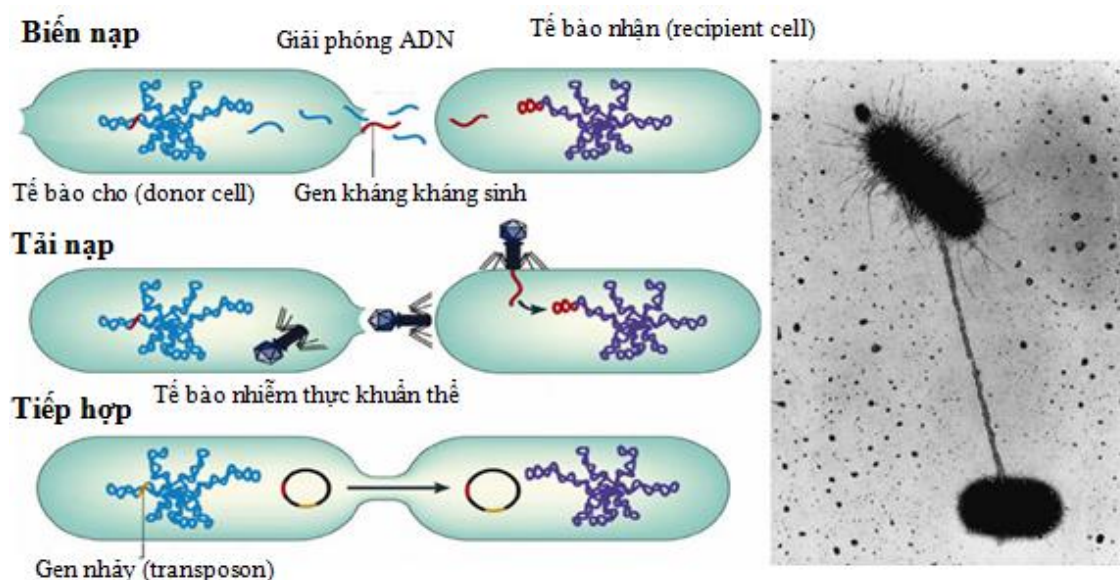
Gen cassette là những yếu tố di truyền vận động nhỏ nhất và không có khả năng sao chép, thường chỉ chứa 1 gen đơn và 1 điểm tái tổ hợp (*attC*) hay còn gọi là 59-be (59-base element) (Labbate *et al.*, 2009). Hầu hết các gen cassette không có promoter (vùng khởi động) nên hoạt động của chúng phụ thuộc vào promoter (*P<sub>c</sub>*) của integron mà chúng chèn vào (Cambray *et al.*, 2010). Do đó, nó không thể tự nhân đôi ở trạng thái tự do. Nhiều gen cassette có thể chèn vào cùng 1 integron nên gây ra hiện tượng đa kháng (Partridge *et al.*, 2009). Hiện nay, theo báo cáo của các nhà khoa học thì có hơn 130 gen cassette khác nhau đã được xác định (Fluit and Schmitz, 2004; Partridge *et al.*, 2009). Trong đó, có hơn 80 gen cassette khác nhau từ integron nhóm 1 đã được phát hiện và chúng thường mã hóa cho sự đề kháng với các kháng sinh như aminoglycoside, chloramphenicol, trimethoprim, streptothricin, rifampin, erythromycin, fosfomycin, lincomycin, các hợp chất amino bậc 4 và các kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$  – lactam (Rowe-Magmus and Mazel, 2002; Fluit and Schmitz, 2004).

## 2.9 Hiện tượng trao đổi gen kháng thuốc giữa các loài vi khuẩn trong tự nhiên

### 2.9.1 Các quá trình tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc của vi khuẩn

Sự trao đổi vật liệu di truyền của vi khuẩn có thể diễn ra qua 2 hình thức, đó là quá trình chuyển gen ngang (lateral hoặc horizontal gene transfer, LGT/HTG) và chuyển gen thẳng (vertical gene transfer hoặc vertical evolution) (Hình 2.11). Quá trình chuyển gen thẳng là do vi khuẩn ban đầu không có gen kháng thuốc nhưng sau đó bị đột biến có gen kháng thuốc và khi vi khuẩn có gen này thì chúng có thể truyền trực tiếp gen kháng thuốc của chúng cho các thế hệ con cháu của chúng qua quá trình tái bản ADN (DNA replication) (Madhavan and Murali, 2011).

Trong khi đó, sự chuyển gen ngang là quá trình mà vật liệu di truyền có thể trao đổi giữa các vi khuẩn trong cùng 1 loài hoặc khác loài với nhau (Dröge *et al.*, 1999). Quá trình này giữ vai trò rất quan trọng trong việc phát tán các gen kháng thuốc giữa các vi khuẩn trong tự nhiên (de la Cruz and Davies, 2000). Cho đến nay, có ít nhất 3 cơ chế liên quan quá trình chuyển gen ngang của vi khuẩn đã được phát hiện, đó là quá trình biến nạp (transformation), tải nạp (transduction) và tiếp hợp (conjugation). Biến nạp là 1 trong những hình thức chuyển gen ngang lần đầu tiên được phát hiện bởi Griffith ở vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928), còn tải nạp do các thực khuẩn thể (phage) thì ít được biết đến. Trong khi đó, tiếp hợp được xem là 1 trong những cơ chế phổ biến nhất để vi khuẩn để trao đổi vật chất di truyền (Mazel and Davies, 1999; Norman *et al.*, 2009).



Hình 2.11: Các quá trình chuyển gen ngang ở vi khuẩn (Furuya and Lowy, 2006).

### 2.9.2 Các kết quả nghiên cứu liên quan đến khả năng truyền gen kháng thuốc giữa nhóm vi khuẩn gây bệnh ở ĐVTS và vi khuẩn *E. coli*

Cho đến nay, trên thế giới đã nhiều nghiên cứu chứng minh nhiều loài vi khuẩn có thể tiếp hợp và chuyển gen kháng thuốc của chúng cho vi khuẩn *E. coli* (Kruse and Sorum, 1994; Agersø and Sandvang, 2005; Cabello, 2006; Van *et al.*, 2007; Heuer *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Marshall and Levy, 2011; Tremblay *et al.*, 2011). Trong lĩnh vực thủy sản, nhiều nghiên cứu cho thấy các vi khuẩn gây bệnh trên cá như *Aeromonas* spp., *E. ictaluri*, *Pseudomonas* spp. có thể chuyển gen kháng thuốc của chúng sang vi khuẩn *E. coli* (Sorum and Sunde, 2001; Sorum and L'Abée, 2002; Sorum *et al.*, 2003; Dung *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2014). Kết quả nghiên cứu của Son *et al.* (1997) cho

thấy trong số các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* AH4, AH5, AH9, AH10, AH11 và AH19 phân lập từ cá rô phi đen/cá rô phi cỏ (*Telapia mossambica*) gây bệnh loét da (skin ulcer) ở Malaysia được chọn thí nghiệm tiếp hợp thì chỉ có chủng AH11 có thể chuyển các plamid có ích thước 6,2 kbp và 63,4 kbp (kháng ampicillin and tetracycline) sang vi khuẩn *E. coli* K12. Nghiên cứu của Schmidt *et al.* (2001a) cho thấy 17/40 chủng thuộc nhóm *Aeromonas* di động kháng oxytetracycline thu thập từ các trại nuôi cá hồi ở Đan Mạch đã chuyển các plasmid lớn của chúng (110 kbp và 160 kbp) sang vi khuẩn *E. coli* CSH26Rf. Nghiên cứu khác của Schmidt *et al.* (2001b) cũng cho thấy 15/16 chủng *A. salmonicida* gây bệnh nhọt (furunculosis) trên cá hồi ở Bắc Âu và Bắc Mỹ có thể chuyển các R-plasmid của chúng sang vi khuẩn *E. coli* CSH26Rf. Kết quả tiếp hợp của Yoo *et al.* (2003) ghi nhận vi khuẩn *Vibrio damsela* JE1 có thể chuyển các R-plasmid mang các gen kháng chloramphenicol và tetracycline sang vi khuẩn *E. coli* K-12 HB101. Nghiên cứu của Furushita *et al.* (2003) chứng minh các chủng vi khuẩn *Photobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Citrobacter* và *Salmonella* spp., phân lập từ 3 địa điểm nuôi cá loài cá như cam sọc vàng (*Seriola lalandi*), cá cam Nhật Bản (*Seriola quinqueradiata*), cá cam sọc (*Seriola dumerili*) và cá ngừ vây xanh Đại Tây dương (*Thunnus thynnus*) đã chuyển các gen *tetB*, *tetY* hoặc *tetD* sang vi khuẩn *E. coli* HB-101 sau khi tiếp hợp. Vi khuẩn *A. salmonicida* gây bệnh trên cá hồi mang R-plasmid (pRAS1, kích thước 45 kbp) kháng tetracycline, trimethoprim và sulfonamide có thể chuyển sang vi khuẩn *E. coli* (Sorum *et al.*, 2003). Lần đầu tiên trong nghiên cứu của Agero *et al.* (2007) chứng minh gen *tetE* nằm trên plasmid có kích thước 150 kbp của vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân lập từ cá nuôi ở Đan Mạch có thể chuyển sang vi khuẩn *E. coli*. Ở Úc, nghiên cứu của Akinbowale *et al.* (2007) cho thấy 5/12 chủng vi khuẩn kháng oxytetracycline (gồm 4 chủng *Aeromonas* WA12, WA13, WA14 và WA15 và 1 chủng *Vibrio* QV5) có thể chuyển R-plasmid (mang các gen kháng tetracycline: *tetA*, *tetD* và *tetM*) của chúng sang vi khuẩn *E. coli* (từ gà heo và người). Tuy nhiên, không phải tất cả các gen này cùng được chuyển từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận. Chẳng hạn, 2 chủng *A. hydrophila* WA12 và WA14 mang các gen *tetD*, *tetE* và *tetM* nhưng chỉ có *tetD* và *tetM* hoặc chỉ riêng *tetM* chuyển sang chủng vi khuẩn nhận, trong khi đó chủng *A. hydrophila* WA13 mang gen *tetA* và *tetM* chỉ chuyển *tetA* sang vi khuẩn nhận. Đặc biệt, qua kết quả tiếp hợp của nghiên cứu này cũng cho thấy bên cạnh gen kháng tetracycline thì các gen kháng thuốc kháng sinh khác như cephalothin, chloramphenicol, trimethoprim, sulphamethoxazole, sulphonamide và trimethoprim/sulphamethoxazole cũng được đồng vận chuyển (co-transfer) sang vi khuẩn nhận. Trên cá tra, kết quả

nghiên cứu của Dung *et al.* (2009) cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang plasmid không tương hợp (*IncK*) có thể chuyển sang vi khuẩn *E. coli*. Kết quả nghiên cứu của Shah *et al.* (2014) cho thấy trong số 9 chủng vi khuẩn được chọn để khảo sát khả năng tiếp hợp thì 2 chủng *Marinobacter litoralis* và *Stenotrophomonas maltophilia* có nguồn gốc từ địa điểm nuôi cá hồi có thể chuyển cả 2 gen *tetA* và *sul2* sang vi khuẩn *E. coli*.

## **2.10 Sự kháng tetracycline của vi khuẩn**

### **2.10.1 Tổng quan về kháng sinh nhóm tetracycline**

Tetracycline thuộc nhóm kháng sinh phổ rộng (broad-spectrum), có hoạt tính ức chế nhiều loài vi khuẩn Gram âm và Gram dương hiếu khí và kỵ khí (Roberts, 2003). Xét về mặt dược lý, các kháng sinh thuộc nhóm này có thể chia là 2 thế hệ: thế hệ 1 gồm các kháng sinh có nguồn gốc tự nhiên (tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline và demeclocycline); thế hệ 2 gồm các kháng sinh có nguồn gốc bán tổng hợp (doxycycline và minocycline) (Chopra *et al.*, 1992; Chopra and Roberts, 2001; Prescott, 2000). Chlortetracycline là loại kháng sinh thuộc nhóm tetracycline lần đầu tiên được phát hiện vào 1948 từ loài *Streptomyces aureofaciens* (Chopra *et al.*, 1992; Chopra and Roberts, 2001). Nhìn chung, các kháng sinh nhóm tetracycline có cấu trúc hóa học giống nhau, chúng chỉ khác nhau ở các gốc R.

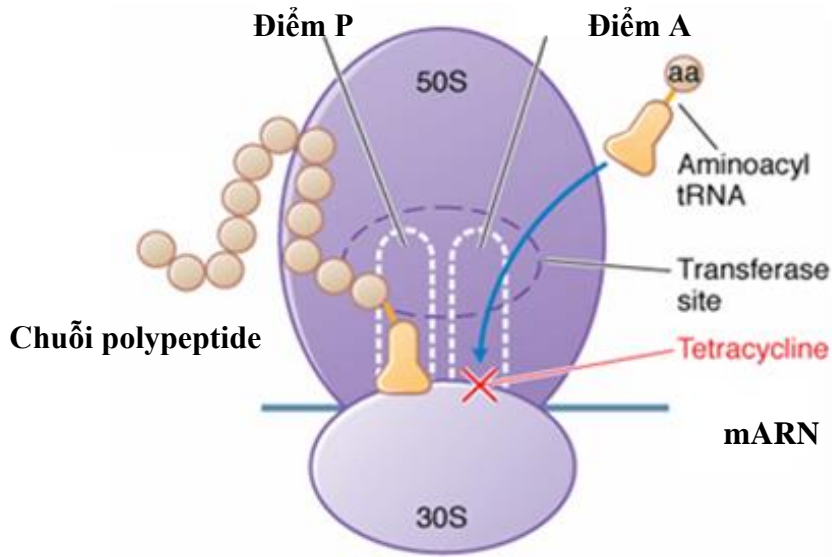
### **2.10.2 Cơ chế hoạt động của kháng sinh nhóm tetracycline**

Nhìn chung, tất cả các kháng sinh nhóm tetracycline có cơ chế hoạt động là ức chế quá trình tổng hợp protein của tế bào vi khuẩn (Hình 2.12) (Speer *et al.*, 1992; Chopra and Roberts, 2001). Sau khi khuếch tán vào bên trong tế bào vi khuẩn, kháng sinh tetracycline sẽ gắn vào các thụ thể (receptor) trên tiểu đơn vị 30S của ribosome vi khuẩn làm cho các tRNA vận chuyển acid amin không thể gắn vào điểm A (A site) trên ribosome nên chuỗi peptide không thể kéo dài, vì vậy quá trình tổng hợp protein không thể xảy ra (Chopra and Roberts, 2001).

### **2.10.3 Cơ chế kháng tetracycline của vi khuẩn**

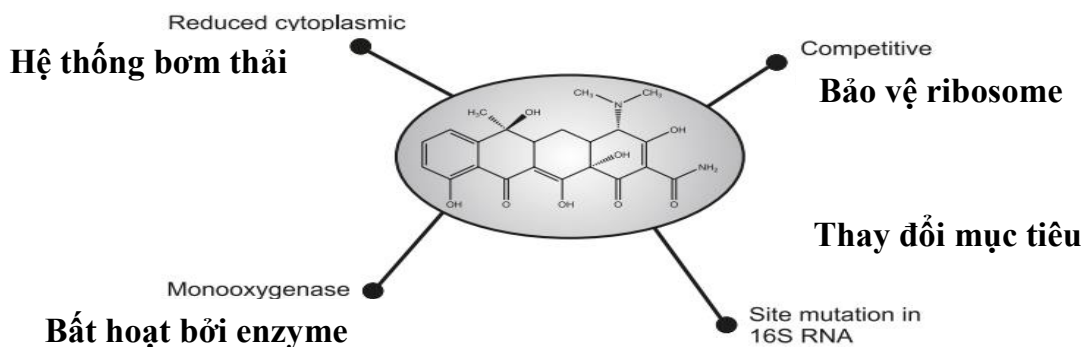
Trước giữa thập niên 1950, hầu hết các vi khuẩn đều nhạy với tetracycline (van Hoek *et al.*, 2011). Ngày nay, do các kháng sinh nhóm tetracycline có độc tính và chi phí thấp (van Hoek *et al.*, 2011) nên thường được sử dụng rộng rãi trong NTTS để kiểm soát các nguồn bệnh, trong đó oxytetracycline thường được sử dụng ở hầu hết các nước có ngành công nghiệp nuôi cá (Sorum *et al.*, 1992; Miranda *et al.*, 2003). Do đó, nhiều nghiên cứu đã phát hiện nhiều loài vi khuẩn kháng tetracycline gây bệnh trên cá đã xuất hiện trong NTTS (DePaola *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 2001a; Miranda *et al.*, 2003). Ngày nay, vi khuẩn kháng tetracycline đã xuất hiện thường xuyên

hơn, đặc biệt là nhóm vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* (Chopra and Roberts, 2001).



Hình 2.12: Cơ chế hoạt động của các kháng sinh thuộc nhóm tetracycline ([www.antibiotics-info.org/tetracycline.html](http://www.antibiotics-info.org/tetracycline.html)).

Theo Zakeri and Wright (2008) thì hiện nay đã có 4 cơ chế kháng đáp ứng tetracycline (acquired tetracycline) (Hình 2.13) của vi khuẩn đã được phát hiện: (1) vi khuẩn giảm nồng độ của tetracycline trong tế bào bằng hệ thống bơm thải (efflux pumps) (Roberts, 1996), (2) phá vỡ sự tương tác giữa ribosome-tetracycline bằng các protein bảo vệ ribosome (RPPs-ribosomal protection proteins) (Roberts, 1996), (3) bất hoạt kháng sinh bởi enzyme (enzymatic inactivation) thông qua quá trình gọi là monohydroxylation (Yang *et al.*, 2004) và (4) cơ chế sau cùng là thay đổi vị trí đích (target site) tác dụng của kháng sinh bằng đột biến vùng 16S rRNA (Ross *et al.*, 1998). Trong số các cơ chế trên thì 2 cơ chế kháng tetracycline qua các protein bảo vệ ribosome và hệ thống bơm thải là phổ biến và thường gặp nhất ở vi khuẩn (Chopra and Roberts, 2001).



Hình 2.13: Các cơ chế kháng tetracycline ở vi khuẩn (Zakeri and Wright, 2008).

Cho đến nay, có khoảng 45 gen kháng đáp ứng tetracycline khác nhau đã được xác định, gồm 40 gen *tet* (kháng tetracycline), 3 gen *otr* (kháng oxytetracycline) và 1 gen *tcr* (Roberts, 1996, 2005; Brown *et al.*, 2008). Trong số các gen này, có 29 gen mã hóa cho hệ thống bơm thải (gồm 26 gen *tet*, 2 gen *otr* và 1 gen *tcr*), 12 gen mã hóa cho các protein bảo vệ ribosome (11 gen *tet* và 1 gen *otr*), 3 gen *tet* liên quan cơ chế bất hoạt kháng sinh bằng enzyme (Bảng 2.4). Tuy nhiên, cho đến nay cơ chế kháng tetracycline của gen *tetU* vẫn chưa được sáng tỏ. Các gen mã hóa tính kháng tetracycline thường nằm trên các yếu tố di truyền vận động (mobile genetic element) như các plasmid hoặc gen nhảy (transposon) (Speer *et al.*, 1992).

Bảng 2.4: Các gen kháng đáp ứng tetracycline

Cơ chế	Gen
Efflux pumps (bơm đẩy)	<i>tetA</i> , <i>tetA(P)</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i> , <i>tetH</i> , <i>tetJ</i> , <i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetV</i> , <i>tetY</i> , <i>tetZ</i> , <i>tet30</i> , <i>tet31</i> , <i>tet33</i> , <i>tet35</i> , <i>tet38</i> , <i>tet39</i> , <i>tet40</i> , <i>tet41</i> , <i>tet42</i> , <i>tet43</i> , <i>tet45</i> , <i>tet46</i> , <i>otrB</i> , <i>otrC</i> và <i>tcr</i> .
Ribosomal protection (protein bảo vệ)	<i>tetB (P)</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetS</i> , <i>tetT</i> , <i>tetW</i> , <i>tet32</i> , <i>tet36</i> , <i>tet44</i> , <i>tet</i> và <i>otrA</i> .
Enzymatic inactivation (bất hoạt bởi enzyme)	<i>tetX</i> , <i>tet34</i> và <i>tet37</i> .
Unknown (chưa biết)	<i>tetU</i>

*Roberts et al. (2012)*

## 2.11 Sự kháng florfenicol của vi khuẩn

### 2.11.1 Tổng quan về kháng sinh nhóm phenicol

Phenicol thuộc nhóm kháng sinh phổ rộng, bao gồm các loại như chloramphenicol ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ), thiamphenicol ( $C_{12}H_{15}Cl_2N_2O_5S$ ), florfenicol ( $C_{12}H_{14}Cl_2NO_4SF$ ) và florphenicol amine ( $C_{10}H_{14}Cl_2NO_3SF$ ). Các kháng sinh thuộc nhóm phenicol có hoạt tính kháng khuẩn rất mạnh, có tác dụng đối với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương (Schwarz *et al.*, 2004). Nhìn chung, các kháng sinh nhóm này có cấu trúc hóa học tương tự nhau, chỉ khác nhau ở gốc R.

Chloramphenicol đã được sử dụng phổ biến trong chăn nuôi thú y mãi cho đến khi độc tính của nó được phát hiện. Do đó, hiện nay chloramphenicol đã bị cấm sử dụng trong lĩnh vực thú y và trong NTTS. Florfenicol là dẫn xuất của chloramphenicol với nhóm p-methyl sulfonyl và fluorine thay thế cho nhóm p-nitro và hydroxyl trong cấu trúc của chloramphenicol. Florfenicol được ứng dụng rộng rãi trong ngành thú y và được sử dụng trong NTTS ở châu Á từ những thập niên 1980 (Keyes *et al.*, 2000). Ở Châu Âu, florfenicol được sử dụng để trị bệnh truyền nhiễm đường hô hấp ở gia súc vào năm 1995 và trên heo vào năm 2000. Ở Mỹ, nó cũng được Cơ Quan quản lý Dược và

Thực phẩm (Food and Drug Administration) cho phép sử dụng vào năm 1996 để điều trị các nguồn bệnh trên đường hô hấp của bò và sử dụng trong NTTS (Fernandez-Alcarcon *et al.*, 2010).

### **2.11.2 Cơ chế hoạt động của kháng sinh nhóm phenicol**

Ở Việt Nam, chloramphenicol cùng với kháng sinh enrofloxacin (thuộc nhóm quinolone) hiện đang bị cấm sử dụng trong NTTS. Tuy nhiên, florfenicol thì vẫn được phép sử dụng trong NTTS ở nước ta (Thông tư số 03/2012/TT-BNNPTNT). Tương tự như chloramphenicol, cơ chế hoạt động của của florfenicol là gắn vào tiểu đơn vị 50S của ribosome và ức chế enzym peptidyl transferase. Do đó ngăn cản việc chuyển các acid amin từ phân tử tRNA đến chuỗi peptide của protein đang tổng hợp làm ức chế quá trình sinh tổng hợp protein của vi khuẩn (Schwarz *et al.*, 2004).

### **2.11.3 Cơ chế kháng florfenicol của vi khuẩn**

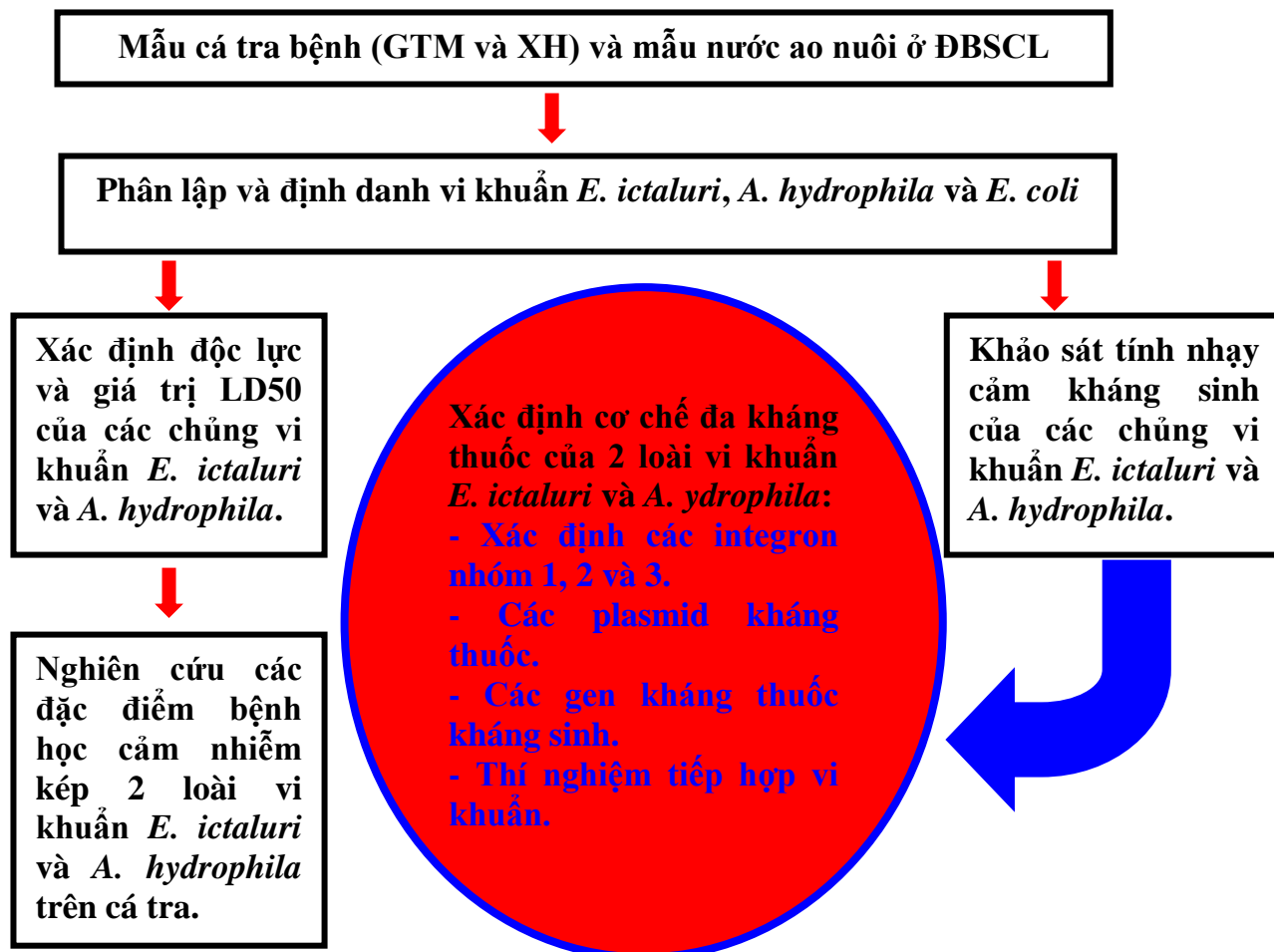
Việc sử dụng florfenicol trong thú y và NTTS trong thời gian qua đã làm xuất hiện nhiều loài vi khuẩn khác nhau trở nên kháng florfenicol như *Klebsiella pneumoniae* (Cloeckart *et al.*, 2001), *Escherichia coli* (Keyes *et al.*, 2000; Cloeckart *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000), *Vibrio cholerae* (Hochhut *et al.*, 2001). Kết quả nghiên cứu về hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra của Nguyễn Thiện Nam và *ctv.* (2010) cũng cho thấy 77,5% vi khuẩn kháng với florfenicol.

Cho đến nay, cơ chế kháng florfenicol của vi khuẩn vẫn chưa được làm sáng tỏ. Tuy nhiên, các nhà khoa học đã xác định được 2 cơ chế có thể dẫn đến việc kháng chloramphenicol và florfenicol của vi khuẩn, đó là sự bất hoạt chloramphenicol bằng enzyme bởi quá trình gọi là acetyl hóa (acetylation) thông qua các chloramphenicol acetyltransferase khác nhau (Murray and Shaw, 1997) và do các bơm (chloramphenicol exporter) có tác dụng đẩy chloramphenicol và florfenicol ra khỏi tế bào vi khuẩn (Schwarz *et al.*, 2004). Gần đây, gen *floR* được xem là gen giúp vi khuẩn đề kháng lại với chloramphenicol và florfenicol (Schwarz *et al.*, 2004). Gen này mã hóa cho protein màng, protein này hoạt động như cái bơm để đẩy chloramphenicol và florfenicol từ bên trong tế bào vi khuẩn ra ngoài. Vì thế, không đủ lượng kháng sinh cần thiết để thể hiện hoạt tính đối với vi khuẩn (Kim and Aoki, 1996).

## Chương III. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 3.1 Nội dung nghiên cứu

Để đạt được các mục tiêu đề ra, đề tài thực hiện các nội dung của luận án theo sơ đồ mô tả (Hình 3.1) như sau:



Hình 3.1: Sơ đồ minh họa các nội dung nghiên cứu chính của luận án.

### 3.2 Phương tiện nghiên cứu

#### 3.2.1 Thời gian và địa điểm thí nghiệm

Thời gian: các thí nghiệm của luận án được thực hiện trong thời gian từ tháng 01/2013 đến tháng 04/2016.

Địa điểm thực hiện: đề tài được thực hiện tại phòng Sinh học Phân tử (Viện NC&PT Công nghệ Sinh học) và các phòng Thí nghiệm của Bộ môn Bệnh học Thủy sản (Khoa Thủy sản), trường Đại học Cần Thơ (ĐHCT).

#### 3.2.2 Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm

Tủ cấy vi sinh vật Totalstar AV-100 (Tây Ban Nha), tủ ủ vi sinh vật Incucell 55 (Đức), máy ly tâm Biofuge pico Heraeus D-37520 Osterode (Đức), bộ điện di một chiều BioRad (Mỹ), máy đọc và chụp hình gel Bio-Rad



Universal HoodII (Mỹ), máy PCR Perkin Elmer 9700 (Mỹ), kính hiển vi Olympus CHT (Nhật), máy đo pH để bàn (Eutech, Singapore), máy đúc khối Microm EC 350 (Đức), máy xử lý mẫu mô Tissue processing Microm STP 120 (Đức) và máy cắt mô microtome PR 50 (Nhật) và các dụng cụ khác.

### 3.2.3 Môi trường và hóa chất thí nghiệm

#### \* Môi trường và hóa chất phân lập, nuôi cấy và trừ vi khuẩn:

Môi trường TSA (Merck, Đức) hoặc BHI (Merck, Đức), GSP (Merck, Đức) dùng để phân lập vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

Môi trường MCK (Merck, Đức) dùng để phân lập và nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* và thực hiện thí nghiệm tiếp hợp.

Môi trường BHIB (Merck, Đức) hoặc TSB (tryptic soya broth, Merck, Đức) dùng để nhân sinh khối vi khuẩn.

#### \* Hóa chất dùng để khảo sát các đặc điểm sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn:

Que thử oxidase (Oxidase Test Strips, Merck, Đức) dùng để kiểm tra hoạt tính oxidase của vi khuẩn.

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , Merck, Đức) dùng để kiểm tra hoạt tính catalase của vi khuẩn.

Môi trường BA (blood agar, có bổ sung 5% máu cừu) (Merck, Đức) dùng để kiểm tra khả năng tan huyết (hemolytic activity) của vi khuẩn.

Môi trường oxidation/fermentation (môi trường O/F, Merck, Đức) dùng để kiểm tra khả năng lên men và oxid hóa đường glucose của vi khuẩn.

Bộ kit nhuộm Gram (Merck, Đức) vi khuẩn gồm các dung dịch: crystal violet (dung dịch I), iodine (dung dịch II), cồn: aceton (dung dịch III), safranin (dung dịch IV). Thành phần và cách chuẩn bị các dung dịch được trình bày chi tiết ở Phụ lục A1.

Bộ kit thương mại API 20E kit (BioMerieux, Pháp) định danh nhanh các vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *E. coli* sau khi phân lập.

\* **Hóa chất dùng để trích và trừ ADN vi khuẩn:** Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Tris-HCl, Himedia, Ấn Độ), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma, Mỹ), sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck, Đức), isoamylalcohol (Merck, Đức), ethanol (Merck, Đức), chloroform (Merck, Đức), cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB, Himedia, Ấn Độ), proteinase K (Fermentas, Mỹ), dung dịch TE (pH 8,0): Tris-HCl (10 mM) và EDTA (1mM).

\* **Hóa chất dùng để trích ADN vi khuẩn từ mẫu mô:** sử dụng bộ kit thương mại DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, Mỹ) để trích ADN vi khuẩn từ mẫu mô cá được cảm nhiễm 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

\* **Hóa chất dùng để thực hiện phản ứng PCR:** PCR Amplification Buffer GL Plus (PCR buffer, LifeTechnologies, Ấn Độ),  $MgCl_2$  25 mM (Fermentas, Mỹ), deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) gồm: dATP (100 mM), dTTP (100 mM), dCTP (100 mM) và dGTP (100 mM) (Fermentas, Mỹ), *Taq* DNA-polymerase (Fermentas, Mỹ), dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Đức).

Các loại môi (primer) dùng để nhận diện vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*; xác định các integron nhóm 1, 2 và 3; các gen kháng tetracycline (*tet* gene): *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* và *tet34* và gen kháng florfenicol (*floR* gene) do công ty Integrated DNA Technologies (IDT, Mỹ) tổng hợp.

\* **Hóa chất điện di sản phẩm PCR:** agarose (Merk, Đức), Tris-borate-acetate-EDTA (5X TBE Buffer: Tris base (0,445 M), boric acid (0,445 M) và EDTA (12,5 mM) (Fermentas, Mỹ), loading dye/loading buffer (Fermentas, Mỹ), ethidium bromide (EtBr, Merck, Đức) hoặc SafeView (Merck, Đức), các thang chuẩn ADN gồm 100 bp, 100 bp plus, 1 kbp (Fermentas, Mỹ) và thang chuẩn HyperLadder™ 1 kbp (Bioline, Anh) dùng để xác định kích thước các sản phẩm PCR và kích thước plasmid ở 2 loài vi khuẩn.

\* **Hóa chất dùng để nhuộm mẫu phết kính (nhuộm Wright-Giemsa):**

Dung dịch Wright gồm: bột Wright và methanol (Merck, Đức).

Dung dịch Giemsa gồm: bột Giemsa, glycerol và methanol (Merck, Đức).

Dung dịch pH 6,2-6,8 gồm: monobasic sodium phosphate ( $NaH_2PO_4$ ), dibasic sodium phosphate ( $Na_2HPO_4$ , Merck, Đức).

Dung dịch pH 6,2 gồm: acid citric ( $C_6H_8O_7$ ),  $Na_2PO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck, Đức).

Thành phần, nồng độ và cách pha dung dịch dung dịch Wright, Giemsa, pH 6,2-6,8 và dung dịch pH 6,2 được trình bày chi tiết ở Phụ lục A2.

\* **Hóa chất dùng để xử lý và nhuộm mẫu mô:**

Xylene, sáp ong, paraffin (Merck, Đức).

Dung dịch formol trung tính (Neutral buffered formalin, NBF) gồm: formol,  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  (Merck, Đức).

Dung dịch Harris's haematoxyline gồm: haematoxyline, alcohol, potassium alum, mercuric oxide, glacial acetic acid (Merck, Đức).

Dung dịch Eosin gồm: Eosin, Phloxine, ethanol, glacial acetic acid (Merck, Đức).

Dung dịch potassium acetate: potassium acetate (Merck, Đức) và nước cất.

Thành phần, nồng độ và cách pha các dung dịch NBF, Harris's haematoxyline, Eosin và dung dịch potassium acetate được trình bày chi tiết ở Phụ lục A3.

\* **Các kháng sinh đĩa dùng để thực hiện kháng sinh đồ:** amoxicillin (AMO/10 µg), ampicillin (AMP/10 µg), cefotaxime (CTX/30 µg), cefalexin (CFL/30 µg), chloramphenicol (CHL/30 µg), florfenicol (FFC/30 µg), ciprofloxacin (CIP/5 µg), enrofloxacin (ENR/5 µg), norfloxacin (NOR/5 µg), doxycycline (DOX/30 µg), tetracycline (TET/30 µg), gentamicin (GEN/10 µg), streptomycin (STR/10 µg), neomycin (NEO/30 µg) và trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT/1,25/23,75 µg). Tất cả các loại kháng sinh trên được mua từ hãng Oxoid của Anh.

\* **Hóa chất dùng để trích ADN plasmid vi khuẩn:** bộ kit trích plasmid vi khuẩn: ISOLATE II Plasmid Mini Kit (Bioline, Anh).

### 3.2.4 Vật liệu thí nghiệm

Mẫu cá tra nhiễm bệnh GTM và bệnh XH thu thập từ các ao nuôi ở 1 số tỉnh ĐBSCL dùng để phân lập vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Ngoài ra, 1 số mẫu cá bệnh và mẫu nước ao nuôi cá tra cũng được thu thập để phân lập vi khuẩn *E. coli* dùng trong các thí nghiệm tiếp hợp.

Cá tra giống (trọng lượng khoảng 12-20 g) dùng để thực hiện các thí nghiệm cảm nhiễm, gồm cảm nhiễm đơn và cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Cá được mua từ trại cá tra giống ở Hồng Ngự - Đồng Tháp và được thuần dưỡng ở trại thí nghiệm cảm nhiễm của khoa Thủy sản, ĐHTC.

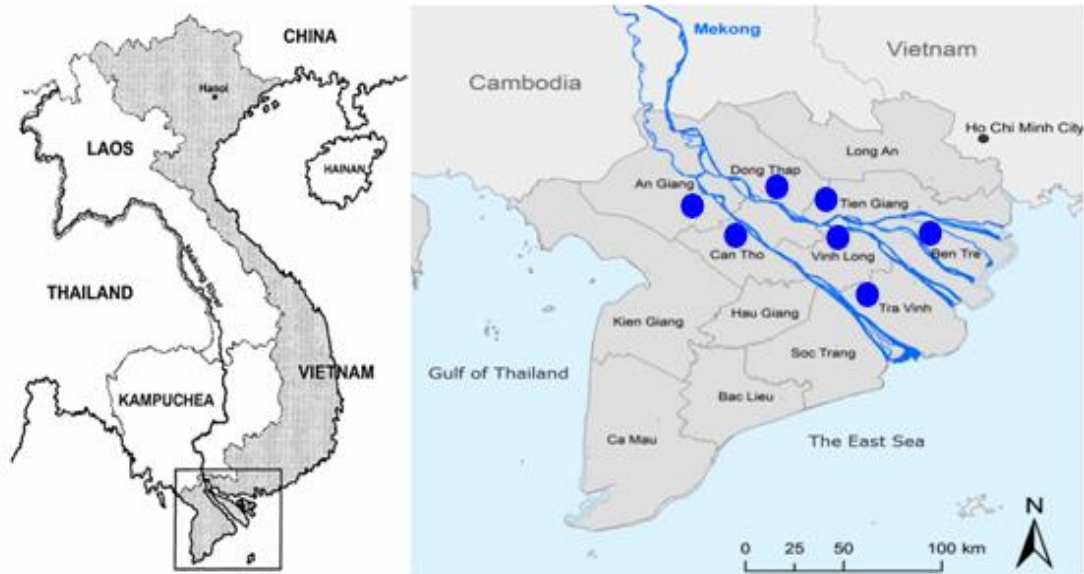
Chủng vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 dùng để làm đối chứng phương pháp thực hiện kháng sinh đồ.

## 3.3 Phương pháp nghiên cứu

### 3.3.1 Địa điểm và phương pháp thu mẫu cá tra bệnh

Cá tra có biểu hiện bệnh GTM (cá bệnh có các đốm trắng nhỏ li ti trên gan, thận và tỳ tạng) và bệnh XH (XH 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 2 loại bệnh trên được thu ở các ao nuôi cá tra. Mẫu cá bệnh được thu ở các tỉnh của ĐBSCL như An Giang, Đồng Tháp, Tp. Cần Thơ, Vĩnh Long, Bến

Tre, Trà Vinh và Tiền Giang (Hình 3.2). Mỗi ao nuôi thu từ 3-4 cá bệnh với trọng lượng cá dao động từ 22 đến 700 g/con. Để phân lập vi khuẩn *E. ictaluri*, nghiên cứu đã thu 125 mẫu cá tra (gồm 90 mẫu cá có dấu hiệu bệnh GTM và 35 mẫu cá nhiễm kép bệnh GTM và XH) và 130 mẫu cá bệnh (gồm 95 mẫu cá bệnh XH và 35 mẫu cá nhiễm kép bệnh GTM và XH) để phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*. Ngoài ra, trong quá trình thu mẫu phân lập 2 loài vi khuẩn trên có kết hợp thu mẫu nước ao nuôi cá tra để phân lập vi khuẩn *E. coli* (mẫu nước được thu bằng cách ở mỗi ao nuôi chọn 1-2 vị trí và cho nước vào chai nhựa tiệt trùng). Thông tin về số mẫu cũng như địa điểm thu mẫu được trình bày chi tiết ở Phụ lục B và Phụ lục J1, J2 và J3. Mẫu cá có thể được giải phẫu, cấy vi khuẩn trực tiếp tại địa điểm thu mẫu hoặc được cho vào trong thùng đá (có sục khí) và mang về phòng thí nghiệm để tiến hành công tác phân lập vi khuẩn. Mẫu cá bệnh được thu ở các thời điểm khác nhau trong vụ nuôi cho đến khi phân lập được số chủng vi khuẩn cần thiết cho thí nghiệm (phân lập được 120 chủng, gồm 60 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và 60 chủng vi khuẩn *A. hydrophila*).



Hình 3.2: Các địa điểm thu mẫu cá tra công nghiệp ở vùng ĐBSCL (● : địa điểm thu mẫu).

### 3.3.2 Phân lập và định danh vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

#### 3.3.2.1 Phân lập vi khuẩn

Vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được phân lập từ các cơ quan như gan, thận và tỳ tạng của cá tra bệnh dựa theo tài liệu hướng dẫn của Frerich and Millar (1993). Các bước phân lập được thực hiện như sau:

### **a) Phân lập vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

Lau sạch chất nhầy trên da cá và sử dụng cồn 70° tiệt trùng bên ngoài cơ thể cá. Dùng kéo tiệt trùng tiến hành giải phẫu cá. Dùng dao mổ rạch 1 đường nhỏ trên thận (hoặc gan và tỳ tạng). Đặt que cấy đã tiệt trùng vào nơi vừa rạch, xoay nhẹ để lấy mẫu bệnh phẩm và cấy lên môi trường TSA. Sau đó, các đĩa được ủ trong tủ ủ từ 36-48 giờ ở 28°C. Tiến hành cấy chuyển nhiều lần các khuẩn lạc nghi ngờ trên môi trường TSA và kiểm tra độ rỗng (thuần) của các chủng vi khuẩn phân lập trên kính hiển vi quang học. Các chủng vi khuẩn sau khi tách khuẩn lạc thuần sẽ được trữ trong môi trường BHIB (brain heart infusion broth) chứa glycerol 20% ở nhiệt độ -80°C. Trong khi đó, các bước phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* được thực hiện tương tự như phân lập vi khuẩn *E. ictaluri*. Vi khuẩn *A. hydrophila* cũng được phân lập trên môi trường TSA từ các cơ quan như gan, thận và tỳ tạng của cá tra bệnh. Tuy nhiên, thời gian ủ vi khuẩn từ 18-36 giờ ở 28°C.

### **b) Phân lập vi khuẩn *E. coli***

Nghiên cứu sử dụng các mẫu cá bệnh (n=10) và mẫu nước ao nuôi cá tra (n=10) để phân lập vi khuẩn *E. coli* trên môi trường MCK dựa theo phương pháp của Samuel *et al.* (2011) bằng cách cấy ria trực tiếp mẫu ruột cá và mẫu nước lên môi trường phân lập (trường hợp cần thiết có thể pha loãng mẫu). Sau đó, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian khoảng 24 giờ. Sau 24 giờ ủ, khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* có màu tím, tiến hành giai đoạn cấy chuyển và trữ glycerol mẫu vi khuẩn thuần để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

Các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa cơ bản của vi khuẩn *E. coli* được kiểm tra và thực hiện tương tự như *A. hydrophila* và *E. ictaluri* được trình bày trong mục 3.3.2.2a&b. Đối với vi khuẩn *E. coli* thì nghiên cứu không sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử mà chỉ sử dụng bộ kit API 20E để định danh vi khuẩn do chúng được phân lập trên môi trường chuyên biệt và khuẩn lạc vi khuẩn cũng có màu sắc đặc trưng (Zinnah *et al.*, 2007). Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập sẽ được kiểm tra kháng sinh đồ (phương pháp thực hiện tương tự mục 3.3.5.1) với 15 loại kháng sinh (mục 3.3.5.1) nhằm chọn được chủng vi khuẩn cần thiết cho các thí nghiệm tiếp hợp. Ngoài ra, vi khuẩn được chọn để tiếp hợp cũng được kiểm tra sự hiện diện của các integron nhóm 1, 2 và 3, các gen kháng sulfonamide (*sul1*, *sul2* và *sul3*), gen kháng tetracycline, florfenicol và các plasmid (phương pháp thực hiện tương tự các mục 3.3.6.1, 3.3.6.3 và 3.3.6.4).

### 3.3.2.2 Phương pháp định danh vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

#### a) Kiểm tra các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của 2 loài vi khuẩn

Tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sau khi tách khuẩn lạc thuần sẽ được kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa cơ bản như hình dạng, màu sắc, kích thước khuẩn lạc, hình dạng tế bào (được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Phụ lục C1), khả năng chuyển động (Phụ lục C2), các phản ứng oxidase, catalase, phản ứng O/F (Phụ lục C3) và khả năng tan huyết của vi khuẩn (Phụ lục C4). Các chỉ tiêu này được thực hiện theo cẩm nang của Cowan và Steel (Barrow and Feltham, 1993) và tài liệu hướng dẫn của Buller (2004). Ngoài ra, các đặc điểm sinh hóa quan trọng khác của 2 loài vi khuẩn (gồm 6 chủng *E. ictaluri* và 6 chủng *A. hydrophila*) cũng được kiểm tra bằng bộ kit thương mại API 20E (Phụ lục C5) nhằm mục đích định danh vi khuẩn được chính xác. Bên cạnh đó, 1 số chủng vi khuẩn (gồm 4 chủng *E. ictaluri* và 4 chủng *A. hydrophila* được chọn để cảm nhiễm) còn được gửi chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope, SEM) tại phòng Thí nghiệm Chuyên sâu của trường ĐHTC. Mẫu vi khuẩn sau khi được làm thuần sẽ được cố định trên lam kính giống như cách chuẩn bị tiêu bản trong phương pháp nhuộm Gram vi khuẩn (Phụ lục C1) hoặc có thể gửi các đĩa cấy có khuẩn lạc thuần để chụp SEM.

#### b) Định danh vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự

Tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (n=67) và *A. hydrophila* (n=74) sau khi phân lập sẽ được định danh bằng kỹ thuật PCR. Vi khuẩn dùng để trích ADN được nuôi trong môi trường TSB hoặc môi trường BHIB, ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng trên máy lắc (110 vòng/phút). Sau đó, tiến hành trích ADN vi khuẩn theo phương pháp của Neumamn *et al.* (1992). Các bước thực hiện được trình bày chi tiết ở Phụ lục D. ADN ly trích từ 2 loài vi khuẩn sẽ được trữ ở nhiệt độ -20°C trước khi sử dụng.

Sử dụng cặp mồi Edi-F: 5'CAG ATG AGC GGA TTT CAC AG 3' và Edi-R: 5' CGC GCA ATT AAC ATA GAG CC3' (Sakai *et al.*, 2009) để khuếch đại vùng đầu nguồn (upstream region) của gen bám dính (fimbrial gene) ở vi khuẩn *E. ictaluri* với kích thước là 470 bp. Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 25 µL gồm các thành phần sau: dung dịch đệm 1X PCR; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM dNTPs; 2U *Taq* DNA polymerase; 20 pmol mồi xuôi (Edi-F); 20 pmol mồi ngược (Edi-R); DMSO (1%) và 20-40 ng ADN mẫu. Chu kỳ và các điều kiện thực hiện phản ứng PCR dựa theo qui trình của Sakai *et al.* (2009) có cải biên và hiệu chỉnh gồm các bước sau: biến tính ban

đầu ở 95°C trong 5 phút. Sau đó thực hiện 40 chu kỳ gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 65°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 60 giây và giai đoạn kéo dài sau cùng ở 72°C trong 10 phút. Trong khi đó, cặp mồi AeroFd: 5'CCA AGG GGT CTG TGG CGA CA 3' và AeroRs: 5' TTT CAC CGG TAA CAG GAT TG 3' (Pollard *et al.*, 1990) được sử dụng để khuếch đại vùng đặc hiệu trên gen aerolysin của vi khuẩn *A. hydrophila* với kích thước là 209 bp. Thể tích và thành phần phản ứng PCR dùng để định danh vi khuẩn *A. hydrophila* gồm dung dịch đệm 1X PCR; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM dNTPs; 2U *Taq* DNA polymerase; 20 pmol mồi xuôi (AeroFd); 20 pmol mồi ngược (AeroRs); DMSO (1%) và 20-40 ng ADN mẫu. Tuy nhiên, chu kỳ và các điều kiện thực hiện phản ứng PCR dựa theo qui trình của Pollard *et al.* (1990) có cải biên và hiệu chỉnh gồm các bước sau: biến tính ban đầu ở 95°C trong 4 phút. Sau đó thực hiện 30 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 60°C trong 45 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây và kéo dài sau cùng ở 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 1X ở 95V với thời gian từ 30-45 phút. Kết quả điện di được đọc và chụp gel trên máy BioRad UV 2000 (Hoa Kỳ). Căn cứ vào thang ADN chuẩn 100 bp hoặc 100 bp plus để xác định kích thước đoạn ADN của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* cần xác định. Chọn 1 số chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (n=12) và *A. hydrophila* (n=12) đại diện cho 1 số tỉnh ở ĐBSCL để giải trình tự tại công ty Macrogen, Hàn Quốc ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Kết quả giải trình tự các chủng vi khuẩn được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information)([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) bằng chương trình BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) để định danh chúng kết hợp với kết quả khảo sát các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa truyền thống và bộ kit API 20E.

### **3.3.3 Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

#### **3.3.3.1 Chuẩn bị thí nghiệm**

Cá tra giống: cá dùng để thí nghiệm có trọng lượng khoảng 12-20 g/con. Cá mua về được nuôi thuần dưỡng khoảng 1-2 tuần trong bể nhựa có thể tích khoảng 500-1000 L có sục khí và cho ăn hằng ngày theo nhu cầu. Trước khi bố trí thí nghiệm, bắt ngẫu nhiên 10-15 cá để kiểm tra vi khuẩn (thực hiện tương tự như mục 3.3.2.1) và KST (thực hiện theo tài liệu hướng dẫn của Hà Ký và Bùi Quang Tề (2007) và Noga (2010), chi tiết được trình bày ở Phụ lục E) nhằm lựa chọn được cá khỏe và không nhiễm bệnh.

### 3.3.3.2 Chuẩn bị vi khuẩn gây cảm nhiễm

Bốn chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (1ED3, 3ED3, 8ED3 và 10ED3) và 4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (1A3, 2A3, 4A3 và 5A3) đại diện cho 1 số tỉnh nuôi khác nhau ở ĐBSCL và nguồn gốc vi khuẩn phân lập trên cá nhiễm bệnh (Bảng 3.1) được chọn để xác định độc lực và khả năng gây bệnh của chúng trên cá tra. Trước khi tiến hành thí nghiệm, các chủng vi khuẩn được phục hồi (nếu trữ bằng glycerol) trên môi trường TSA, kiểm tra lại độ thuần và các chỉ tiêu cơ bản như nhuộm Gram, hoạt tính oxidase và catalase, phản ứng O/F và các đặc điểm sinh lý, sinh hóa bằng bộ kit API 20E (kết quả này không trình bày lại trong luận án). Sau đó, vi khuẩn được phục hồi độc lực bằng cách tiêm vi khuẩn cho cá từ 2-3 lần (số liệu này không trình bày trong luận án này).

Bảng 3.1: Thông tin các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được chọn thí nghiệm cảm nhiễm.

TT	Chủng vi khuẩn	Nguồn gốc	Mẫu cá tra bệnh
1	1ED3*	Tp. Cần Thơ	Cá bệnh GTM
2	3ED3	Trà Vinh	Cá bệnh GTM và XH
3	8ED3	Đồng Tháp	Cá bệnh GTM và XH
5	10ED3	Vĩnh Long	Cá bệnh GTM
5	1A3	Trà Vinh	Cá bệnh GTM và XH
6	2A3	Vĩnh Long	Cá bệnh XH
7	4A3*	Đồng Tháp	Cá bệnh GTM và XH
8	5A3	Tp. Cần Thơ	Cá bệnh XH

\* Các chủng vi khuẩn được chọn bố trí thí nghiệm cảm nhiễm kép.

Sau khi phục hồi độc lực, vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong 20-25 mL môi trường BHIB và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng trên máy lắc 110 vòng/phút. Vi khuẩn được ly tâm 4.000-6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu sinh khối tế bào. Sau đó, vi khuẩn được rửa qua nước muối sinh lý (NaCl 0,85%) 3 lần và đo mật số bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm ( $OD = 1 \pm 0,1$  tương ứng với mật số của vi khuẩn *E. ictaluri* là  $10^9$  CFU/mL, còn đối với vi khuẩn *A. hydrophila* là  $10^8$  CFU/mL) (Crumlish *et al.*, 2010). Dịch vi khuẩn sau đó được pha loãng thành các mật số  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  và  $10^6$  CFU/mL để tiêm cho cá.

### 3.3.3.3 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 42 nghiệm thức (NT), bao gồm: 40 NT tiêm vi khuẩn (mỗi chủng vi khuẩn tiêm 5 nồng độ:  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  và  $10^6$  CFU/cá) và 2 NT đối chứng (NT tiêm và không tiêm nước muối sinh lý NaCl 0,85%). Mỗi NT lặp lại 3 lần với mật độ 10 con/bể và cá thí nghiệm được tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn/cá ở xoang bụng. Như vậy, tổng số cá được sử dụng để bố trí thí nghiệm là 1260 con.



### 3.3.3.4 Cách xác định liều gây chết 50% cá thí nghiệm

Liều gây chết 50% cá thí nghiệm ( $LD_{50}$ , lethal dose) của 2 loại vi khuẩn trong thí nghiệm được xác định theo công thức của Reed and Muench (1938) như sau:  $LD_{50} = 10^{a-p \times d}$  với  $pd = (L\% - 50\%)/(L\% - H\%)$ , trong đó a: số lữ thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (trên 50%); H: tỷ lệ cá chết cao nhất (dưới 50%) và L: tỷ lệ cá chết thấp nhất (trên 50%).

### 3.3.4 Nghiên cứu đặc điểm bệnh học cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra

#### 3.3.4.1 Bố trí thí nghiệm cảm nhiễm kép 2 loại vi khuẩn trên cá tra

Từ kết quả của các thí nghiệm cảm nhiễm đơn, 2 chủng vi khuẩn 1ED3 và 4A3 có độc lực cao nhất với giá trị  $LD_{50}$  lần lượt là  $1,58 \times 10^4$  và  $1,29 \times 10^3$  CFU/mL được chọn để gây cảm nhiễm kép trên cá tra. Các bước tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm kép được thực hiện tương tự như phương pháp cảm nhiễm đơn. Thí nghiệm cảm nhiễm kép được thực hiện qua 2 phương pháp ngâm và tiêm vi khuẩn (Hình 3.3). Trong phương pháp ngâm, thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 NT (mỗi NT được lặp lại 3 lần với mật số 10 con/bể) gồm: 2 NT đối chứng (ngâm và không ngâm cá tra trong dung dịch nước muối sinh lý NaCl 0,85%), 3 NT ngâm (2 NT ngâm đơn và 1 NT ngâm kép) cá trong dung dịch chứa 2 chủng vi khuẩn 1ED3 và 4A3 với mật số lần lượt là  $10^6$  và  $10^5$  CFU/mL (Hình 3.3). Thời gian ngâm cá tra trong dung dịch vi khuẩn ở các NT trên khoảng 30-60 phút. Sau đó, cá sẽ được phân phối vào các xô nhựa (60 L) có sục khí để theo dõi thí nghiệm.

Trong khi đó, ở phương pháp tiêm thì thí nghiệm cũng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 7 NT (mỗi NT cũng được lặp lại 3 lần với mật số 10 con/bể) gồm: 2 NT đối chứng tiêm và không tiêm nước muối sinh lý NaCl 0,85% (cá ở NT tiêm nước muối sinh lý được tiêm 2 lần) và 5 NT tiêm vi khuẩn ở các thời điểm tiêm khác nhau (bao gồm 1 NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* trước 12 giờ tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*, 1 NT tiêm cùng lúc vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* và 3 NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau 24, 48 và 72 giờ tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*). Mật số vi khuẩn *A. hydrophila* (chủng 4A3) và *E. ictaluri* (chủng 1ED3) sử dụng trong tất cả các NT tiêm trên là  $10^3$  và  $10^4$  CFU/cá. Như vậy, tổng số NT trong thí nghiệm cảm nhiễm kép của 2 phương pháp ngâm và tiêm là 12 NT và số cá sử dụng để bố trí thí nghiệm là 360.

#### 3.3.4.2 Các chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm cảm nhiễm đơn và kép

Sau khi gây cảm nhiễm biểu hiện của cá ở tất cả các NT nhiễm đơn và kép được theo dõi liên tục trong 14 ngày (thời gian quan sát này dựa theo các thí nghiệm cảm nhiễm trên 2 loài vi khuẩn này đã được thực hiện bởi các

ngiên cứu trước đây). Tất cả cá vừa mới chết hoặc có dấu hiệu lơ đờ, bơi lội kém linh hoạt được thu lấy để ghi nhận thời gian vi khuẩn gây bệnh, dấu hiệu biểu hiện bệnh (bên ngoài và bên trong cơ thể), tỷ lệ cá chết, tái phân lập và định danh vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*, thực hiện phết kính mẫu tươi (nhuộm Wright-Giemsa) với số mẫu là n=180 và thu mẫu mô (nhuộm Haematoxylin và Eosin, H&E) ở 5 cơ quan cá bệnh là mô da-cơ, mang, gan, thận và tỳ tạng với số mẫu là n=180 (cá ở các NT cảm nhiễm đơn không thu mẫu mô và 1 số mẫu cá bệnh (n= 120) được thực hiện phết kính mẫu tươi). Ngoài ra, các chỉ tiêu môi trường như nhiệt độ và pH cũng được theo dõi 2 lần/ngày (buổi sáng lúc 6 giờ và buổi chiều lúc 5 giờ) trong 14 ngày sau khi cảm nhiễm vi khuẩn (đo trực tiếp bằng máy đo pH để bàn) tại địa điểm cảm nhiễm vi khuẩn).

#### **a) Phương pháp tái phân lập và định danh vi khuẩn**

Tất cả cá lơ đờ hoặc vừa mới chết ở các NT thí nghiệm (bao gồm NT đối chứng) đều được giải phẫu để tái phân lập vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ các cơ quan như gan, thận và tỳ tạng của cá sau khi cảm nhiễm (phương pháp thực hiện tương tự mục 3.3.2.1a). Các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa; việc tái định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E và kỹ thuật PCR được thực hiện tương tự mục 3.3.2.2a&b. Mẫu ADN vi khuẩn được sử dụng trong phản ứng PCR gồm mẫu ADN được trích từ khuẩn lạc vi khuẩn tái phân lập từ cá bệnh và từ mô gan hoặc thận cá (bao gồm cá nhiễm đơn và kép) sau khi cảm nhiễm. Phương pháp trích ADN từ khuẩn lạc vi khuẩn thì được thực hiện tương tự mục 3.3.2.2b (Phụ lục D), trong khi ADN vi khuẩn trích từ mẫu mô thì được thực hiện bằng bộ kit thương mại DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, Mỹ). Quy trình thực hiện dựa theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được trình bày chi tiết ở Phụ lục F.

Vi khuẩn sau khi cảm nhiễm từ các mẫu mô sẽ được phát hiện bằng kỹ thuật duplex-PCR dựa theo phương pháp của Panangala *et al.* (2007) và Lê Hữu Thôi và *ctv.* (2010) có hiệu chỉnh và bổ sung. Đối với phương pháp duplex-PCR phát hiện đồng thời 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* thì được thực hiện tương tự như kỹ thuật PCR sử dụng trong phần định danh vi khuẩn ở mục 3.3.2.2b. Tuy nhiên, điểm khác biệt trong phương pháp duplex-PCR là sử dụng cùng lúc 2 cặp mồi và 2 mẫu ADN của vi khuẩn để phát hiện vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* thay vì kỹ thuật PCR thường chỉ sử dụng duy nhất 1 cặp mồi và 1 mẫu ADN của vi khuẩn khi thực hiện phản ứng khuếch đại đoạn gen cần tìm. Phản ứng duplex-PCR cũng được thực hiện trong thể tích 25 hoặc 50  $\mu$ L với các thành phần sau dịch đệm 1X PCR; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM dNTPs; 2U *Taq* DNA polymerase; 20 pmol mồi xuôi

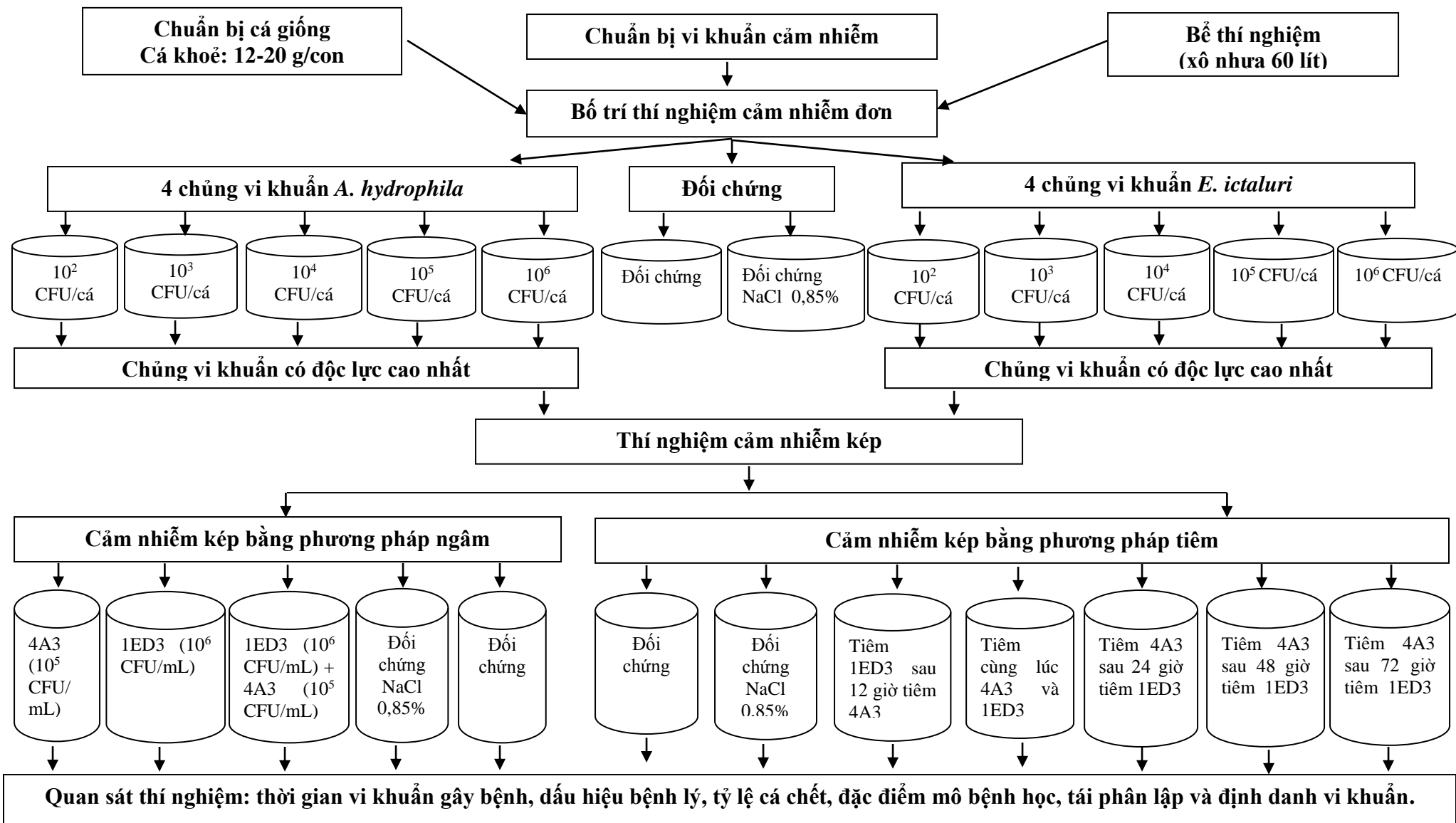
(Edi-F và AeroFd); 20 pmol mỗi ngược (Edi-R và AeroRs); DMSO (1%) và ADN mẫu vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Chu kỳ và các điều kiện thực hiện phản ứng duplex-PCR gồm các bước sau: biến tính ban đầu ở 95°C trong 4-5 phút. Sau đó thực hiện 30-35 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 60°C-62°C trong 45 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây đến 1 phút và kéo dài sau cùng ở 72°C trong 10 phút.

#### **b) Phương pháp phết kính mẫu tươi**

Dùng dao cắt 1 phần nhỏ mẫu da-cơ, mang, gan, thận và tỳ tạng cá và phết nhẹ lên lame sạch. Để khô tự nhiên, sau đó cố định lame bằng dung dịch methanol trong 1 phút và nhuộm Wright-Giemsa theo phương pháp của Chinabut (1991). Cho lame mẫu vào dung dịch Wright trong 3-5 phút. Chuyển mẫu sang dung dịch pH 6,2-6,8 từ 5-6 phút. Sau đó cho vào dung dịch Giemsa trong 20-30 phút. Tiếp tục cho mẫu vào dung dịch pH 6,2 từ 15-30 phút. Rửa sạch mẫu bằng nước cất, để khô tự nhiên. Quan sát và đọc kết quả dưới kính hiển vi ở vật kính 100X.

#### **c) Phương pháp mô học**

Các mẫu da-cơ, mang, gan, thận và tỳ tạng của cá lờ đờ từ các NT cảm nhiễm kép và cá từ NT đối chứng được thu và cố định trong dung dịch formol trung tính 10% (NBF, neutral buffered formalin). Sau 24 giờ, tiến hành rửa và trữ mẫu trong cồn 70% cho đến khi phân tích mô học. Các bước cắt và nhuộm mô được trình bày chi tiết ở Phụ lục G. Mẫu được xử lý qua 3 giai đoạn: loại nước, làm trong mẫu và tẩm paraffin. Sau đó mẫu được đúc khối, cắt lát với độ dày từ 4-6  $\mu\text{m}$  và nhuộm H&E (Ferguson, 2006). Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi quang học lần lượt ở 10X, 20X, 40X và 100X. Sau cùng, đọc kết quả và chụp hình tiêu bản đặc trưng ở độ phóng đại thích hợp.



Hình 3.3: Sơ đồ minh họa phương pháp bố trí thí nghiệm cảm nhiễm đơn và cảm nhiễm kép các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra.

### 3.3.5 Xác định tính nhạy cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và vi khuẩn *A. hydrophila*

#### 3.3.5.1 Phương pháp thực hiện kháng sinh đồ

Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được xác định bằng phương pháp đĩa khuếch tán (disk diffusion assay) của Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966) trên môi trường thạch TSA/MHA dựa theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Trong nghiên cứu này, 15 loại kháng sinh được chọn để thực hiện kháng sinh đồ với tất cả các chủng của 2 loài vi khuẩn trên gồm: amoxicillin (AMO/10 µg), ampicillin (AMP/10 µg), cefotaxime (CTX/30 µg), cefalexin (CFL/30 µg), chloramphenicol (CHL/30 µg), florfenicol (FFC/30 µg), ciprofloxacin (CIP/5 µg), enrofloxacin (ENR/5 µg), norfloxacin (NOR/5 µg), doxycycline (DOX/30 µg), tetracycline (TET/30 µg), gentamicin (GEN/10 µg), streptomycin (STR/10 µg), neomycin (NEO/30 µg) và trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT/1,25/23,75 µg) (Oxoid, Anh). Các bước tiến hành thí nghiệm như sau:

Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn: dùng que cấy tiệt trùng lấy khuẩn lạc cho vào ống nghiệm chứa 5 mL nước muối sinh lý NaCl 0,85% đã tiệt trùng. Trộn đều và so sánh độ đục với ống McFarland số 3 (9,7 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% và 0,3 mL 1% BaCl<sub>2</sub>). Nếu độ đục ngang bằng với ống chuẩn McFarland thì mật số vi khuẩn trong ống nghiệm khoảng  $9 \times 10^8$  CFU/mL. Dùng pipet tiệt trùng hút lần lượt 0,1 mL dung dịch vi khuẩn cho lên môi trường thạch TSA và trải đều vi khuẩn đến vừa khô. Để yên khoảng 1 phút rồi dùng pel tiệt trùng lấy đĩa kháng sinh đặt vào đĩa petri sao cho khoảng cách giữa 2 tâm của đĩa thuốc kháng sinh khoảng 24 mm và khoảng cách giữa tâm đĩa kháng sinh với mép đĩa petri khoảng 10-15 mm. Mỗi đĩa thạch dán tối đa 6 đĩa kháng sinh. Sau khi hoàn tất việc dán đĩa thuốc kháng sinh thì đặt đĩa vào tủ ấm ở 28-30°C.

Đọc kết quả: sau 24-48 giờ, trên bề mặt đĩa thạch xuất hiện các vòng tròn không có vi khuẩn phát triển (vòng vô khuẩn). Đo đường kính vòng vô khuẩn và dựa theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) để xác định tính kháng (resistant, R), nhạy trung bình (intermediate, I) và nhạy cảm (susceptible, S) của vi khuẩn đối với các loại kháng sinh (Phụ lục H).

#### 3.3.5.2 Chỉ số đa kháng MAR (multiple antibiotic resistance index)

Chỉ số đa kháng của 2 loài vi khuẩn ở các tỉnh được xác định dựa trên công thức của Krumperman (1983). Công thức xác định chỉ số đa kháng (MAR) được tính như sau:  $MAR = X/(Y \times Z)$ , trong đó: X = tổng số kháng sinh vi khuẩn

kháng ở mỗi tỉnh; Y = tổng số kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu và Z = tổng số chủng vi khuẩn ở mỗi tỉnh. Giá trị MAR > 0,2 cho thấy kháng sinh được sử dụng thường xuyên, còn giá trị MAR ≤ 0,2 cho thấy kháng sinh ít hoặc không bao giờ được sử dụng trong ao nuôi cá tra.

### **3.3.6 Xác định các đặc điểm phân tử liên quan đến sự đa kháng thuốc ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

#### **3.3.6.1 Khảo sát sự hiện diện của các integron nhóm 1, 2 và 3**

Các integron nhóm 1, 2 và 3 ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong nghiên cứu này được xác định bằng 3 cặp mồi sau: cặp mồi Int1F/Int1R (Koeleman *et al.*, 2001) mã hóa cho gen integrase của các integron 1 (*IntI1*), cặp mồi RB201/RB202 (Barlow *et al.*, 2004) mã hóa gen integrase của các integron 2 (*IntI2*) và cặp mồi Int3F/Int3R (Mazel *et al.*, 2000) mã hóa gen integrase của các integron 3 (*IntI3*) (Bảng 3.2 và Hình 3.4). Thành phần phản ứng PCR chung để phát hiện 3 nhóm integron trên gồm: dịch đệm 1X PCR; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM dNTPs; 2U *Taq* DNA polymerase; 10 pmol mồi xuôi (Int1F/RB201/Int3F); 10 pmol mồi ngược (Int1R/RB202/Int3R); DMSO (1%) và 20-40 ng ADN mẫu vi khuẩn *E. ictaluri/A. hydrophila*. Chu kỳ và các điều kiện khuếch đại các gen *IntI1*, *IntI2* và *IntI3* được thực hiện như Bảng 3.2. Sản phẩm PCR được khuếch đại với cặp mồi Int1F/Int1R, RB201/RB202 và Int3F/Int3R có kích thước lần lượt là 160, 393 và 979 bp. Việc xác định các integron nhóm 1, 2 và 3 được thực hiện ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* với số chủng lần lượt là n= 67 và n= 74. Ngoài ra, gen integrase của các integron 1 cũng được xác nhận lại bằng giải trình tự gen với số mẫu được chọn là n= 6 (gồm 3 mẫu từ vi khuẩn *E. ictaluri* và 3 mẫu từ vi khuẩn *A. hydrophila*), trong khi đó các gen integrase của các integron 2 và 3 âm tính nên không có sản phẩm PCR để gửi mẫu giải trình tự.

#### **3.3.6.2 Khảo sát và giải trình tự vùng gen cassette của các integron nhóm 1 và 2**

Để khuếch đại vùng gen cassette của các integron nhóm 1, nghiên cứu sử dụng cặp mồi Hep58/Hep59 của Lévesque *et al.* (1995). Trong khi đó, cặp mồi Hep 74/Hep 51 (White *et al.*, 2000) được sử dụng để khuếch đại vùng gen cassette của các integron nhóm 2. Trình tự nucleotide của 2 cặp mồi, chu kỳ và các điều kiện thực hiện phản ứng PCR được trình bày chi tiết ở Bảng 3.2. Vị trí khuếch đại các vùng gen cassette trên các integron nhóm 1 và 2 được thể hiện ở Hình 3.4. Thành phần phản ứng PCR chung để phát hiện vùng gen cassette của các integron nhóm 1 và 2 trên gồm: dịch đệm 1X PCR; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM dNTPs; 2U *Taq* DNA polymerase; 20 pmol mồi xuôi (Hep58/Hep 74); 20 pmol

mồi ngược (Hep59/Hep 51); DMSO (1%) và ADN mẫu vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* dương tính với các integron nhóm 1 và 2 sẽ được chọn để khảo sát vùng gen cassette, trong khi đó vùng gen cassette của các integron nhóm 3 thì cho đến nay chưa có tài liệu nào đề cập đến). Ngoài ra, tất cả sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen cassette (n= 54) sẽ được giải trình tự và so sánh với trình tự trên ngân hàng NCBI để xác định sự hiện diện của các gen cassette chèn vào các integron nhóm 1 và 2.

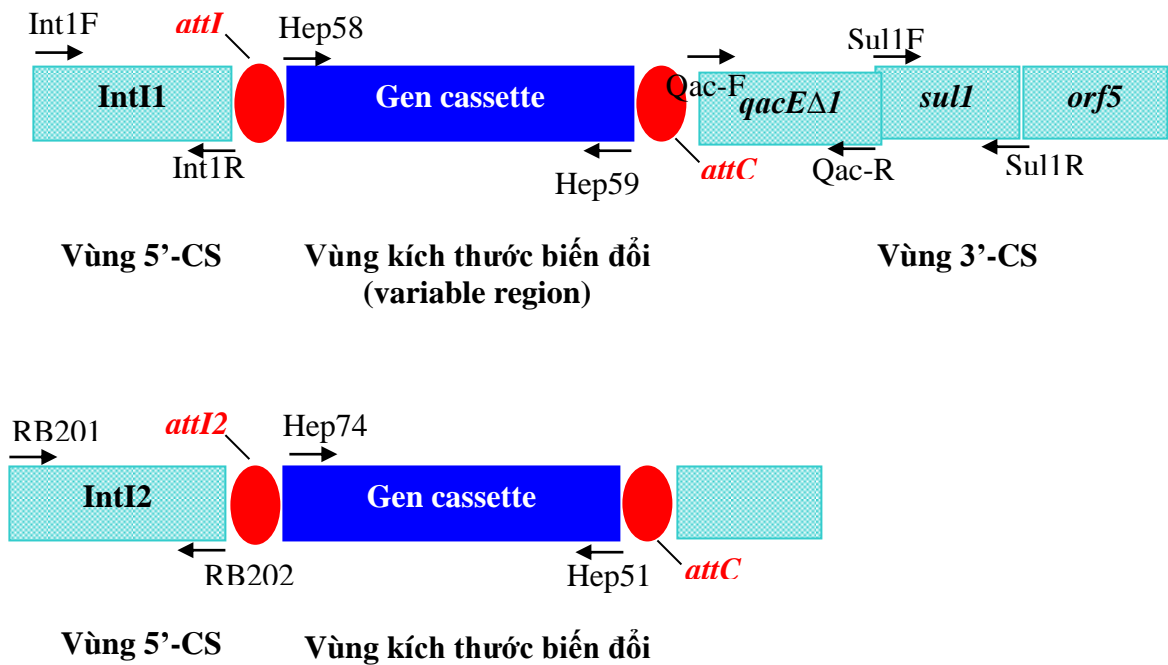
### 3.3.6.3 Khảo sát vùng 3'-CS của các integron nhóm 1

Các cặp mồi qac-F/qac-R khuếch đại gen *qacEAI1* và cặp mồi *Sul1-F/Sul1-R* khuếch đại gen *sul1* nằm ở vùng 3'-CS của các integron nhóm 1 được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR (Mazel *et al.*, 2000). Ngoài ra, các gen kháng sulfonamide khác như gen *sul2* (liên kết vùng 3'-CS của các integron nhóm 1) (Maynard *et al.*, 2003) và gen *sul3* (thường liên kết với các integron nhóm 1 mà không có vùng 3'-CS) (Perreten and Boerlin, 2003) cũng được khảo sát trong nghiên cứu này (Bảng 3.2). Trình tự nucleotide và chu kỳ thực hiện phản ứng PCR của các cặp mồi trên được trình bày chi tiết ở Bảng 3.2. Thành phần phản ứng PCR chung để phát hiện các gen *qacEAI1*, *sul1*, *sul2* và *sul3* gồm: dịch đệm 1X PCR; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM dNTPs; 2U *Taq* DNA polymerase; 10-20 pmol mồi xuôi (qac-F/Sul1-F/Sul2-F/Sul3-F); 10-20 pmol mồi ngược (qac-R/Sul1-R/Sul2-R/Sul3-R); DMSO (1%) và ADN mẫu vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* dương tính với các integron nhóm 1 (n=62) sẽ được chọn để khảo sát gen *qacEAI1*, gen *sul1* và gen *sul2*. Trong khi đó, các gen *sul3* chỉ được khảo sát từ các chủng vi khuẩn dương tính với các integron nhóm 1 mà không có vùng 3'-CS (n=20). Ngoài ra, sản phẩm PCR của các gen này cũng được xác nhận lại bằng giải trình tự với số lượng như sau: gen *qacEAI1* 4 mẫu (2 mẫu từ vi khuẩn *E. ictaluri* và 2 mẫu từ vi khuẩn *A. hydrophila*), gen *sul1* 4 mẫu (2 mẫu từ vi khuẩn *E. ictaluri* và 2 mẫu từ vi khuẩn *A. hydrophila*), gen *sul2* 4 mẫu (2 mẫu từ vi khuẩn *E. ictaluri* và 2 mẫu từ vi khuẩn *A. hydrophila*) và gen *sul3* 4 mẫu (2 mẫu từ vi khuẩn *E. ictaluri* và 2 mẫu từ vi khuẩn *A. hydrophila*).

### 3.3.6.4 Sự hiện diện của các plasmid kháng thuốc ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Các ADN plasmid của vi khuẩn *E. ictaluri* (n= 24) và *A. hydrophila* (n= 38) dương tính với các integron nhóm 1 được trích bằng bộ kit thương mại ISOLATE II Plasmid Mini Kit (Bioline, Anh). Các bước thực hiện dựa theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Phụ lục I). ADN plasmid của vi khuẩn sau khi ly trích sẽ được điện di trên gel agarose 0,7% trong thời gian 3-4 giờ. Dựa vào thang chuẩn

HyperLadder™ 1kb (kích thước dao động từ 0,2 kbp đến 10 kbp) để ước lượng kích thước các ADN plasmid vi khuẩn trong nghiên cứu.



Hình 3.4: Sơ đồ minh họa vị trí khuếch đại 1 số gen trên các integron nhóm 1 và 2.

### 3.3.6.5 Khảo sát sự hiện diện của 1 số gen kháng thuốc ở 2 loài vi khuẩn

Mười hai loại gen kháng tetracycline (*tet* gene, bao gồm *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* và *tet34*) đại diện cho các cơ chế kháng tetracycline khác nhau của vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này để xác định sự hiện diện của các gen kháng tetracycline từ các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Nghiên cứu chọn ngẫu nhiên 40 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (gồm 38 chủng dương tính với các integron nhóm 1) và 40 chủng *E. ictaluri* (bao gồm 24 chủng dương tính với các integron nhóm 1) có kiểu hình kháng tetracycline để xác định các gen kháng tetracycline. Bên cạnh đó, 1 số gen *tet* của 2 loài vi khuẩn sau khi thực hiện PCR được xác nhận lại bằng cách giải trình tự với số lượng như sau: gen *tetA* (n=4), *tetB* (n=4), *tetC* (n=4), *tetG* (n=4), *tetK* (n=4) và *tetS* (n=4). Mỗi loại gen *tet* trên được chọn từ 2 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* khi có kết quả dương tính. Ngoài ra, đề tài cũng xác định sự hiện diện của các gen kháng florfenicol (*floR* gene) thuộc nhóm phenicol ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* (n= 40) và *A. hydrophila* (n= 40). Một số chủng vi khuẩn dương tính với gen *floR* (*E. ictaluri*, n= 2 và *A. hydrophila*, n= 2) cũng được chọn để giải trình tự nhằm xác nhận lại tính chính xác của kết quả PCR. Bảng 3.3 và Bảng 3.4 trình bày trình tự các đoạn môi, điều kiện phản ứng PCR và



thành phần phản ứng PCR chung dùng để xác định 1 số gen kháng tetracycline và florfenicol của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Do trong nội dung nghiên cứu này có nhiều gen *tet* cần xác định nên không trình bày chi tiết thành phần phản ứng PCR cho từng gen.

### **3.3.6.6 Khảo sát khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* với vi khuẩn *E. coli***

Hai chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (chủng 1ED3 và 2ED4) và 2 chủng *A. hydrophila* (chủng 1A3 và 1A4) được chọn từ các chủng vi khuẩn có kiểu hình kháng tetracycline đóng vai trò như là chủng cho (donor) gen kháng thuốc để thực hiện thí nghiệm tiếp hợp với vi khuẩn *E. coli* (chủng ECR2 và ECR8) nhạy với kháng sinh tetracycline đóng vai trò như chủng nhận (recipient) gen kháng thuốc. Thí nghiệm khảo sát khả năng tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc giữa 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* với vi khuẩn *E. coli* được thực hiện trong môi trường lỏng dựa theo phương pháp của các tác giả Sorum *et al.* (2003) và Van *et al.* (2007), có hiệu chỉnh. Các bước tiến hành thí nghiệm như sau: tăng sinh chủng vi khuẩn cho gen kháng thuốc và chủng vi khuẩn nhận gen kháng thuốc trên môi trường BHIB (riêng chủng vi khuẩn kháng thuốc nuôi trong môi trường có bổ sung kháng sinh thích hợp) và ủ qua đêm. Sau đó, hút 1 mL môi trường nuôi vi khuẩn cho gen kháng thuốc trộn với 1 mL môi trường nuôi chủng vi khuẩn nhận gen kháng thuốc trong 10 mL môi trường nuôi, ủ từ 12-24 giờ. Sau đó, pha loãng hỗn hợp vi khuẩn thành các nồng độ  $10^1$  đến  $10^6$ , ở mỗi nồng độ hút 100 mL trải lên đĩa môi trường MCK được bổ sung kháng sinh tetracycline (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) như là 1 chỉ thị chọn lọc vi khuẩn sau khi tiếp hợp. Các khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* nhận gen kháng thuốc sau khi tiếp hợp (transconjugant) được chọn lọc từ môi trường có bổ sung kháng sinh tetracycline sẽ được kiểm tra lại kháng sinh đồ, sự hiện diện của các plasmid, các integron nhóm 1 và các gen kháng thuốc kháng sinh.

### **3.3.6.7 Nghiên cứu khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc giữa vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

Tương tự, khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc giữa các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* cũng được thực hiện trong môi trường lỏng theo phương pháp trình bày như trên. Trong thí nghiệm này, chọn 3 chủng *A. hydrophila* (27A3, 6A4 và 20A4) nhạy với tetracycline cho tiếp hợp lần lượt với 2 chủng *E. ictaluri* (chủng 1ED3 và 2ED4) kháng với tetracycline, ngược lại 2 chủng *E. ictaluri* (chủng 9ED3 và 11ED3) nhạy với tetracycline cho tiếp hợp lần lượt với 2 chủng *A. hydrophila* (chủng 1A3 và 2A4) kháng với tetracycline.

Bảng 3.2: Trình tự các cặp môi dùng để phát hiện các integron nhóm 1, 2 và 3

Tên môi	Gen mục tiêu	Trình tự môi (5' → 3')	Kích thước (bp)	Chu kỳ và điều kiện phản ứng	Tác giả
Int1F	integron 1	CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC	160	94°C-30 giây, 55°C-30 giây, 72°C-30 giây (35 chu kỳ)	Koeleman <i>et al.</i> (2001)
Int1R		CCC GAG GCA TAG ACT GTA			
RB201	integron 2	GCA AAC GCA AGC ATT CAT TA	393	94°C-30 giây, 62°C-30 giây, 72°C-45 giây (30 chu kỳ)	Barlow <i>et al.</i> (2004)
RB202		ACG GAT ATG CGA CAA AAA GG			
Int3F	integron 3	GCC TCC GGC AGC GAC TTT CAG	979	94°C-30 giây, 62°C-30 giây, 72°C-60 giây (30 chu kỳ)	Mazel <i>et al.</i> (2000)
Int3R		ACG GAT CTG CCA AAC CTG ACT			
Hep58	array class 1	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Variable*	94°C-1 phút, 55°C-1 phút, 72°C-5 phút (35 chu kỳ)	Lévesque <i>et al.</i> (1995)
Hep59		AAG CAG ACT TGA CCT GA			
Hep 74	array class 2	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGAT	Variable*	94°C-1 phút, 55°C-1 phút, 72°C-5 phút (35 chu kỳ)	White <i>et al.</i> (2000)
Hep 51		TTGTA GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG			
Qac-F	Gen <i>qacEΔ1</i>	GGC TGG CTT TTT CTT GTT ATC G	287	94°C-30 giây, 56°C-30 giây, 72°C-60 giây (30 chu kỳ)	Mazel <i>et al.</i> (2000)
Qac-R		TGA GCC CCA TAC CTA CAA AGC			
Sul1-F	<i>Sul1</i>	TGG TGA CGG TGT TCG GCA TTC	789	94°C-30 giây, 60°C-30 giây, 72°C-30 giây (30 chu kỳ)	Mazel <i>et al.</i> (2000)
Sul1-R		GCG AGG GTT TCC GAG AAG GTG			
Sul2-F	<i>Sul2</i>	CGG CAT CGT CAA CAT AAC C	722	94°C-1 phút, 50°C-1 phút, 72°C-5 phút (35 chu kỳ)	Maynard <i>et al.</i> (2003)
Sul2-R		GTG TGC GGA TGA AGT CAG			
Sul3-F	<i>Sul3</i>	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG	790	94°C-1 phút, 55°C-1 phút, 72°C-5 phút (30 chu kỳ)	Perreten and Boerlin (2003)
Sul3-R		CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA			

\* Kích thước sản phẩm thay đổi tùy thuộc các gen cassette chèn vào.

Bảng 3.3: Các đoạn mồi và điều kiện phản ứng PCR xác định các gen kháng tetracycline và florfenicol ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Tên mồi	Gen mục tiêu	Trình tự mồi (5' → 3')	Kích thước (bp)	Điều kiện và chu kỳ phản ứng PCR	Tác giả
tetA (F)	<i>tetA</i>	GTA ATT CTG AGC ACT GTC GC	957	95°C-30 giây, 62°C-30 giây, 72°C-45 giây (23 chu kỳ).	Schmidt <i>et al.</i> (2001a)
tetA (R)		CTG CCT GGA CAA CAT TGC TT			
tetB (F)	<i>tetB</i>	CTC AGT ATT CCA AGC CTT TG	436	95°C-30 giây, 59°C-30 giây, 72°C-20 giây (25 chu kỳ).	Schmidt <i>et al.</i> (2001a)
tetB (R)		CTA AGC ACT TGT CTC CTG TT			
tetC (F)	<i>tetC</i>	TCT AAC AAT GCG CTC ATC GT	589	95°C-30 giây, 62°C-30 giây, 72°C-30 giây (30 chu kỳ).	Schmidt <i>et al.</i> (2001a)
tetC (R)		GGT TGA AGG CTC TCA AGG GC			
tetD (F)	<i>tetD</i>	ATT ACA CTG CTG GAC GCG AT	1.124	95°C-30 giây, 59°C-30 giây, 72°C-20 giây (25 chu kỳ)	Schmidt <i>et al.</i> (2001a)
tetD (R)		CTG ATC AGC AGA CAG ATT GC			
tetE (F)	<i>tetE</i>	GTG ATG ATG GCA CTG GTC AT	1.268	95°C-30 giây, 62°C-30 giây, 72°C-45 giây (23 chu kỳ).	Schmidt <i>et al.</i> (2001a)
tetE (R)		CTC TGC TGT ACA TCG CTC TT			
tetG (F)	<i>tetG</i>	TTC AAG CCG GCT TGG AGA G	645	95°C-1 phút, 56°C-1 phút, 72°C-2 phút (30 chu kỳ).	Stanton and Humphrey (2003)
tetG (R)		TTG TTT GAG AGC ATT GCC TGC			
tetK (F)	<i>tetK</i>	TTA GGT GAA GGG TTA GGT CC	718	95°C-1 phút, 55°C-1 phút, 72°C-1,30 phút (25 chu kỳ).	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
tetK (R)		GCA AAC TCA TTC CAG AAG CA			
tetL (F)	<i>tetL</i>	CAT TTG GTC TTA TTG GAT CG	488	95°C-1 phút, 55°C-1 phút, 72°C-1,30 phút (25 chu kỳ).	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
tetL (R)		ATT ACA CTT CCG ATT TCG G			
tetM (F)	<i>tetM</i>	GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG	657	95°C-30 giây, 55°C-30 giây, 72°C-1,30 phút (30 chu kỳ).	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
tetM (R)		CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA			
tetO (F)	<i>tetO</i>	GAT GGC ATA CAG GCA CAG AC	614	95°C-1 phút, 60°C-1 phút, 72°C-1,30 phút (25 chu kỳ).	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
tetO (R)		CAA TAT CAC CAG AGC AGG CT			
tetS (F)	<i>tetS</i>	TGG AAC GCC AGA GAG GTA TT	660	95°C-30 giây, 55°C-30 giây, 72°C-1,30 phút (30 chu kỳ).	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
tetS (R)		ACA TAG ACA AGC CGT TGA CC			
tet34 (F)	<i>tet34</i>	ATG AAA ACG AAC GCT AAT TAA CCA	465	95°C-1 phút, 56°C-1 phút, 72°C-2 phút (30 chu kỳ).	Midranda <i>et al.</i> (2003)
tet34 (R)		ACA TAG AGA TCG ATG CTA GTA CTA			
floRF	<i>floR</i>	TCA CGG GCC ACG CTG TAT C	215	96°C-15 giây, 52°C-30 giây, 70°C-1 phút (30 chu kỳ).	Bolton <i>et al.</i> (1999); Fernández-Alarcón <i>et al.</i> (2010)
floRR		CGC CGT CAT TCT TCA CCT TC			

### 3.3.7 Thành phần chung cho các phản ứng PCR trong nghiên cứu

Thành phần các hóa chất chung thực hiện phản ứng PCR để định danh vi khuẩn, khảo sát các integron nhóm 1, 2 và 3, các gen kháng tetracycline và florfenicol của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được trình bày ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4: Thành phần các hóa chất chung để thực hiện phản ứng PCR

TT	Thành phần	Nồng độ thực hiện	Thể tích
1	Nước cất	-	11,75
2	Dung dịch đệm PCR	1X	2,5
3	MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,0
4	dNTPs	10-20 mM	4,0
5	Mồi xuôi	10-20 pmol	1,0
6	Mồi ngược	10-20 pmol	1,0
7	<i>Taq</i> ADN polymerase	1,5-2,5U <i>Taq</i>	0,25
8	DMSO	1%	0,5
9	ADN mẫu	20-60 ng	2,0
	<b>Tổng</b>	-	<b>25 µL</b>

### 3.3.8 Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Tỷ lệ tương đồng của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ và xuất huyết được so sánh với các chủng trên ngân hàng GenBank bằng chương trình BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

Các số liệu và đồ thị trong thí nghiệm được nhập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Sử dụng phương pháp thống kê mô tả để tính toán các giá trị trung bình và tỷ lệ % vi khuẩn kháng, nhạy và nhạy trung bình. Sự khác biệt về độc lực gây bệnh trên cá tra của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong các NT thí nghiệm cảm nhiễm đơn và cảm nhiễm kép được phân tích ANOVA bằng phần mềm SPSS 11.5 ở mức ý nghĩa 5%.

## Chương IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn

#### 4.1.1 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn *E. ictaluri*

##### 4.1.1.1 Kết quả phân lập vi khuẩn *E. ictaluri*

Từ 125 mẫu cá tra bệnh (gồm 90 mẫu cá bệnh GTM và 35 mẫu cá có dấu hiệu 2 loại bệnh GTM và bệnh XH) thu ở 50 ao nuôi cá tra thâm canh ở 1 số tỉnh ĐBSCL (Phụ lục B), đề tài đã phân lập được 67 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* trên môi trường TSA, gồm 15 chủng ở Đồng Tháp (chiếm 22,39%), 7 chủng ở An Giang (chiếm 10,45%), 8 chủng ở Tp. Cần Thơ (chiếm 11,94%), 8 chủng ở Vĩnh Long (chiếm 11,94%), 12 chủng ở Tiền Giang (chiếm 17,91%), 8 chủng ở Trà Vinh (chiếm 11,94%) và 9 chủng ở Bến Tre (chiếm 13,43%). Nhìn chung, hầu hết các chủng vi khuẩn đều được phân lập từ các cơ quan như gan (30/67 chủng, chiếm 44,78%), thận (19/67 chủng, chiếm 28,36%) và tỳ tạng (18/67 chủng, chiếm 26,87%) của cá tra nhiễm bệnh (Bảng 4.1). Ngoài ra, trong số 67 vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được thì có 45/67 (chiếm 67,16%) chủng phân lập từ cá tra bệnh GTM và 22/67 (chiếm 32,84%) chủng phân lập từ cá tra nhiễm kép 2 bệnh GTM và bệnh XH. Kết quả phân lập và nguồn gốc của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được trình bày chi tiết ở Phụ lục J1.

Bảng 4.1: Số chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra bệnh GTM hoặc cá nhiễm kép bệnh XH và GTM ở 1 số tỉnh ĐBSCL

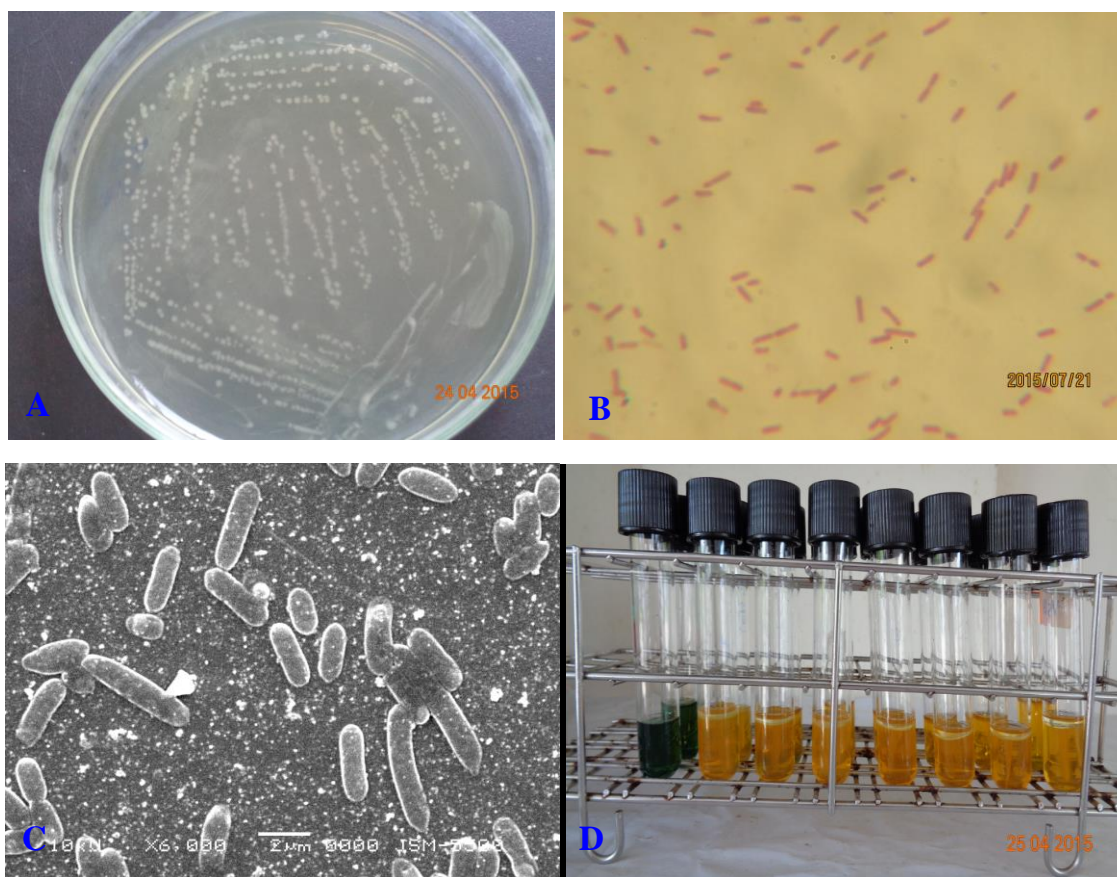
TT	Địa điểm thu mẫu	Số mẫu cá (con)	Số chủng <i>E. ictaluri</i>		Cơ quan phân lập*
			2013	2014	
1	Đồng Tháp	24	5	10	Gan (6), thận (4), tỳ tạng (5)
2	An Giang	14	5	2	Gan (1), thận (3), tỳ tạng (3)
3	Tp. Cần Thơ	14	2	6	Gan (5), thận (2), tỳ tạng (1)
4	Vĩnh Long	14	4	4	Gan (3), thận (2), tỳ tạng (3)
5	Tiền Giang	22	8	4	Gan (7), thận (2), tỳ tạng (3)
6	Trà Vinh	20	2	6	Gan (4), thận (3), tỳ tạng (1)
7	Bến Tre	17	4	5	Gan (4), thận (3), tỳ tạng (2)
	<b>Tổng</b>	<b>125</b>	<b>30</b>	<b>37</b>	<b>Gan (30), thận (19), tỳ tạng (18)</b>

\* Các số trong dấu ngoặc là số chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cơ quan cá bệnh GTM và cá nhiễm kép 2 bệnh GTM và XH.

##### 4.1.1.2 Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được

Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa cơ bản của vi khuẩn cho thấy sau 36-48 giờ phát triển trên môi trường TSA, khuẩn lạc của tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được đều có màu trắng đục, hơi tròn,

độ nổi mô, đa phần khuẩn lạc vi khuẩn nhỏ li ti (đường kính thường <1,0 mm) (Hình 4.1A). Kết quả nhuộm Gram và chụp SEM cho thấy vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm và có dạng hình que dài (Hình 4.1B&C). Vi khuẩn *E. ictaluri* có khả năng di động nhưng di động yếu. Vi khuẩn cho phản ứng oxidase âm tính, catalase dương tính, có khả năng oxid hóa và lên men đường glucose trong cả 2 điều kiện hiếu khí và yếm khí (Hình 4.1D). Tất cả các chủng vi khuẩn có thể phát triển trên môi trường có nồng độ muối từ 0,5 đến 1,5% nhưng không thể phát triển ở nồng độ muối 2% trở lên. Ngoài ra, kết quả khảo sát hoạt tính tan huyết của vi khuẩn cho thấy 57/64 chủng vi khuẩn phân lập được (chiếm 89,06%) có khả năng tan huyết dạng  $\beta$  trên môi trường thạch máu (BA) có bổ sung 5% máu cừu và 7/64 (chiếm 10,94%) chủng vi khuẩn còn lại không gây tan huyết trên môi trường thạch máu (tan huyết dạng  $\gamma$ ).



Hình 4.1: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa cơ bản của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra bệnh GTM ở ĐBSCL.

A. Khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* phát triển trên môi trường TSA sau 48 giờ ủ ở 28°C. B. Ảnh nhuộm Gram vi khuẩn (100X). C. Ảnh chụp vi khuẩn *E. ictaluri* (chủng 1ED3) dưới kính hiển vi điện tử quét (độ phóng đại 6.000X). D. Kết quả phản ứng oxid hóa và lên men đường glucose.

Như vậy, các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, sinh lý và sinh hóa cơ bản của 67 chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này phù hợp với đặc điểm của

vi khuẩn *E. ictaluri* đã được nghiên cứu bởi nhiều tác giả trong và ngoài nước (Waltman *et al.*, 1986; Yuasa *et al.*, 2003; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2004; Nguyễn Hữu Thịnh và Trương Thanh Loan, 2007; Crumlish *et al.*, 2010). Tuy nhiên, 1 số nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* sẽ có hình dạng và màu sắc khác nhau khi chúng phát triển trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hữu Thịnh và Trương Thanh Loan (2007) cho thấy trên môi trường BHI ủ ở 30°C sau 24 giờ thì khuẩn lạc vi khuẩn trong suốt và nhỏ li ti. Tuy nhiên, khuẩn lạc sẽ phát triển rõ hơn, có màu trắng hơi trong, lồi, tròn với đường kính là 0,5-2 mm sau 48 giờ ủ. Theo Trần Thị Thanh Huyền và *ctv.* (2011) khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập trên môi trường chọn lọc EIM (Edwardsiella ictaluri medium) sẽ có màu xanh, tròn đều và đường kính 0,2-0,5 mm. Trong khi đó, kết quả phân lập của Dung *et al.* (2008) cho thấy trên môi trường TSA khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* có màu trắng đục, không có nhân, rìa có dạng không đồng nhất.

#### 4.1.1.3 Định danh các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được

Nghiên cứu tiến hành định danh 6 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* bằng bộ kit API 20E (Hình 4.2). Kết quả định danh vi khuẩn *E. ictaluri* bằng bộ kit API 20E cùng với các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, sinh hóa vi khuẩn được trình bày chi tiết ở Bảng 4.2. Qua kết quả từ Bảng 4.2 và Hình 4.2 cho thấy 6 chủng vi khuẩn kiểm tra đa phần (17/20 chỉ tiêu) cho phản ứng âm tính với các chỉ tiêu như orthonitrophenyl galactosidase, arginine, ornithine, citrate, H<sub>2</sub>S, urease, tryptophane deaminase, indole, gelatin, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdalin và arabinose. Trong khi đó, các chủng vi khuẩn chỉ cho 3/20 phản ứng dương tính với lysine, Voges-Proskauer và glucose.



ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP
-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Hình 4.2: Kết quả định danh vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được bằng bộ kit API 20E.

Qua kết quả Hình 4.2 cho thấy 6 chủng vi khuẩn kiểm tra đều không sinh H<sub>2</sub>S và indole. Đây là 2 chỉ tiêu sinh hóa quan trọng để phân biệt 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *E. tarda* của giống *Edwardsiella*, trong khi vi khuẩn *E. tarda* cho phản ứng dương tính với indole và H<sub>2</sub>S thì vi khuẩn *E. ictaluri* cho phản ứng indole và H<sub>2</sub>S âm tính (Abbott and Janda, 2010). Như vậy, các đặc điểm sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu phù hợp với các đặc điểm vi khuẩn *E. ictaluri* đã được mô tả trước đây của nhiều tác giả trong và ngoài nước (Shotts and Walman, 1986; Waltman *et al.*, 1986; Crumlish *et al.*, 2002; Keskin *et al.*, 2004; Nguyễn Quốc Thịnh và Từ Thanh Dung, 2004; Nguyễn Hữu Thịnh và Trương Thanh Loan, 2007). Nhìn chung, các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được phân lập từ các vùng địa lý khác nhau trong các nghiên cứu trước đây và trong nghiên cứu này rất đồng dạng, hầu như không có sự khác biệt giữa các chủng khi được kiểm tra (Waltman *et al.*, 1986; Yuasa *et al.*, 2003; Panangala *et al.*, 2006; Bartie *et al.*, 2012).

Ngoài ra, để chính xác thì tất cả các chủng vi khuẩn còn được định danh bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy vùng đầu nguồn của gen bám dính của 67/67 (100%) chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập đã được khuếch đại với vạch ADN (DNA band) xuất hiện ở kích thước khoảng 470 bp (Hình 4.3). Như vậy, kết quả PCR phù hợp với báo cáo của Sakai *et al.* (2009). Bên cạnh đó, sản phẩm PCR sau khi được khuếch đại được giải trình tự và so sánh với các trình tự của vi khuẩn *E. ictaluri* trên cơ sở dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy 12 chủng vi khuẩn giải trình tự trong nghiên cứu (Phụ lục K1) có tỷ lệ tương đồng cao từ 99-100% (giá trị kỳ vọng (E value) = 0) với các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* trên ngân hàng GenBank là *E. ictaluri* chủng FPC1092 (AB469961.1), *E. ictaluri* chủng T3-3 (KR080261.1), *E. ictaluri* chủng T2-2 (KR080260.1), *E. ictaluri* chủng T2-1 (KR080259.1), *E. ictaluri* chủng T1-3 (KR080258.1), *E. ictaluri* chủng T1-2 (KR080257.1), *E. ictaluri* chủng T1-1 (KR080256.1), *E. ictaluri* chủng 93-146 (CP001600.2), *E. ictaluri* chủng JCM 1680 (AB469968.1) và *E. ictaluri* chủng JF0284 (AB469967.1).



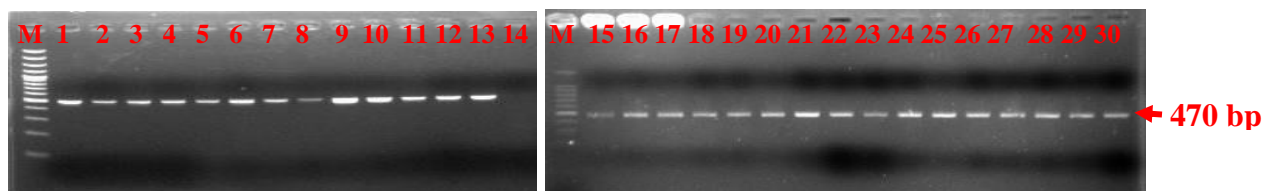
Bảng 4.2: Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh hóa và định danh vi khuẩn *E. ictaluri* bằng bộ kit API 20E

Các đặc điểm vi khuẩn	1ED3	3ED3	8ED3	10ED3	1ED4	6ED4	Chủng <i>E. ictaluri</i> * tham khảo
Gram	-	-	-	-	-	-	-
Hình dạng	Que dài	Que dài	Que dài	Que dài	Que dài	Que dài	Que dài
Di động	Yếu	Yếu	Yếu	Yếu	Yếu	Yếu	Yếu
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Phản ứng O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Phát triển trên môi trường NaCl**:							
0,5%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1%	++	++	++	++	++	++	++
1,5%	+	+	+	+	+	+	+
2%	-	-	-	-	-	-	-
Khả năng tan huyết	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\gamma$	$\beta$	$\beta$
ONPG	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-
Sinh H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Sinh Indol	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-

ONPG: Ortho-nitrophenyl galactosidase +: dương tính -: âm tính

\* Các đặc điểm vi khuẩn *E. ictaluri* được tổng hợp từ các nghiên cứu của Hawke et al. (1981); Waltman et al. (1986); \*\* Khả năng phát triển của vi khuẩn trên môi trường có các nồng độ muối khác nhau: +++: phát triển rất tốt, ++: phát triển tốt, +: yếu và -: không phát triển.

Cho đến nay, việc sử dụng kỹ thuật PCR để định danh vi khuẩn *E. ictaluri* đã được báo cáo bởi nhiều tác giả trong và ngoài nước (Williams and Lawrence, 2009; Lê Hữu Thôi và ctv., 2010), Trần Nguyễn Diễm Tú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012). Crumlish *et al.* (2002) đã sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện vùng đặc hiệu trên vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn *E. ictaluri* với kích thước sản phẩm là 500 bp. Tương tự, Yuasa *et al.* (2003) cũng phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* với sản phẩm PCR là 530 bp. Đặc biệt, thời gian gần đây, Panangala *et al.* (2007) đã công bố nghiên cứu cho thấy việc sử dụng kỹ thuật PCR đa môi (multiplex PCR, mPCR) có thể phát hiện đồng thời 3 loài vi khuẩn gây bệnh trên cá nheo Mỹ là *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare*. Ở Việt Nam, các tác giả Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy (2009), Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương (2010), Lê Hữu Thôi và ctv. (2010) đã sử dụng cặp môi EifD-1 và EiRs-1 khuếch đại vùng đặc hiệu trên đoạn gen 16S rRNA có kích thước 407 bp để phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*. Trong khi đó, Trần Thị Thanh Huyền và ctv. (2011) đã thiết kế đoạn môi để khuếch đại đoạn gen eip 18 có kích thước khoảng 480 bp đặc trưng của vi khuẩn *E. ictaluri*.



Hình 4.3: Phổ điện di ADN của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được bằng kỹ thuật PCR.

M: thang chuẩn 100 bp và 100 bp plus; giếng 1-13: các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được kiểm tra theo thứ tự là 1ED3, 2ED3, 3ED3, 4ED3, 5ED3, 6ED3, 7ED3, 8ED3, 9ED3, 10ED3, 11ED3, 12ED3, 13ED3; giếng 15-30: thứ tự các mẫu là 14ED3, 15ED3, 16ED3, 17ED3, 18ED3, 19ED3, 20ED3, 21ED3, 22ED3, 23ED3, 24ED3, 25ED3, 26ED3, 27ED3, 28ED3, 29ED3; giếng 14: đối chứng âm.

#### 4.1.2 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn *A. hydrophila*

##### 4.1.2.1 Kết quả phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*

Tương tự, từ các cơ quan gan, thận và tỳ tạng của 130 mẫu cá tra nhiễm bệnh (gồm 95 mẫu cá bệnh XH và 35 mẫu có dấu hiệu nhiễm kép 2 loại bệnh XH và bệnh GTM) thu ở 1 số tỉnh ĐBSCL (Phụ lục B), tổng số 74 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* đã được phân lập trên môi trường TSA, gồm: 10 chủng ở Đồng Tháp (chiếm 13,51%), 8 chủng ở An Giang (chiếm 10,81%), 8 chủng ở Tp. Cần Thơ (chiếm 10,81%), 15 chủng ở Vĩnh Long (chiếm 20,27%), 12 chủng ở Tiền Giang (chiếm 16,22%), 8 chủng ở Trà Vinh (chiếm 10,81%) và 13 chủng ở Bến Tre (chiếm 17,57%). Nhìn chung, hầu hết các chủng vi khuẩn đều được phân lập từ các cơ quan như gan (38/74 chủng, chiếm 51,35%), thận (20/74 chủng, chiếm

27,03%) và tỳ tạng (16/74 chủng, chiếm 21,62%) của cá bệnh (Bảng 4.3). Ngoài ra, trong số 74 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được thì có 52/74 (chiếm 70,27%) chủng được phân lập từ cá tra bệnh XH và 22/74 (chiếm 29,73%) chủng phân lập từ cá tra nhiễm kép 2 bệnh XH và bệnh GTM. Kết quả phân lập và nguồn gốc của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* được trình bày chi tiết ở Phụ lục J2.

Bảng 4.3: Số chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá tra bệnh XH hoặc cá nhiễm kép 2 bệnh XH và GTM ở 1 số tỉnh ĐBSCL

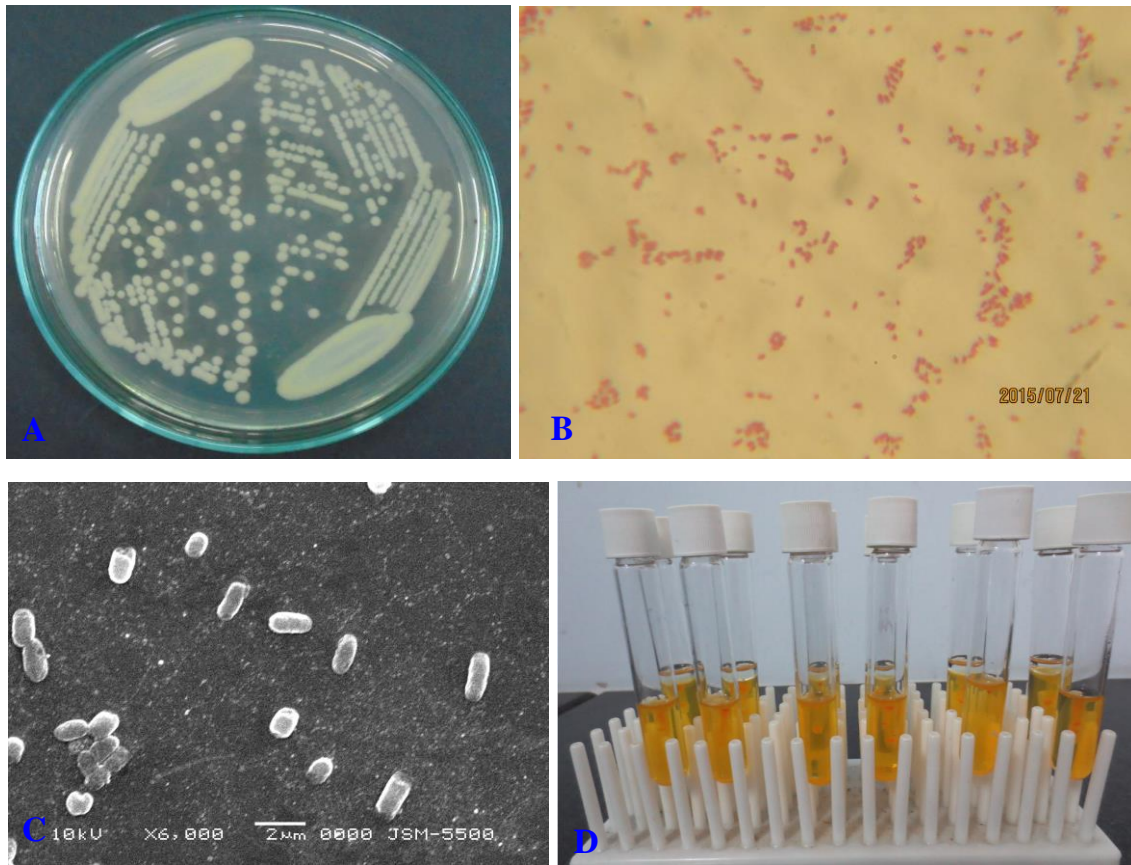
TT	Địa điểm thu mẫu	Số mẫu cá (con)	Số chủng <i>A. hydrophila</i>		Cơ quan phân lập*
			2013	2014	
1	Đồng Tháp	20	5	5	Gan (6), thận (1), tỳ tạng (3)
2	An Giang	14	4	4	Gan (5), thận (2), tỳ tạng (1)
3	Tp. Cần Thơ	16	5	3	Gan (4), thận (3), tỳ tạng (1)
4	Vĩnh Long	18	9	6	Gan (6), thận (3), tỳ tạng (6)
5	Tiền Giang	25	7	5	Gan (6), thận (5), tỳ tạng (1)
6	Trà Vinh	21	4	4	Gan (5), thận (3)
7	Bến Tre	16	7	6	Gan (6), thận (3), tỳ tạng (4)
<b>Tổng</b>		<b>130</b>	<b>41</b>	<b>33</b>	<b>Gan (38), thận (20), tỳ tạng (16)</b>

\* Các số trong dấu ngoặc là số chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cơ quan cá bệnh XH và cá nhiễm kép 2 bệnh GTM và XH.

#### 4.1.2.2 Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được

Tương tự, các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi phân lập cũng được kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa cơ bản trước khi định danh bằng bộ kit API 20E. Kết quả cho thấy so với vi khuẩn *E. ictaluri* có thời gian phát triển tương đối chậm trên môi trường TSA (36-48 giờ) thì vi khuẩn *A. hydrophila* phát triển nhanh hơn. Sau 18-36 giờ có thể quan sát khuẩn lạc của chúng phát triển trên môi trường TSA với khuẩn lạc có dạng tròn (đường kính 1-3 mm), độ nổi hơi lồi, màu vàng nhạt đến màu vàng kem (Hình 4.4A). Tương tự vi khuẩn *E. ictaluri*, vi khuẩn *A. hydrophila* cũng thuộc nhóm Gram âm (Hình 4.4B). Tuy nhiên, vi khuẩn có dạng hình que ngắn (Hình 4.4C) và chúng có khả năng di động mạnh. Ngoài ra, vi khuẩn cho phản ứng dương tính với oxidase và catalase, có khả năng lên men đường glucose trong cả 2 điều kiện hiếu khí và yếm khí (Hình 4.4D). Tất cả các chủng vi khuẩn có thể phát triển trên môi trường có nồng độ muối từ 1 đến 4%, ở nồng độ muối 5% thì có 8/74 (chiếm 10,81%) nhưng ở nồng độ muối 6% trở lên thì không có chủng vi khuẩn nào phát triển. Ngoài ra, kết quả khảo sát hoạt tính tan huyết của vi khuẩn cho thấy 71/74 (chiếm 94,59%) chủng vi khuẩn phân lập có khả năng tan huyết dạng  $\beta$  trên môi trường

thạch máu (BA) có bổ sung 5% máu cừu và 3/74 (chiếm 4,05%) chủng vi khuẩn còn lại không gây tán huyết trên môi trường thạch máu (tan huyết dạng  $\gamma$ ).



Hình 4.4: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa cơ bản của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được từ cá tra bệnh XH ở ĐBSCL.

A. Khuẩn lạc vi khuẩn *A. hydrophila* phát triển trên môi trường TSA sau 24 giờ. B. Ảnh nhuộm Gram vi khuẩn (100X). C. Ảnh chụp vi khuẩn *A. hydrophila* (chủng 4A3) dưới kính hiển điện tử quét (độ phóng đại 6.000X). D. Kết quả phản ứng oxid hóa và lên men đường glucose.

Vi khuẩn *A. hydrophila* được xem là tác nhân gây bệnh cho nhiều loài cá khác nhau trên thế giới (Newman, 1993). Đặc biệt, vi khuẩn *A. hydrophila* được xác định là tác nhân gây bùng phát bệnh MAS trên cá nheo Mỹ (Pridgeon and Klesius, 2011; Pridgeon *et al.*, 2013). Trên cá tra thì bệnh XH do vi khuẩn *A. hydrophila* từ lâu đã được nhiều tác giả đề cập đến. Như vậy, kết quả khảo sát các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, sinh lý và sinh hóa cơ bản của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được từ cá nhiễm bệnh XH hoặc nhiễm kép trong nghiên cứu này tương tự với các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, sinh lý và sinh hóa cơ bản của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong các báo cáo trước đây của Ly *et al.*, 2009; Crumlish *et al.*, 2010), Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Đức Hiền (2012) và Trần Thị Mỹ Hân (2013).

### 4.1.2.3 Định danh các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được

Sáu chủng vi khuẩn được chọn để định danh bằng bộ kit API 20E (Hình 4.5). Kết quả định danh vi khuẩn *A. hydrophila* bằng bộ kit API 20E cũng như dựa vào các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa khác được trình bày ở Bảng 4.4. Qua kết quả Bảng 4.4 và Hình 4.5 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn kiểm tra đều cho phản ứng âm tính với các chỉ tiêu như ornithine, citrate, H<sub>2</sub>S, urease, tryptophane deaminase, indole, inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose và arabinose. Trong khi đó, vi khuẩn cho các phản ứng dương tính gồm: orthonitrophenyl galactosidase, arginine, lysine, Voges-Proskauer, gelatin, glucose, mannitol, saccharose và amygdalin.



ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	+	+	-	-	-	+	-	+	-

Hình 4.5: Kết quả định danh vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được bằng bộ kit API 20E.

Như vậy, vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này có các đặc điểm sinh hóa tương tự với vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá tra bệnh XH của Ly *et al.* (2009) và Crumlish *et al.* (2010), lươn đồng bệnh XH của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Đức Hiền (2012) và trên cá thát lát còm của Đặng Thụy Mai Thy và *ctv.* (2014). Tuy nhiên, các đặc điểm vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này có 1 số đặc điểm khác với vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh MAS trên cá nheo Mỹ của Pridgeon and Klesius (2011). Kết quả định danh 3 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* bằng bộ kit API 20E trong nghiên cứu của Pridgeon and Klesius (2011) cho kết quả dương tính với citrate, indole, inositol, saccharose và arabinose, trong khi đó 6 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này cho kết quả âm tính. Ngược lại, các chỉ tiêu như lysine decarboxylase và amygdalin của 3 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu của Pridgeon and Klesius (2011) âm tính thì 6 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này lại cho kết quả dương tính.

Bảng 4.4: Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh hóa và định danh vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được

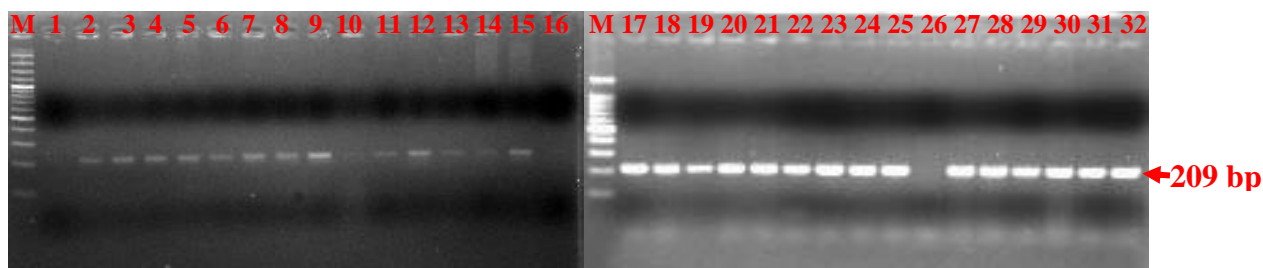
Các đặc điểm vi khuẩn	1A3	2A3	4A3	5A3	2A4	7A4	Chủng <i>A. hydrophila</i> * tham khảo
Gram	-	-	-	-	-	-	-
Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn
Di động	Chuyển động	Chuyển động	Chuyển động	Chuyển động	Chuyển động	Chuyển động	Chuyển động
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Phản ứng O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Phát triển trên môi trường NaCl**							
1%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4%	++	++	++	+	++	+	++
5%	+	-	+	-	+	-	+
6%	-	-	-	-	-	-	-
Khả năng tan huyết	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$
ONPG	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+	-
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	+
Sinh H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Sinh Indol	-	-	-	-	-	-	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	+

ONPG: *Orthonitrophenyl galactosidase* +: dương tính -: âm tính

\* Các đặc điểm vi khuẩn *A. hydrophila* được tổng hợp từ nghiên cứu của Pridgeon and Klesius (2011); \*\* Khả năng phát triển của vi khuẩn trên môi trường có các nồng độ muối khác nhau: +++: phát triển rất tốt, ++: phát triển tốt, +: yếu và -: không phát triển.



Bên cạnh đó, để xác định chính xác thì nghiên cứu cũng sử dụng kỹ thuật PCR để định danh các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được. Kết quả cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn kiểm tra (74/74 chủng) đều khuếch đại được gen aerolysin đặc hiệu của vi khuẩn *A. hydrophila* với vạch ADN xuất hiện ở kích thước 209 bp (Hình 4.6). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Pollard *et al.* (1990). Bên cạnh đó, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR và so sánh trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy 12 chủng vi khuẩn được chọn giải trình tự trong nghiên cứu (Phụ lục K2) có tỷ lệ tương đồng cao từ 98-99% (giá trị kỳ vọng rất thấp) với các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trên ngân hàng GenBank gồm: *A. hydrophila* chủng ZC1 (FJ608555.1), *A. hydrophila* chủng AH14 (EU650663.1), *A. hydrophila* chủng YBH090730L (GU169708.1), *A. hydrophila* chủng wp3 (FJ608554.1), *A. hydrophila* chủng XS91-4-1 (DQ186611.1), *A. hydrophila* chủng BZ (EF450824.1), *A. hydrophila* chủng NNX7 (JX502748.1), *A. hydrophila* chủng AH119SB-W30 (EU159682.1) và *A. hydrophila* chủng AH75SB-W43 (EU159683.1).



Hình 4.6: Phổ điện di ADN của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được bằng kỹ thuật PCR.

M: thang chuẩn 100 bp và 100 bp plus; giếng 1: đối chứng âm; giếng 2-15: các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* được kiểm tra theo thứ tự là 1A3, 2A3, 3A3, 4A3, 5A3, 6A3, 7A3, 8A3, 9A3, 10A3, 11A3, 12A3, 13A3, 14A3; giếng 17-25 và 27-32 thứ tự các mẫu là 15A3, 16A3, 17A3, 18A3, 19A3, 20A3, 21A3, 22A3, 23A3, 24A3, 25A3, 26A3, 27A3, 28A3, 29A3; giếng 16, 26 là các mẫu âm tính.

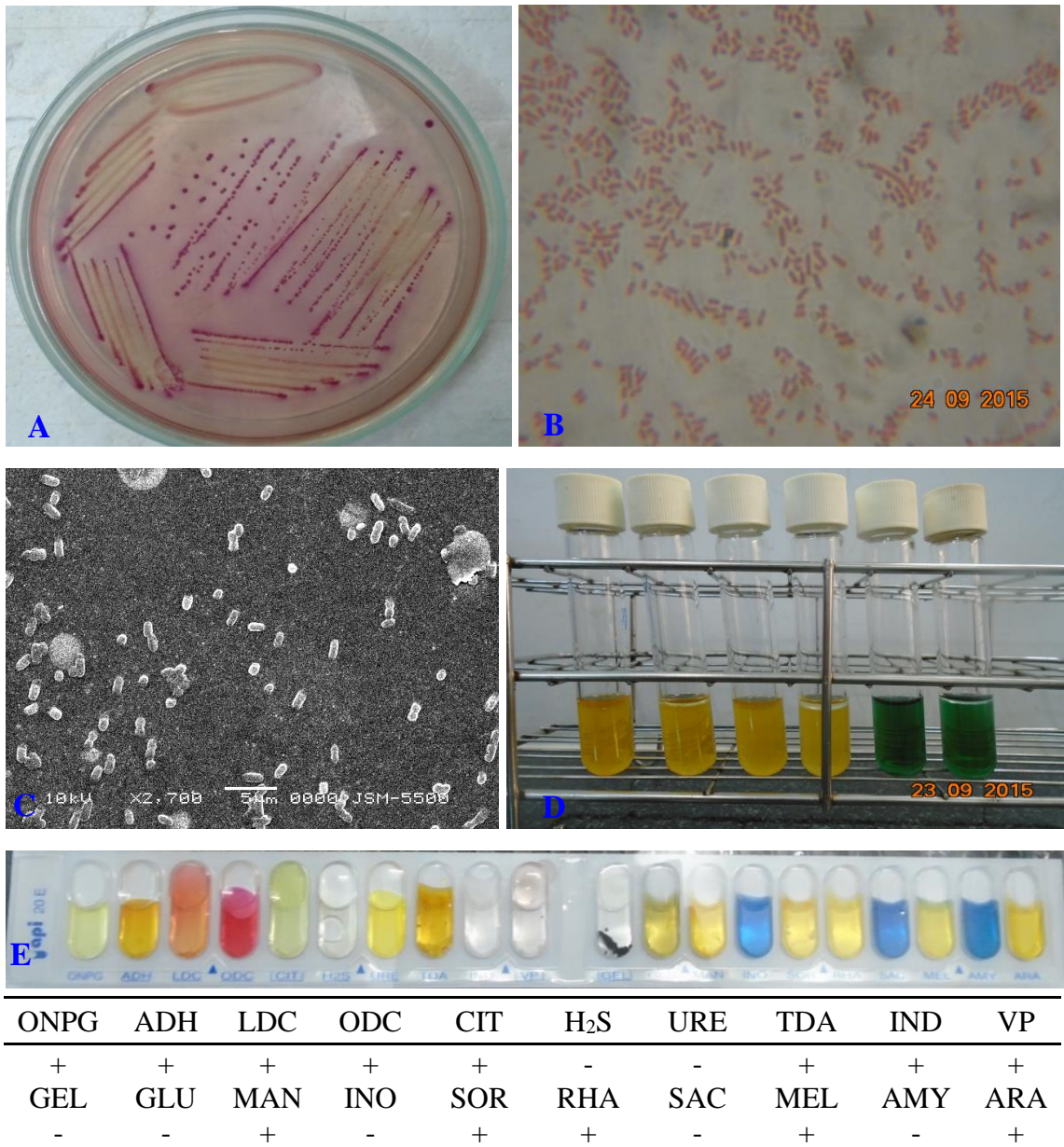
Cho đến nay, việc sử dụng kỹ thuật PCR khuếch đại gen aerolysin của vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên các loài cá hoặc trong môi trường nước đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước thực hiện (Pollard *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 2008; Umesha *et al.*, 2011; Trần Nguyễn Diễm Tú và Đặng Thị Hoàng Oanh 2012; Lê Hữu Thôi và *ctv.*, 2010). Sử dụng kỹ thuật mPCR, Panangala *et al.* (2007) đã phát hiện đồng thời vi khuẩn *A. hydrophila* cùng với vi khuẩn *E. ictaluri* và *F. columnare* gây bệnh trên cá nheo Mỹ. Nguyễn Hà Giang và *ctv.* (2010) cũng đã nghiên cứu thành công quy trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *A. hydrophila* từ thận cá tra bệnh XH với độ nhạy và tính đặc hiệu tương đối cao.

### 4.1.3 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn *E. coli*

Từ mẫu nước ao nuôi (n=10) và từ mẫu cá tra bệnh (n=10), đề tài đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn *E. coli* (Phụ lục J3A) trên môi trường MKC. Do vi khuẩn *E. coli* trong nghiên cứu này chỉ sử dụng trong các thí nghiệm tiếp hợp với vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* (mục 3.3.6.4a) nên phần này chỉ trình bày tóm tắt kết quả phân lập, định danh và kết quả thực hiện kháng sinh đồ (kết quả chi tiết được trình bày ở Phụ lục J3A). Nhìn chung, khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* phát triển trên môi trường MKC có màu tím đặc trưng (Hình 4.7A) sau 18-24 giờ ủ ở 37°C (đường kính dao động từ 1-2 mm). Phần lớn khuẩn lạc có dạng tròn, bìa nguyên và độ nổi mô (1 số ít có độ nổi hơi lồi). Kết quả nhuộm Gram (n=10) và chụp SEM (n=2) cho thấy vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm, hình que ngắn (Hình 4.7B&C). Tất cả chủng vi khuẩn phân lập được đều cho phản ứng oxidase âm tính, catalase dương tính, có khả năng oxid hóa và lên men đường glucose trong cả 2 điều kiện hiếu khí và yếm khí (Hình 4.7D). Ngoài ra, tất cả các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được trong nghiên cứu đều có khả năng di động.

Bên cạnh đó, nghiên cứu sử dụng bộ kit API 20E (Hình 4.7E) để định danh 2 chủng vi khuẩn *E. coli* ECR2 và ECR4 (do đây là 2 chủng có kiểu hình nhạy với tất cả 15 kháng sinh được chọn trong thí nghiệm tiếp hợp). Kết quả từ Hình 4.7E cho thấy các chủng vi khuẩn *E. coli* cho phản ứng dương tính với ortho-nitrophenyl galactosidase, arginine, lysine, ornithine, citrate, tryptophane deaminase, indole, Voges-Proskauer, mannitol, sorbitol, rhamnose, melibiose và arabinose. Vi khuẩn cho phản ứng âm tính với H<sub>2</sub>S, urease, gelatin, glucose, inositol, saccharose và amygdalin. Như vậy, các chủng vi khuẩn phân lập được có các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, sinh lý và sinh hóa tương tự với vi khuẩn *E. coli* trong mô tả của các tác giả Zinnah *et al.* (2007), Soliman *et al.* (2010) và Chakravarty *et al.* (2015). Kết quả kiểm tra 1 số đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và định danh vi khuẩn khác bằng bộ kit API 20E được trình bày ở Phụ lục J3B. Ngoài ra, kết quả thực hiện kháng sinh đồ cho thấy nhiều chủng vi khuẩn *E. coli* cũng đã kháng với nhiều loại kháng sinh (Phụ lục J3A), trong đó có 2 chủng ECR2 và ECR4 có kiểu hình nhạy với tất cả 15 kháng sinh (Phụ lục J3A) được chọn để sử dụng trong thí nghiệm tiếp hợp (nội dung này được đề cập ở mục 4.8).





Hình 4.7: Các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ ruột và nước ao nuôi cá tra ở Đồng Tháp.

A. Khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* (chủng ECR2) sau 24 giờ ủ ở 37°C. B. Ảnh nhuộm Gram vi khuẩn (100X). C. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (độ phóng đại 2.700X). D. Phản ứng oxid hóa và lên men đường glucose. E. Kết quả định danh chủng vi khuẩn *E. coli* ECR2 bằng bộ kit API 20E.

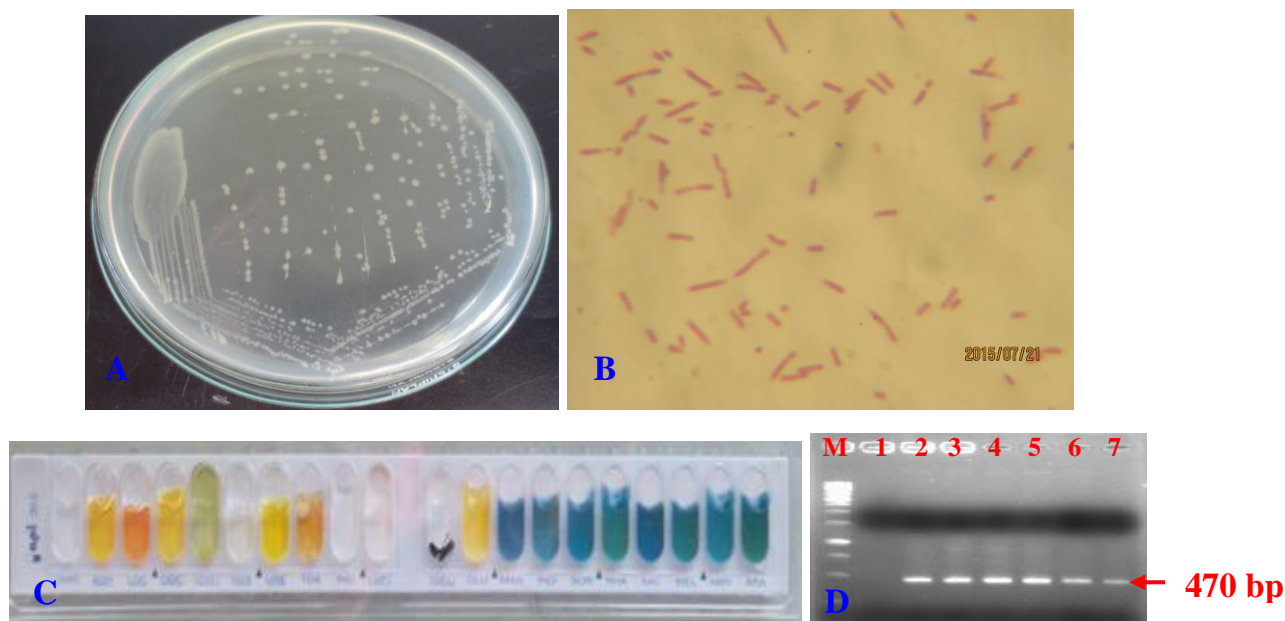
## 4.2 Kết quả cảm nhiễm cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

### 4.2.1 Kết quả cảm nhiễm cá tra với các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*

#### 4.2.1.1 Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn

Cá lờ đờ hoặc vừa mới chết được sử dụng để tái phân lập và định danh vi khuẩn *E. ictaluri* sau khi cảm nhiễm. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* sau khi cảm nhiễm đều được phân lập từ các cơ quan như gan, thận và tỷ

tạng của cá bệnh. Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn phân lập được từ cá bệnh sau khi cảm nhiễm hoàn toàn giống với các đặc điểm của chủng vi khuẩn trước khi tiến hành thí nghiệm, cụ thể khuẩn lạc vi khuẩn đều có màu trắng đục, nhỏ li ti khi cấy lên môi trường TSA sau 36-48 giờ (Hình 4.8A). Vi khuẩn có hình que dài, Gram âm (Hình 4.8B), di động yếu, cho phản ứng oxidase âm tính và catalase dương tính. Kết quả định danh lại bằng bộ kit API 20E (Hình 4.8C) cũng cho thấy 4 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* sau khi gây cảm nhiễm đều cho phản ứng âm tính với các chỉ tiêu: orthonitrophenyl galactosidase, arginine, ornithine, citrate, H<sub>2</sub>S, urease, tryptophane deaminase, indole, gelatin, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdalin và arabinose; phản ứng dương tính với lysine, Voges-Proskauer và glucose. Bên cạnh đó, ADN được ly trích từ 1 số mẫu gan, thận và mẫu vi khuẩn sau khi tái phân lập của cá sau cảm nhiễm cũng cho kết quả dương tính với vạch ADN xuất hiện ở vị trí 470 bp (Hình 4.8D) khi được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR. Như vậy, các kết quả cảm nhiễm trên đã thỏa mãn định đề Koch (Koch's postulates).



Hình 4.8: Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn *E. ictaluri* sau khi cảm nhiễm trên cá tra.

A. Khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* (chủng 8ED3) phát triển trên môi trường TSA sau 48 giờ. B. Ảnh nhuộm Gram (100X) vi khuẩn *E. ictaluri* (chủng 8ED3). C. Kết quả tái định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E. D. Kết quả tái định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR (M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1: mẫu mô thận cá ở NT đối chứng; các giếng 2, 3, 4 và 5: mẫu ADN trích từ vi khuẩn và giếng 6, 7: mẫu ADN được trích từ thận và gan cá bệnh).

#### 4.2.1.2 Dấu hiệu bệnh lý của cá bệnh

Quan sát thí nghiệm cho thấy cá tra ở 2 NT đối chứng (tiêm và không tiêm nước muối sinh lý) vẫn hoạt động bình thường, không có cá chết trong suốt quá trình thí nghiệm. Cá không có dấu hiệu nhiễm bệnh bệnh GTM khi quan sát bên ngoài và bên trong cơ thể (Hình 4.9A&B), đặc biệt là không phát hiện vi khuẩn phát triển khi cấy trên môi trường phân lập. Tuy nhiên, cá ở các NT cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* thường có hiện tượng bơi lờ đờ và xoay tròn trước khi chết (Dung *et al.*, 2012). Tất cả cá bệnh ở các NT thí nghiệm đều có các dấu hiệu bệnh lý bên ngoài và bên trong giống nhau. Các dấu hiệu đặc trưng của bệnh GTM gồm các đốm trắng nhỏ li ti xuất hiện trên gan, thận và tỳ tạng (Hình 4.9D). Trường hợp bệnh nặng, nội tạng của 1 số cá bệnh có hiện tượng trương phồng, nhũn và có dịch trong xoang bụng (Hình 4.9D). Tuy nhiên, cá chết ở thời gian đầu (thường ở ngày 2 và 3) sau khi cảm nhiễm thì các đốm trắng xuất hiện trên các cơ quan nội tạng của cá chưa được rõ (thường xuất hiện trên thận và tỳ tạng). Ngoài ra, qua thí nghiệm cảm nhiễm còn cho thấy các dấu hiệu biểu hiện bệnh bên ngoài của hầu hết cá cảm nhiễm thì không khác biệt so với cá ở NT đối chứng (Hình 4.9C), ngoại trừ 1 số cá bệnh có màu sắc hơi nhợt nhạt và xuất hiện các điểm xuất huyết trên các vây và xung quanh hậu môn. Như vậy, các dấu hiệu bệnh lý của cá tra sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* tương tự như mô tả của Ferguson *et al.* (2001), Từ Thanh Dung và *ctv.* (2004), Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2009), Yuasa *et al.* (2003), Crumlish *et al.* (2010) và Dung *et al.* (2012). Tuy nhiên, các dấu hiệu biểu hiện bệnh bên ngoài của cá tra sau khi nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này không giống với các biểu hiện trên cá nheo Mỹ. Cụ thể, cá tra bệnh GTM thường có da và mang hơi nhợt so với cá khỏe (ngoại trừ 1 số ít trường hợp cá bệnh nặng thì mới xuất hiện xuất huyết ở trên các vây và xung quanh hậu môn) (Dung *et al.*, 2012), cá không có các đốm xuất huyết xuất hiện rõ ràng như trên cá nheo Mỹ (Jacrboe *et al.*, 1984; Hawke *et al.*, 1998). Một điểm khác biệt nữa là trên các nội quan như gan, thận và tỳ tạng của cá tra bệnh GTM luôn xuất hiện các đốm trắng nhỏ li ti (Ferguson *et al.*, 2001; Crumlish *et al.*, 2010; Dung *et al.*, 2012), trong khi các cơ quan này trên cá nheo Mỹ bệnh ESC thì không được ghi nhận mà thay vào đó là các dấu hiệu thường gặp như bụng phình to, chứa nhiều dịch do gan, thận và tỳ tạng trương phồng, sung huyết và xuất huyết ruột (Jacrboe *et al.*, 1984; Blazer *et al.*, 1985; Miyazaki and Plumb, 1985).



Hình 4.9: Dấu hiệu biểu hiện bệnh GTM của cá tra cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* chủng 1ED3.

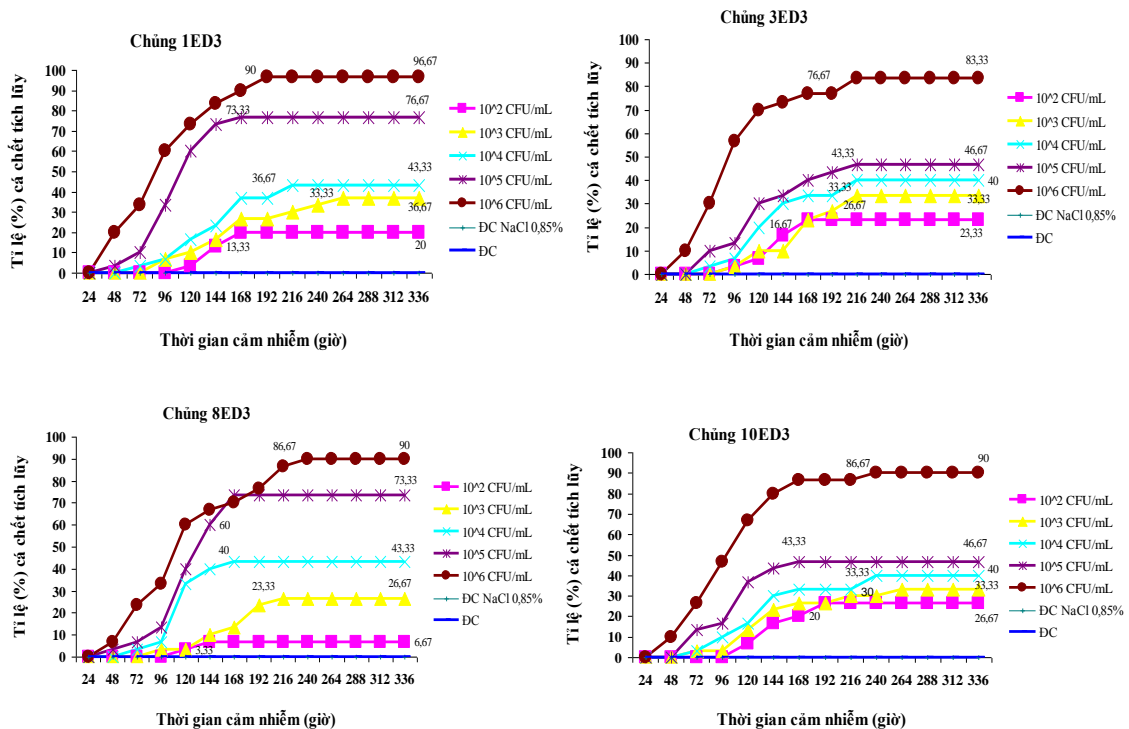
A&B. Cá tra ở NT đối chứng (tiêm nước muối sinh lý). C. Biểu hiện bên ngoài của cá tra cảm nhiễm với chủng 1ED3. D. Dấu hiệu bên trong của cá tra cảm nhiễm với chủng 1ED3: cá bệnh GTM với các đốm trắng nhỏ li ti trên gan, thận và tỳ tạng (mũi tên).

#### 4.2.1.3 Độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*

Độc lực và khả năng gây bệnh của vi khuẩn *E. ictaluri* được xác định qua thí nghiệm cảm nhiễm trên cá tra giống với 4 chủng: 1ED3, 3ED3, 8ED3 và 10ED3 ở 5 mật số tiêm vi khuẩn là  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  và  $10^6$  CFU/cá. Qua kết quả thí nghiệm cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* khác nhau đều gây chết cá ở ngày thứ 2 sau khi cảm nhiễm, sau đó cá chết tập trung ở ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 (thường chết cao nhất ở ngày 4-5), cá ngừng chết ở ngày thứ 10 cho đến khi kết thúc thí nghiệm (Hình 4.10). Trong khi đó, ở NT đối chứng (tiêm và không tiêm nước muối sinh lý) thì không có cá nào chết trong suốt thời gian theo dõi thí nghiệm. Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ cá chết tích lũy ở các nồng độ tiêm vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $P < 0,05$ ). Thời gian và tỷ lệ cá chết tích lũy của các chủng vi khuẩn được trình bày chi tiết ở Phụ lục L1. Ngoài ra, kết quả thí nghiệm cũng cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn đều gây chết cá với tỷ lệ cao (trên 80%), trong đó chủng 1ED3 gây chết cá ở tỷ lệ cao nhất (96,67%), kể đến là 2 chủng 8ED3 và 10ED3 với cùng tỷ lệ gây chết là 90% và cá chết thấp nhất ở chủng 3ED3 (83,33%). Như vậy, qua các thí nghiệm của nghiên cứu này cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* khác nhau sẽ có thời gian và tỷ lệ cá chết khác nhau trên các loài cá khác nhau khi gây cảm nhiễm với chúng. Thí nghiệm của Plumb and Sanchez (1983) cho thấy cá nheo chết 100% trong 10



ngày sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* ở mật số vi khuẩn là  $1,5 \times 10^3$  CFU/mL. Baxa *et al.* (1990) gây cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* với các loài cá khác nhau bằng phương pháp ngâm ở nồng độ  $1 \times 10^8$  CFU/mL. Kết quả sau 14 ngày thí nghiệm cho thấy vi khuẩn đã gây chết cá nheo với tỷ lệ là 32%, cá hồi trắng là 75% và cá vược sọc là 5% nhưng vi khuẩn không gây chết ở cá tầm trắng. Tương tự, cá nheo khi ngâm với vi khuẩn *E. ictaluri* ở mật độ  $1 \times 10^7$  CFU/mL trong thời gian 1 giờ cho thấy sau 5-20 ngày thí nghiệm, cá bị chết với tỷ lệ là 28% (Klesius and Sealey, 1995). Gần đây, Crumlish *et al.* (2010) tiến hành cảm nhiễm trên cá tra bằng phương pháp tiêm và ngâm với vi khuẩn *E. ictaluri* ở nồng độ vi khuẩn lần lượt là  $1 \times 10^6$  và  $1 \times 10^8$  CFU/mL. Kết quả cho thấy sau 12 ngày thí nghiệm tỷ lệ cá chết ở phương pháp tiêm là 95%, còn ở phương pháp ngâm là 80%.



Hình 4.10: Tỷ lệ (%) cá tra chết tích lũy theo thời gian cảm nhiễm của 4 chủng vi khuẩn *E. ictaluri*.

Như vậy, qua kết quả thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy cả 4 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được chọn đều có độc lực và khả năng gây bệnh trên cá tra. Đề tài đã xác định được giá trị LD<sub>50</sub> của 4 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* 1ED3, 3ED3, 8ED3 và 10ED3 lần lượt là  $1,67 \times 10^4$ ,  $1,23 \times 10^5$ ,  $1,58 \times 10^4$  và  $1,19 \times 10^5$  CFU/mL (Bảng 4.5), trong đó chủng 1ED3 có độc lực cao nhất (LD<sub>50</sub> =  $1,58 \times 10^4$  CFU/mL), kể đến

là chủng 8ED3 ( $LD_{50} = 1,67 \times 10^4$  CFU/mL) và thấp nhất là chủng 3ED3 ( $LD_{50} = 1,23 \times 10^5$  CFU/mL).

Bảng 4.5: Giá trị  $LD_{50}$  của các chủng *E. ictaluri* cảm nhiễm trên cá tra

Chủng vi khuẩn	Mật độ tiêm vi khuẩn (CFU/mL)	Tỷ lệ (%) cá chết tích lũy	$LD_{50}$ (CFU/mL)
1ED3*	$10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$	20; 36,67; 43,33; 76,67; 96,67	$1,58 \times 10^4$
3ED3	$10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$	23,33; 33,33; 40; 46,67; 83,33	$1,23 \times 10^5$
8ED3	$10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$	6,67; 26,67; 43,33; 73,33; 90	$1,67 \times 10^4$
10ED3	$10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$	26,67; 33,33; 40; 46,67; 90	$1,19 \times 10^5$

Chủng vi khuẩn có đánh \* là chủng được chọn gây cảm nhiễm kép trên cá tra.

Khả năng gây bệnh và độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* đã được nhiều tác giả trên thế giới nghiên cứu (Petrie-Hanson *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009; Suanyuk *et al.*, 2014). Nhìn chung, hầu hết các nghiên cứu trước đây và trong nghiên cứu này đều cho thấy các chủng vi khuẩn khác nhau sẽ có khả năng gây bệnh và độc lực gây bệnh khác nhau trên các loài cá. Thí nghiệm của Plumb and Hilge (1987) trên cá da trơn Châu Âu (*Silurus glanis*) cho thấy ở mật độ tiêm  $2,27 \times 10^5$  CFU/cá đã gây chết 100% cá thí nghiệm và đã xác định giá trị  $LD_{50}$  là  $7,1 \times 10^4$  CFU/cá. Trong khi đó, nghiên cứu của Ye *et al.* (2009) cho thấy chủng vi khuẩn *E. ictaluri* LH51 đã gây chết 100% cá cá bô đen khi ngâm và tiêm với mật số vi khuẩn lần lượt là  $1,2 \times 10^6$  CFU/mL và  $2,0 \times 10^5$  CFU/cá. Nghiên cứu về độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh trên cá tra ở ĐBSCL của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2009) cho thấy các chủng vi khuẩn thí nghiệm có độc lực cao nhất là  $<10^2$  CFU/mL và thấp nhất là  $10^6$  CFU/mL. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này đã xác định chủng *E. ictaluri* có độc lực cao nhất là  $10^3$  CFU/mL và thấp nhất là  $10^4$  CFU/mL. Kết quả này cho thấy vi khuẩn trong thí nghiệm có độc lực rất cao (gây chết cá trên 80%) so với các nghiên cứu trước đây. Thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra của Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh (2010) cũng cho thấy chủng *E. ictaluri* Ei1 gây chết cá với tỷ lệ cao nhất (100%) ở mật số  $<10^2$  CFU/mL, trong khi đó chủng *E. ictaluri* Ei4 ở mật số  $6,4 \times 10^5$  CFU/mL gây chết với tỷ lệ thấp nhất (53%). Kết quả nghiên cứu của Liu *et al.* (2010) ở Trung Quốc cho thấy chủng vi khuẩn *E. ictaluri* HSN-1 có thể gây chết 100% cá thí nghiệm, trong khi chủng HAS-1 thì chỉ gây chết cá cao nhất là 62,5%. Ngoài ra, kết quả của thí nghiệm này cũng đã xác định chủng *E. ictaluri* HAS-1 có giá trị  $LD_{50}$  là  $0,2 \times 10^{4,7}$  CFU/mL. Trong khi đó, nghiên cứu của Geng and Wang (2013) cho thấy 2 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* LW101 và LW102 đều có độc lực gây bệnh trên cá *Silurus soldatovi meridionalis* ở Trung Quốc. Tỷ lệ cá chết tích lũy đối với chủng LW101 là

100%, 95%, 60%, và 15% tương ứng với nồng độ tiêm vi khuẩn lần lượt là  $1,0 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $1,0 \times 10^5$  và  $1,0 \times 10^4$  CFU/cá, đối với chủng LW102 thì tỷ lệ cá chết tích lũy lần lượt là 100%, 100%, 65% và 10%. Ngoài ra, thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm và ngâm của Suanyuk *et al.* (2014) trên oài cá da trơn lai giữa 2 loài *Clarias macrocephalus* (Gunther) và *Clarias gariepinus* (Burchell) ở Thái Lan với vi khuẩn *E. ictaluri* cho thấy vi khuẩn gây chết cá với tỷ lệ dao động từ 23% đến 100% sau 14 ngày cảm nhiễm. Kết quả thí nghiệm này cũng đã xác định độc lực của vi khuẩn trong phương pháp ngâm ở 168 giờ với giá trị LD<sub>50</sub> là  $6,92 \times 10^7$  CFU/mL, đối với phương pháp tiêm ở 96 giờ là  $1,58 \times 10^6$  CFU/cá.

#### **4.2.2 Kết quả cảm nhiễm các chủng vi khuẩn *A. hydrophila***

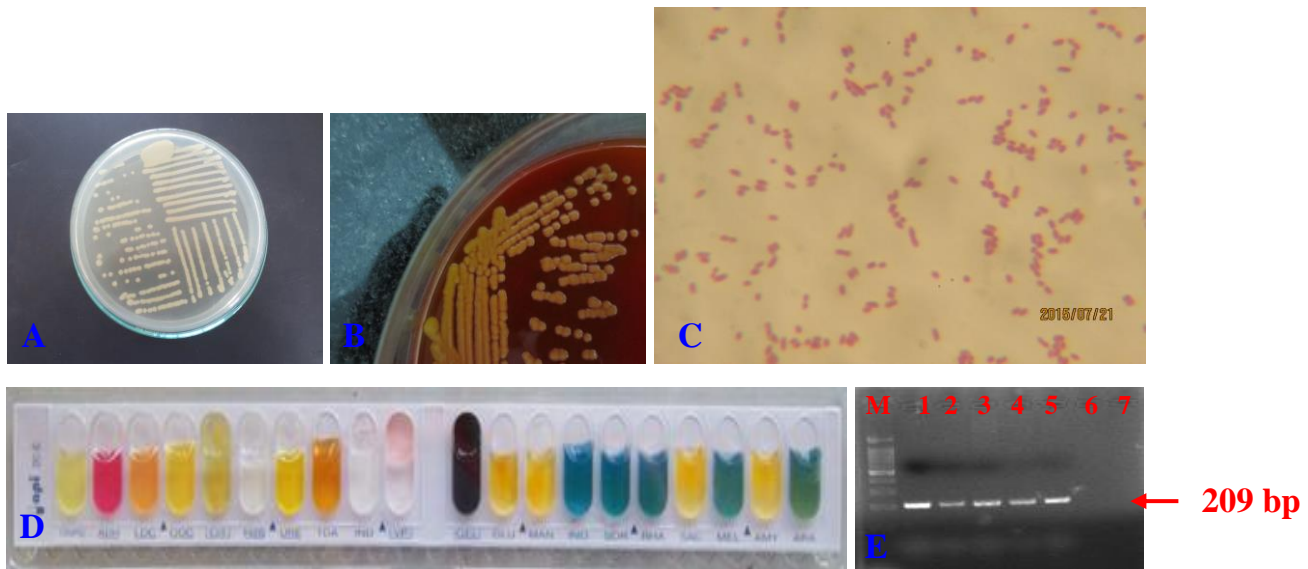
##### **4.2.2.1 Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn**

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ cá sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* đều có màu vàng kem, tròn khi cấy lên môi trường TSA/GSP (Hình 4.11A&B). Bên cạnh đó, khi kiểm tra các đặc điểm về sinh lý và sinh hóa cho thấy vi khuẩn có hình que ngắn, Gram âm (Hình 4.11C), di động, cho phản ứng oxidase và catalase dương tính. Kết quả định danh lại bằng bộ kit API 20E (Hình 4.11D) cũng cho thấy 4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* tái phân lập từ cá bệnh sau khi gây cảm nhiễm đều cho phản ứng âm tính với các chỉ tiêu: ornithine, citrate, H<sub>2</sub>S, urease, tryptophane deaminase, indole, inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose và arabinose; phản ứng dương tính với orthonitrophenyl galactosidase, arginine, lysine, Voges-Proskauer, gelatin, glucose, mannitol, saccharose và amygdalin. Bên cạnh đó, ADN được ly trích từ 1 số mẫu gan, thận và mẫu vi khuẩn sau khi tái phân lập vi khuẩn của cá sau cảm nhiễm cũng cho kết quả dương tính với vạch ADN xuất hiện ở vị trí 209 bp (Hình 4.11E) khi được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR. Như vậy, các kết quả cảm nhiễm trên đã thỏa mãn định đề Koch (Koch's postulates).

##### **4.2.2.2 Dấu hiệu bệnh lý của cá bệnh**

Kết quả cảm nhiễm cho thấy tất cả cá bệnh ở các NT tiêm 4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* đều có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh XH (Hình 4.12C&D). Các dấu hiệu bên ngoài cá bệnh gồm mắt cá hơi lồi, trên da cá xuất hiện các đốm XH nhưng thường tập trung nhiều ở xung quanh miệng, mắt, ở các vây và hậu môn (Hình 4.12C). Đặc biệt, bên trong xoang bụng có dịch màu hồng (Hình 4.12D) và các cơ quan nội tạng cá bệnh như gan, thận và tỳ tạng thường có hiện tượng XH, phình to và nhũn. Trong khi đó, cá ở 2 NT đối chứng (tiêm và không tiêm nước muối sinh lý) thì vẫn hoạt động bình thường, cá không có dấu hiệu của bệnh XH khi quan sát bên ngoài và bên trong cơ thể, đặc biệt là không phát hiện

vi khuẩn phát triển trên môi trường phân lập cũng như KST khi được kiểm tra (Hình 4.12A&B). Như vậy, các dấu hiệu bệnh lý của cá tra sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* tương tự như mô tả của Dung *et al.* (2008), Ly *et al.* (2009) và Crumlish *et al.* (2010). Kết quả cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá nheo xanh/lục (blue catfish, *Ictalurus furcatus*) của Li *et al.* (2013) cũng có các dấu hiệu biểu hiện bệnh bên ngoài như xuất huyết và mất lồi tương tự với vi khuẩn *A. hydrophila* cảm nhiễm trên cá tra trong nghiên cứu này.



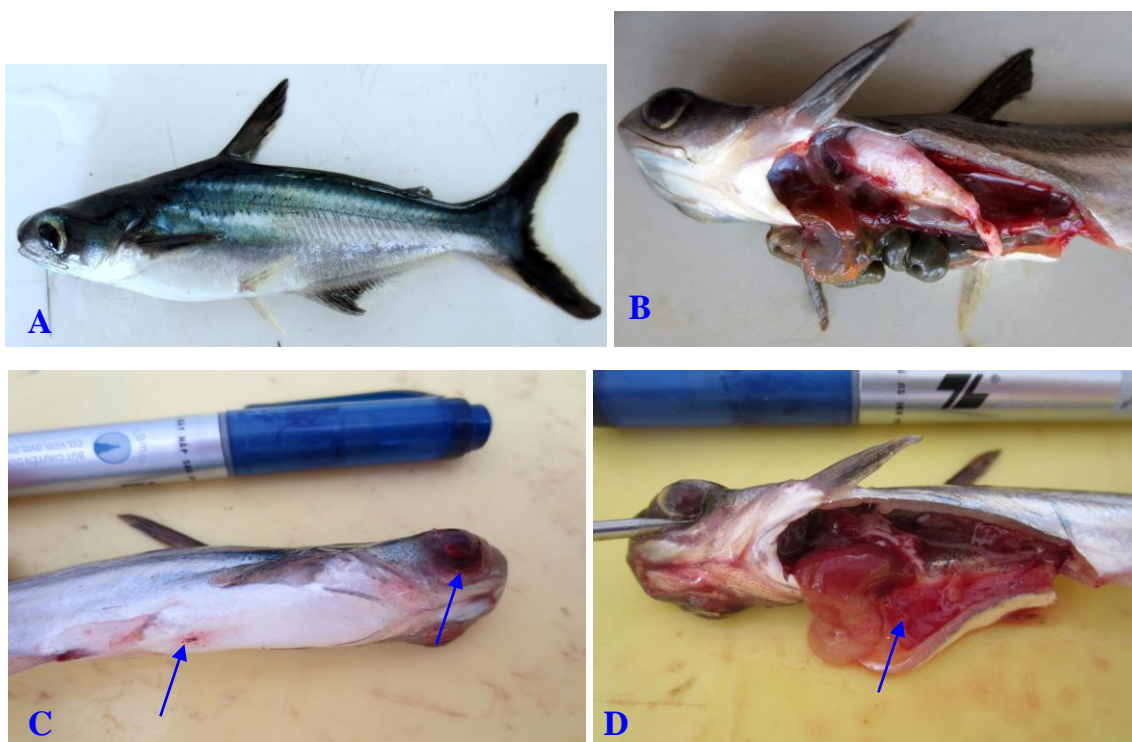
Hình 4.11: Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn *A. hydrophila*. A&B. Khuẩn lạc vi khuẩn *A. hydrophila* phát triển trên môi trường TSA và GSP sau 24 giờ. C. Ảnh nhuộm Gram vi khuẩn (100X). D. Kết quả tái định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E. E. Kết quả tái định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR (M: thang chuẩn 100 bp; giếng 1, 2 và 3: mẫu ADN trích từ vi khuẩn; giếng 4 và 5: mẫu ADN được trích từ thận và tỳ tạng cá bệnh; giếng 6 và 7: mẫu mô thận và gan cá khỏe ở NT đối chứng).

#### 4.2.2.3 Độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila*

Tương tự, độc lực và khả năng gây bệnh của 4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila*: 1A3, 2A3, 4A3 và 5A3 cũng được xác định qua thí nghiệm cảm nhiễm trên cá ở 5 mật độ tiêm vi khuẩn là  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  và  $10^6$  CFU/cá. Kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn trong thí nghiệm đều có độc lực và khả năng gây bệnh cá với tỷ lệ chết rất cao (trên 90%), trong đó các chủng 1A3, 4A3 và 5A3 có tỷ lệ cá chết cao nhất (100%), thấp nhất là chủng 2A3 (93,33%). Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ cá chết tích lũy ở các nồng độ tiêm vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $P < 0,05$ ). Ngoài ra, qua kết quả thí nghiệm còn cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* đều gây chết cá rất sớm (6 giờ sau khi cảm nhiễm), cá chết tập trung ở thời điểm 24 đến 48 giờ

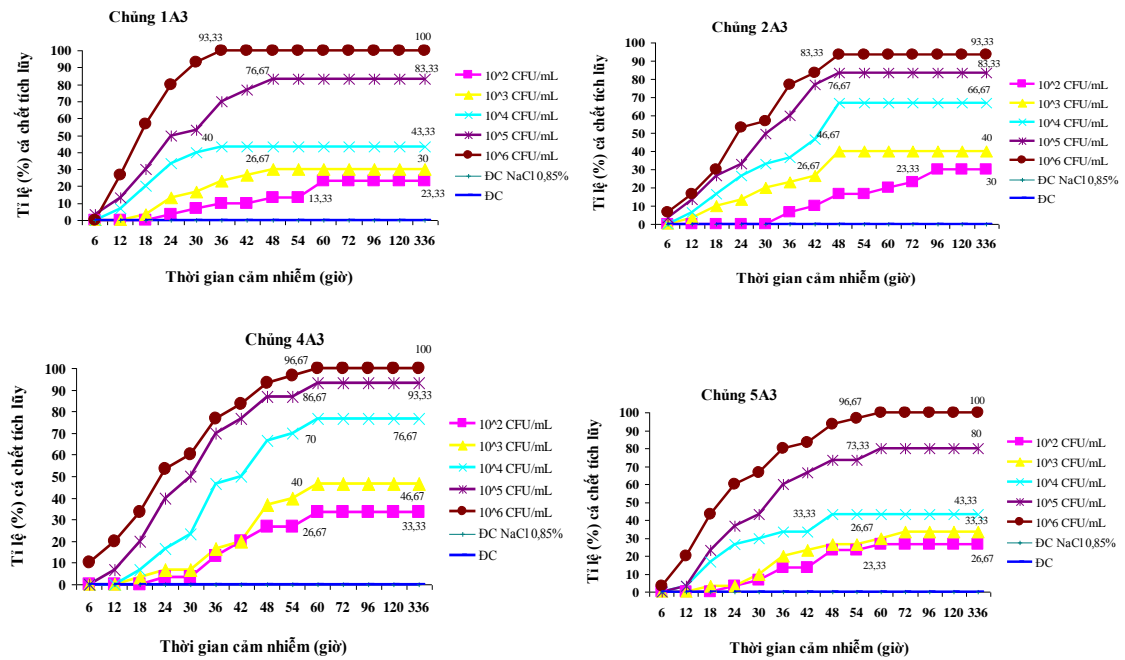


sau khi cảm nhiễm (thường chết cao nhất ở thời điểm 24 giờ), cá ngừng chết ở thời gian 60-72 giờ cho đến khi kết thúc thí nghiệm (Hình 4.13). Thời gian và tỷ lệ cá chết tích lũy của các chủng vi khuẩn được trình bày chi tiết ở Phụ lục L2. Như vậy, qua các kết quả của nghiên cứu này cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* khác nhau sẽ có độc lực và thời gian gây bệnh khác nhau trên các loài cá khi chúng xâm nhiễm. Kết quả cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá nheo Mỹ của Pridgeon and Klesius (2011) cho thấy 3 chủng vi khuẩn trong thí nghiệm cũng gây chết cá rất sớm (6 giờ) và cá chết nhiều ở thời điểm 24 giờ sau cảm nhiễm. Trong khi đó, ở NT đối chứng (tiêm và không tiêm nước muối sinh lý) thì không có cá nào chết trong suốt thời gian theo dõi thí nghiệm. Trong khi đó, kết quả cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá nheo xanh của Li *et al.* (2013) cho thấy vi khuẩn gây chết cá sau 24 giờ.



Hình 4.12: Dấu hiệu biểu hiện bệnh XH của cá tra cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila* chủng 4A3.

A&B. Cá tra ở NT đối chứng (tiêm nước muối sinh lý) với dấu hiệu bên ngoài và bên trong cơ thể bình thường. C. Cá tra cảm nhiễm với chủng 4A3: cá bệnh với dấu hiệu XH ở các vây, vùng mắt (mũi tên). D. Bên trong xoang cơ thể chứa nhiều chất dịch màu đỏ (mũi tên).



Hình 4.13: Tỷ lệ (%) cá chết tích lũy theo thời gian của cá tra cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *A. hydrophila*.

Tóm lại, qua kết quả thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* được chọn có độc lực và khả năng gây bệnh trên cá tra. Qua kết quả của đề tài đã xác định được giá trị LD<sub>50</sub> của 4 chủng vi khuẩn 1A3, 2A3, 4A3 và 5A3 lần lượt là 1,47x10<sup>4</sup>, 2,37x10<sup>3</sup>, 1,29x10<sup>3</sup> và 1,52 x10<sup>4</sup> CFU/mL (Bảng 4.6), trong đó chủng 4A3 có độc lực cao nhất (LD<sub>50</sub> = 1,29x10<sup>3</sup> CFU/mL), kế đến là chủng 2A3 (LD<sub>50</sub> = 2,37x10<sup>3</sup> CFU/mL) và thấp nhất là chủng 5A3 (LD<sub>50</sub> = 1,52 x10<sup>4</sup> CFU/mL).

Bảng 4.6: Giá trị LD<sub>50</sub> của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* cảm nhiễm trên cá tra

Chủng vi khuẩn	Mật độ tiêm vi khuẩn (CFU/mL)	Tỷ lệ (%) cá chết tích lũy	LD <sub>50</sub> (CFU/mL)
1A3	10 <sup>2</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup>	23,33; 30; 43,33; 83,33; 100	1,47x10 <sup>4</sup>
2A3	10 <sup>2</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup>	30; 40; 66,67; 83,33; 93,33	2,37x10 <sup>3</sup>
4A3*	10 <sup>2</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup>	33,33; 46,67; 76,67; 93,33; 100	1,29x10 <sup>3</sup>
5A3	10 <sup>2</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup>	26,67; 33,33; 43,33; 80; 100	1,52 x10 <sup>4</sup>

Chủng vi khuẩn có đánh \* là chủng được chọn gây cảm nhiễm kết hợp trên cá tra.

Cho đến nay, nhiều nghiên cứu về khả năng gây bệnh và độc lực của vi khuẩn *A. hydrophila* trên các loài cá trên thế giới đã được công bố (Azad *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2001; Nusbaum and Morrison, 2002; Crumlish *et al.*, 2010). Nhìn chung, giá trị độc lực và giá trị LD<sub>50</sub> của 4 chủng vi khuẩn *A. hydrpphila*

trong nghiên cứu này cao hơn các nghiên cứu đã được báo cáo. Thí nghiệm cảm nhiễm trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) của Figueirredo and Plumb (1977) cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá bệnh có độc lực (giá trị LD<sub>50</sub> là 6,4x10<sup>4</sup> CFU/mL) mạnh hơn các chủng *A. hydrophila* phân lập từ môi trường bên ngoài (LD<sub>50</sub> là 1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL). Tương tự, thí nghiệm trên cá chình (*Anguilla anguilla*) cũng thu được giá trị LD<sub>50</sub> khá cao (10<sup>5,4</sup>-10<sup>7,2</sup> CFU/mL) (Esteve *et al.*, 1993). Ngoài ra, Sirirat *et al.* (1999) cũng đã xác định được độc lực của các chủng *A. hydrophila* khi cảm nhiễm trên cá trê giống với giá trị LD<sub>50</sub> cao nhất là khoảng 10<sup>5</sup> CFU/mL sau 18 giờ cảm nhiễm. Báo cáo Pridgeon and Klesius (2011) cho thấy 3/4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* gây cảm nhiễm trên cá nheo Mỹ có độc lực tương đối cao, trong đó độc lực của chủng AL09-71 cao nhất với giá trị LD<sub>50</sub> = 1,1 x 10<sup>5</sup> CFU/mL, kế đến là chủng AL09-73 (LD<sub>50</sub> = 1,3 x 10<sup>5</sup> CFU/mL) và sau cùng là chủng AL09-72 (LD<sub>50</sub> = 1,9 x 10<sup>5</sup> CFU/mL) nhưng các giá trị này nếu so với giá trị LD<sub>50</sub> của 4 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này thì vẫn thấp hơn.

Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này cũng có độc lực cao hơn các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* khi cảm nhiễm trên cá tra. Kết quả này có thể là do vi khuẩn thuộc giống *Aeromonas* nói chung và vi khuẩn *A. hydrophila* nói riêng có nhiều gen độc lực khác nhau so với vi khuẩn *E. ictaluri*. Nhiều nghiên cứu đã xác định các gen độc lực ở vi khuẩn *Aeromonas* mã hóa cho các protein gây độc như haemolysin, aerolysin, serine protease, enterotoxins (gồm các gen *hlyA*, *aerA*, *ahpA*, *alt* và *ast*) (Chacon *et al.*, 2002; Aguilera-Arreola *et al.*, 2003; Nawaz *et al.*, 2010; Sharma and Kumar, 2012). và các chủng vi khuẩn *Aeromonas* có những gen trên được chứng minh là những chủng có độc lực cao (Biscardi *et al.*, 2002; Sha *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012). Ngoài ra, độc lực của vi khuẩn *Aeromonas* còn liên quan đến các plasmid (Borrego *et al.*, 1991; Hanes *et al.*, 1993; Vadivelu *et al.*, 1995). Kết quả nghiên cứu của Majumdar *et al.* (2007) cho thấy plasmid của vi khuẩn *A. hydrophila* khi bị xử lý (làm mất đi plasmid bằng ethidium bromide ở nồng độ 30 µg/mL) đã làm cho vi khuẩn không thể gây bệnh UDS (ulcerative disease syndrome) trên cá trê trắng (*C. Batrachus*) ở Ấn Độ. Trong khi đó, ở vi khuẩn *E. ictaluri* thì cho đến nay các nghiên cứu về gen độc lực của vi khuẩn này vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu của William and Lawrence (2005) đã xác định 2 gen hemolysin *eihA* và *eihB* của vi khuẩn *E. ictaluri*. Trong các nghiên cứu của Waltman *et al.* (1985) và Stanley *et al.* (1994) đã chứng minh chủng vi khuẩn có enzyme chondroitinase (enzyme này có chức năng phân hủy chondroitin sulfate, thành phần chính trong sụn) sẽ có độc lực mạnh hơn các chủng vi khuẩn không có

hoạt tính chondroitinase. Ngoài ra, các nhân tố khác liên quan độc lực vi khuẩn *E. ictaluri* cũng đã được báo cáo như các chuỗi O-polysaccharide (Lawrence *et al.*, 2001&2003), hoạt tính urease (Booth *et al.*, 2006), hệ thống TTSS (type III secretion systems) (Thune *et al.*, 2007). Trong nghiên cứu này, ngoài gen aerolysin được xác định ở vi khuẩn *A. hydrophila* và gen bám dính ở vi khuẩn *E. ictaluri* thì các gen độc lực trên ở 2 loài vi khuẩn này không được thực hiện. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để xác định các gen độc lực và vai trò của plasmid liên quan đến quá trình gây bệnh của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* nhằm làm sáng tỏ vấn đề trên.

### 4.3 Đặc điểm bệnh học cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* trên cá tra

#### 4.3.1 Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn

Nhìn chung, tất cả cá có dấu hiệu biểu hiện kết hợp của bệnh GTM và XH sau khi nhiễm kép (Hình 4.14A) ở các NT đều phân lập được 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên môi trường TSA (Hình 4.14B và Bảng 4.7). Ngoài ra, cá có biểu hiện bệnh GTM hoặc XH ở phương pháp ngâm thì chỉ phân lập được hoặc vi khuẩn *E. ictaluri* hoặc *A. hydrophila* (Bảng 4.7). Trong khi đó, 1 số cá ở các NT tiêm có dấu hiệu bệnh GTM hoặc XH thì phân lập được cả 2 loại vi khuẩn trên, ngoại trừ 1 số cá bệnh GTM ở NT TK3 không phân lập được vi khuẩn *A. hydrophila* (Bảng 4.7) do vi khuẩn *A. hydrophila* tiêm sau vi khuẩn *E. ictaluri*. Cá chết ở 2 NT đối chứng thì không có dấu hiệu biểu hiện của bệnh GTM cũng như bệnh XH và cũng không phân lập được vi khuẩn.

Bảng 4.7: Số lượng cá chết tích lũy và kết quả phân lập vi khuẩn trong thí nghiệm cảm nhiễm kép bằng phương pháp ngâm và tiêm

NT	Cá chết biểu hiện bệnh GTM			Cá chết biểu hiện bệnh XH			Cá chết biểu hiện bệnh GTM+XH	
	Số cá	E*. <i>ictaluri</i>	A*. <i>hydrophila</i>	Số cá	A*. <i>hydrophila</i>	E*. <i>ictaluri</i>	Số cá	E. <i>ictaluri</i> + A. <i>hydrophila</i> *
NK3	4/28	4/4	0/4	9/28	9/9	0/9	15/28	15/15
TK1	1/25	1/1	0	16/25	16/16	5/16	8/25	8/8
TK2	3/24	3/3	2/3	9/24	9/9	3/9	12/24	12/12
TK3	4/26	4/4	0	5/26	5/5	1/5	17/26	17/17
TK4	8/28	8/8	1/8	3/28	3/3	2/3	17/28	17/17
TK5	7/29	7/7	2/6	1/29	1/1	1/1	21/29	21/21

\* Kết quả tái phân lập vi khuẩn sau cảm nhiễm. NK3: Ngâm cá tra với chủng 1ED3 ( $10^6$  CFU/mL) + chủng 4A3 ( $10^5$  CFU/mL). TK1: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* trước khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 12 giờ. TK2: Tiêm cùng lúc vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. TK3: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 24 giờ. TK4: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 48 giờ. TK5: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 72 giờ.

Hai chủng vi khuẩn 1ED3 và 4A3 sau khi được phân lập và làm thuần từ cá tra nhiễm kép cũng được kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa theo các phương pháp sinh hóa và bằng bộ kit API 20E đã trình bày ở trên. Kết quả cho thấy 2 chủng vi khuẩn có đặc điểm hoàn toàn giống với chủng vi khuẩn được sử dụng để cảm nhiễm cá (kết quả kiểm tra không được trình bày lại trong phần này). Ngoài ra, 1 số mẫu mô gan/thận của cá nhiễm kép đều cho kết quả dương tính với 2 loài vi khuẩn khi được kiểm tra bằng kỹ thuật duplex-PCR với sự xuất hiện 2 vạch ADN ở kích thước 209 bp và 470 bp (Hình 4.14C).

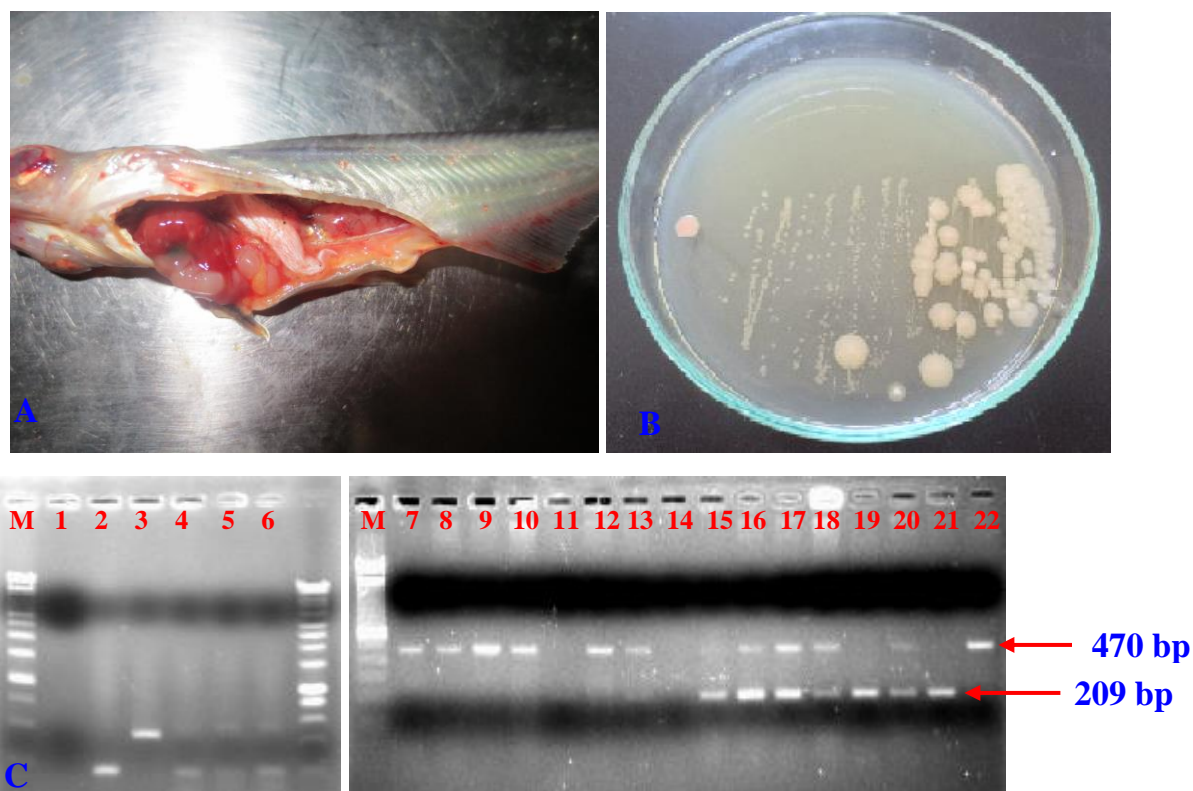
### **4.3.2 Dấu hiệu bệnh lý của cá bệnh**

#### **4.3.2.1 Dấu hiệu bên ngoài**

Cá bệnh sau khi cảm nhiễm kép 2 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (4A3) và *E. ictaluri* (1ED3) bằng phương pháp ngâm và tiêm có các dấu hiệu chung như cá sắp chết nổi lơ lờ trên mặt nước; nhào lộn và xoay tròn, ngứa bụng, thả trôi theo dòng nước rồi chìm xuống đáy và cá chết thường có da hơi nhợt nhạt so với cá bình thường. Bên cạnh đó, mang cá bệnh đa số đều chuyển sang màu đỏ nhạt so với cá khỏe mạnh (màu đỏ đậm). Quan sát biểu hiện bên ngoài của cá bệnh do nhiễm kép thường có các dấu hiệu như mắt cá hơi lồi (Hình 4.15A); các vây thường có dấu hiệu XH (Hình 4.15A); XH bên ngoài cơ thể: các đốm XH xuất hiện rải rác trên cơ thể cá, tập trung ở vùng bụng, ở các vây, xung quanh hậu môn, miệng hoặc XH mắt, đặc biệt 1 số trường hợp hiện tượng XH xuất hiện khắp cơ thể của cá bệnh (Hình 4.15B).

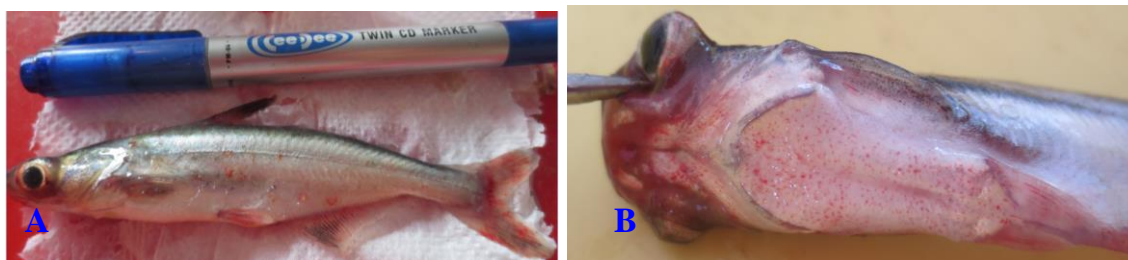
#### **4.3.2.2 Dấu hiệu bên trong**

Giải phẫu và quan sát nội quan cá sau khi cảm nhiễm kép ở 2 phương pháp ngâm và tiêm cho thấy xoang bụng của cá thường có chứa dịch lỏng màu hồng hay màu đỏ (Hình 4.16A). Ở giai đoạn đầu mới nhiễm bệnh thì những đốm trắng (do vi khuẩn *E. ictaluri*) chưa xuất hiện, xuất hiện chưa rõ hay chỉ xuất hiện trên thận hoặc tỳ tạng của cá. Các trường hợp cá bệnh nặng thì gan, thận và tỳ tạng cá bệnh thường phình to, mềm và nhũn (Hình 4.16A&B) và xuất hiện những đốm trắng (đường kính 1-2 mm) phân bố khắp ở các cơ quan này. Kết quả quan sát thí nghiệm ghi nhận đối với phương pháp ngâm thì hầu hết các dấu hiệu của cá nhiễm kép biểu hiện rõ hơn so với cá được cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm nhưng nhìn chung cá bệnh ở 2 phương pháp ngâm và tiêm đều có dấu hiệu tương tự nhau.



Hình 4.14: Kết quả tái phân lập và định danh 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* sau khi cảm nhiễm kết hợp trên cá tra.

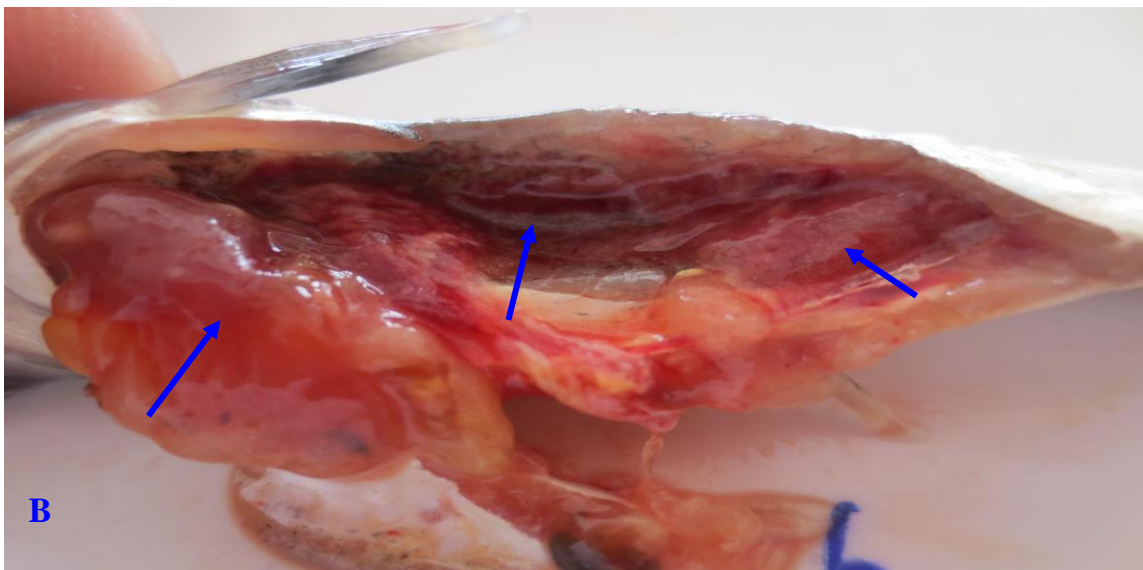
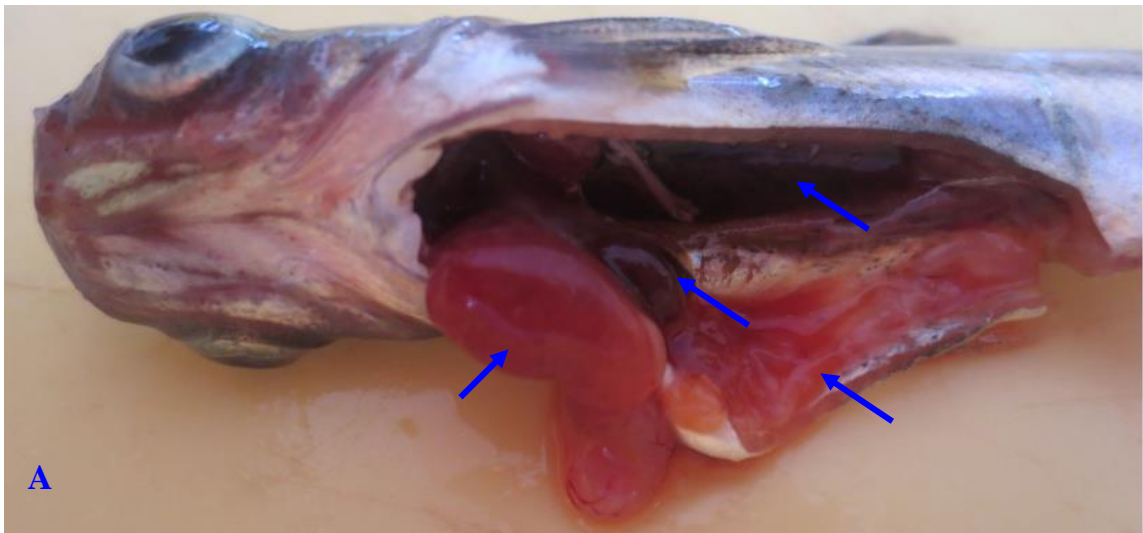
A. Cá tra nhiễm kép vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở NT ngâm. B. Khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập từ cá tra nhiễm kép phát triển trên môi trường TSA sau 48 giờ. C. Kết quả kiểm tra sự hiện diện của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ mô gan/thận cá nhiễm kép được phát hiện bằng kỹ thuật PCR (M: thang chuẩn 100 bp; giếng 1: mẫu mô cá đối chứng; giếng 2 và 3 mẫu thận cá bệnh XH và GTM; giếng 4, 5 và 6: mẫu thận cá nhiễm kép bằng phương pháp tiêm; giếng 7-22: kết quả kiểm tra mẫu mô thận/gan cá nhiễm kép ở phương pháp ngâm; giếng 11 và 14 mẫu mô thận cho kết quả âm tính).



Hình 4.15: Các dấu hiệu bên ngoài của cá bệnh do nhiễm kép 2 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (4A3) và *E. ictaluri* (1ED3).

A. XH xuất hiện trên rai rác trên thân, ở vùng đầu, mắt, các vây và hậu môn cá bệnh (cá ở NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau 24 giờ tiêm *E. ictaluri*). B. Nhiều điểm XH xuất hiện khắp trên cơ thể cá (cá ở NT ngâm).





Hình 4.16: Dấu hiệu bên trong cá cảm nhiễm kép 2 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (4A3) và *E. ictaluri* (1ED3).

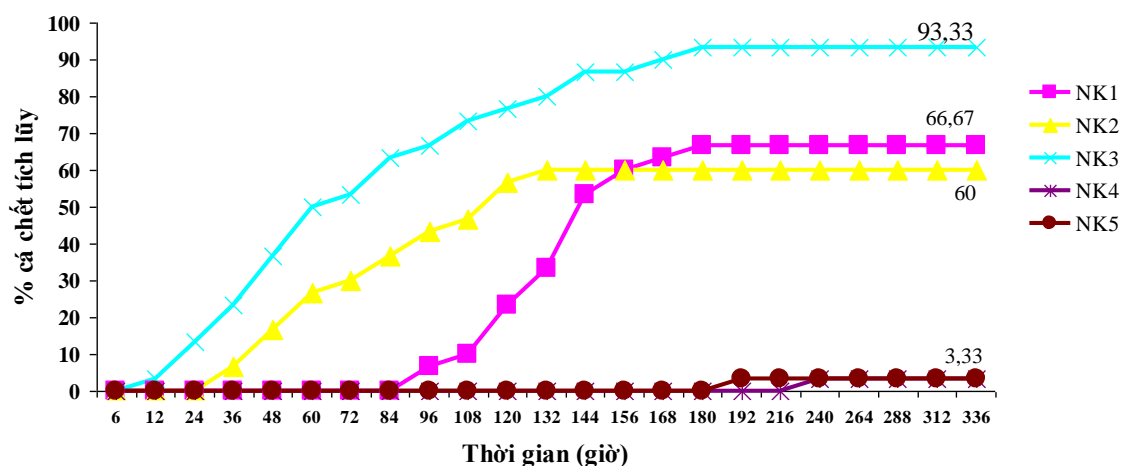
A. Gan, tỷ tạng phình to; thận bị nhũn và xong bụng chứa nhiều dịch màu hồng (mũi tên). B. Gan, thận và tỷ tạng nhũn, hoại tử và tiết nhiều chất dịch trong xoang bụng (mũi tên).

### 4.3.3 Khả năng gây bệnh khi gây cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn

#### 4.3.3.1 Kết quả cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm

Nhìn chung, qua kết quả thí nghiệm cho thấy việc kết hợp 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đã gia tăng độc lực gây bệnh của vi khuẩn với thời gian bệnh xuất hiện sớm hơn so với phương pháp nhiễm đơn (Hình 4.17). Cụ thể, thời gian gây bệnh của NT nhiễm kép là 12 giờ, trong khi ở NT ngâm chủng 1ED3 và 4A3 thì thời gian vi khuẩn bắt đầu gây chết cá lần lượt là 96 giờ và 36 giờ. Bên cạnh đó, tỷ lệ cá chết tích lũy ở NT nhiễm kép cũng cao hơn (93,33%) so với 2 NT nhiễm đơn, đối với chủng 1ED3 là 66,67% và chủng 4A3 là 60% (Hình 4.17). Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ cá chết tích lũy ở các NT ngâm kép 2 loài vi

khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $P < 0,05$ ) so với NT ngâm đơn (Phụ lục M). Ở NT đối chứng (cá ngâm nước muối sinh lý) đều có cá chết. Tuy nhiên, kết quả quan sát cho thấy cá chết không có dấu hiệu bệnh của 2 loài vi khuẩn và kết quả tái phân lập cũng không có vi khuẩn. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo thời gian sau cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* bằng phương pháp ngâm được trình bày chi tiết ở Phụ lục N.



Hình 4.17: Tỷ lệ (%) cá chết tích lũy qua các ngày cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra bằng phương pháp ngâm.

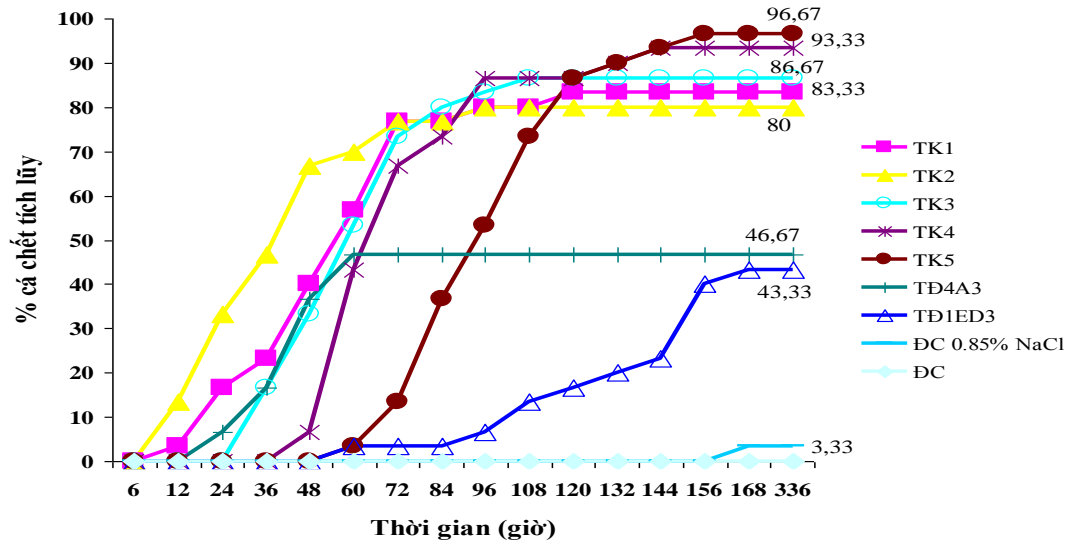
NK1: Ngâm cá tra với chủng IED3 ( $10^6$  CFU/mL). NK2: Ngâm cá tra với chủng 4A3 ( $10^5$  CFU/mL). NK3: Ngâm cá tra với chủng IED3 ( $10^6$  CFU/mL) + chủng 4A3 ( $10^5$  CFU/mL). NK4: Đối chứng ngâm nước muối sinh lý NaCl 0,85%. NK5: Đối chứng không ngâm nước muối sinh lý NaCl 0,85%.

#### 4.3.3.2 Kết quả cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm

Kết quả thí nghiệm cho thấy việc cảm nhiễm kép bằng phương pháp tiêm cũng làm tăng độc lực của vi khuẩn với tỷ lệ cá chết cao hơn so với phương pháp tiêm đơn (Hình 4.18). Qua kết quả ở Hình 4.18 cho thấy sau 7 ngày tiêm vi khuẩn thì cá cảm nhiễm ở 2 NT TK4 và TK5 có tỷ lệ cá chết tích lũy cao nhất lần lượt là 96,67% và 93,33%, kế đến là NT TK3 (86,67%) và TK1 (83,33%) và thấp nhất là NT TK2 (80%). Bên cạnh đó, kết quả của thí nghiệm còn cho thấy cá chết mạnh ở các NT sau khi tiêm vi khuẩn *A. hydrophila*, trong đó cá chết tập trung và nhiều nhất là từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 5 (đặc biệt ở các NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm *E. ictaluri* 48 và 72 giờ), sau đó cá chết giảm dần và từ ngày thứ 7 trở đi không thấy xuất hiện cá chết cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Tuy nhiên, kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ cá chết tích lũy giữa các NT khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,005$ ) (Phụ lục O). Trong khi đó, cá ở 2 NT đối chứng tiêm và không tiêm nước muối sinh lý đều hoạt động bình thường cho đến



khi kết thúc thí nghiệm, ngoại trừ có 1 cá chết ở NT tiêm nước muối sinh lý. Tuy nhiên, không phân lập được vi khuẩn từ cá chết và cá chết cũng không có các biểu hiện của bệnh GTM hoặc XH. Ngoài ra, các chỉ tiêu môi trường như nhiệt độ và pH không có sự thay đổi đáng kể. Như vậy, cá chết có thể do nguyên nhân khác. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo thời gian sau khi cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* bằng phương pháp tiêm được trình bày chi tiết trong Phụ lục P.



Hình 4.18: Tỷ lệ cá (%) cá chết tích lũy qua các ngày cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra bằng phương pháp tiêm.

TK1: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* trước khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 12 giờ. TK2: Tiêm cùng lúc vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. TK3: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 24 giờ. TK4: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 48 giờ. TK5: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 72 giờ. TK6: Đối chứng tiêm nước muối sinh lý NaCl 0,85%. TK7: Đối chứng không tiêm nước muối sinh lý NaCl 0,85%. TĐ4A3: Tiêm cá tra với chủng 4A3 ở mật số  $10^3$  CFU/cá. TĐ1ED3: Tiêm cá tra với chủng 1ED3 ở mật số  $10^4$  CFU/cá.

Như vậy, qua các NT thí nghiệm trên cho thấy việc cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đã làm tăng độc lực gây bệnh của 2 loài vi khuẩn so với phương pháp cảm nhiễm đơn. Điều này dẫn đến kết quả bệnh trên cá tra bộc phát mạnh và tỷ lệ cá chết cao. Đó là lý do giải thích tại sao cá ngoài ao nuôi tự nhiên lại chết nhanh và có tỷ lệ chết cao sau khi nhiễm cùng lúc 2 loài vi khuẩn này. Như vậy, tác dụng hiệp lực của 2 loài vi khuẩn nhiễm kép trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của nhiều tác giả. Nghiên cứu của Dong *et al.* (2015) cho thấy tỷ lệ cá chết tích lũy ở NT ngâm hay tiêm kép 2 loài vi khuẩn *F. columnare* và *E. ictaluri* trên cá tra ở Thái Land cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với NT ngâm/tiêm đơn *F. columnare* hay *E. ictaluri*. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác còn cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* khi

cảm nhiễm kết hợp với các vi khuẩn khác sẽ làm tăng độc lực gây bệnh trên cá được cảm nhiễm. Kết quả nghiên cứu của Nusbaum and Morrison (2002) cho thấy cá nheo sẽ bộc phát bệnh mạnh và các dấu hiệu lâm sàng của bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* sẽ trở nên rõ ràng hơn khi có sự xuất hiện và hiện diện của vi khuẩn *A. hydrophila*. Nghiên cứu của Đặng Thụy Mai Thy và *ctv.* (2012) cũng cho thấy khi tiêm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. trên cá rô đồng thì tỷ lệ chết của cá sẽ tăng lên đáng kể (90%) so với NT tiêm riêng biệt từng chủng vi khuẩn (25% và 45%). Thí nghiệm gây cảm nhiễm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* bằng phương pháp ngâm và tiêm của Crumlish *et al.* (2010) trên cá tra cũng cho kết quả tương tự. Trong cả 2 phương pháp được thực hiện thì tỷ lệ cá chết ở NT chỉ tiêm *A. hydrophila* hoặc *E. ictaluri* luôn thấp hơn đáng kể so với NT tiêm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

Trong quá trình thí nghiệm cảm nhiễm thì nhiệt độ và pH của nước được duy trì ổn định ở các thí nghiệm cảm nhiễm đơn (Phụ lục Q1) và cảm nhiễm kép (Phụ lục Q2). Nhìn chung, các giá trị này hầu như không có sự biến động lớn (nhiệt độ dao động trong khoảng  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  và  $\text{pH} = 7,8 \pm 3$ ). Điều này cho thấy các yếu tố của môi trường bên ngoài không ảnh hưởng đến sự thay đổi nhiệt độ và pH của môi trường nước nên có thể khẳng định cá chết ở các NT là do vi khuẩn cảm nhiễm gây ra. Mặt khác, ở nhiệt độ và pH của nước như trên là điều kiện thích hợp để vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sinh trưởng và phát triển nên làm tăng tỷ lệ chết của cá thí nghiệm. Theo Plumb and Vininantharat (1989) thì vi khuẩn *E. ictaluri* phát triển tốt ở nhiệt độ  $28-30^\circ\text{C}$  và pH là 7,0-7,5. Trong khi đó, vi khuẩn *A. hydrophila* thuộc nhóm vi khuẩn ưa nhiệt độ trung bình, có thể phát triển tốt ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ . Nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* có thể phát triển tốt nhất ở nhiệt độ dao động từ  $20-35^\circ\text{C}$  (Popoff, 1984; Palumbo *et al.*, 1985), trong khi giá trị pH không ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của chúng (Sautour *et al.*, 2003).

Trong thí nghiệm cảm nhiễm xác định độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*, các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* mặc dù có mật số vi khuẩn tiêm cho cá tra thấp hơn so với vi khuẩn *E. ictaluri* nhưng có thời gian gây bệnh trên cá tra sớm hơn (thường sau 6 giờ so với 24 giờ ở vi khuẩn *E. ictaluri*) và tỷ lệ gây chết cá cũng cao hơn (trung bình 81,9% so với 77,8% ở vi khuẩn *E. ictaluri*). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Crumlish *et al.* (2010) cho thấy tỷ lệ cá chết ở các NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* (kể cả phương pháp ngâm vi khuẩn) lại thấp hơn so với các NT tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* nhưng thời gian vi khuẩn *A. hydrophila*

gây bệnh là ngày 2 so với ngày 4 ở vi khuẩn *E. ictaluri*. Như vậy, thời gian gây bệnh của vi khuẩn *A. hydrophila* sớm hơn vi khuẩn *E. ictaluri* do độc lực của chúng mạnh hơn vi khuẩn *E. ictaluri*.

Trong các thí nghiệm cảm nhiễm kết hợp 2 loại vi khuẩn hoặc cảm nhiễm riêng từng loại vi khuẩn cho thấy cá tra cảm nhiễm nhân tạo có các dấu hiệu của bệnh gan thận mủ và bệnh xuất huyết giống với các đặc điểm cá nhiễm bệnh ngoài tự nhiên. Vì vậy, các kết quả của cảm nhiễm trong nghiên cứu này đã thỏa mãn định đề Koch. Nghiên cứu của Crumlish *et al.* (2010) cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* chỉ được phân lập từ cá ở các NT có tiêm vi khuẩn này, trong khi vi khuẩn *A. hydrophila* không chỉ thu được từ cá có tiếp xúc với vi khuẩn này mà còn phân lập được từ cá ở các NT chỉ tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*. Kết quả tương tự cũng được báo cáo trong nghiên cứu của Nusbaum and Morrison (2002). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này thì chỉ phân lập được vi khuẩn *A. hydrophila* từ cá được cảm nhiễm hay tiếp xúc với khuẩn này (gồm nhiễm đơn và nhiễm kết hợp) mà không thu được vi khuẩn từ các NT chỉ gây cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*.

Trong nghiên cứu này, việc tiêm cùng lúc 2 loài vi khuẩn trên cá tra đã làm cho cá có tỷ lệ chết thấp hơn so với các NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* trước và sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*. Điều này có thể là do sự cạnh tranh giữa vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* nên chúng làm giảm độc lực của nhau. Còn ở các NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* có tỷ lệ cá chết là do khi cá bị nhiễm một loại bệnh thì độc lực của bệnh đó sẽ tác động lên cá. Nhưng sau đó, cá này lại nhiễm tiếp tục 1 bệnh khác thì lúc này độc lực do vi khuẩn nhiễm trước và nhiễm sau sẽ đồng thời tác động lên cá làm cho cá chết cao. Mặt khác, vi khuẩn *A. hydrophila* là tác nhân cơ hội (Crumlish *et al.*, 2010) thường gây bệnh khi vật chủ có hệ miễn dịch bị suy yếu hoặc bị stress (Roberts, 1993). Do đó, khi vi khuẩn *E. ictaluri* xâm nhiễm vào cá tra trước thì có thể chúng đã làm suy giảm 1 phần khả năng miễn dịch của cá tra, tạo điều kiện cho vi khuẩn *A. hydrophila* phát triển và làm bùng phát dịch bệnh. Nghiên cứu của Nusbaum and Morrison (2002); Crumlish *et al.* (2010); Đặng Thụy Mai Thy và *ctv.* (2012) cũng cho kết quả tương tự, khi có sự hiện diện của 2 loài vi khuẩn sẽ làm gia tăng độc lực gây bệnh của chúng lên vật chủ sẽ bộc phát và sẽ làm cho bệnh phát triển mạnh hơn.

#### **4.3.4 Kết quả quan sát mẫu bằng phết kính tiêu bản tươi**

Quan sát mẫu phết kính tiêu bản tươi (nhuộm Wright-Giemsa) của cá bệnh ở các NT nhiễm kép cho thấy trên vùng mô phết kính đều xuất hiện 2 dạng vi khuẩn hình que: dạng que ngắn (*A. hydrophila*) và dạng que dài, mảnh (*E.*

*ictaluri*) nằm rải rác hay tập trung thành từng cụm trên các vùng mô phết kính của các cơ quan như mang, gan thận, tỳ tạng và mô da-cơ (Hình 4.19B). Trong khi ở NT đối chứng thì không có vi khuẩn hiện diện trên vùng phết kính vào ngày thu mẫu cuối cùng (Hình 4.19A).

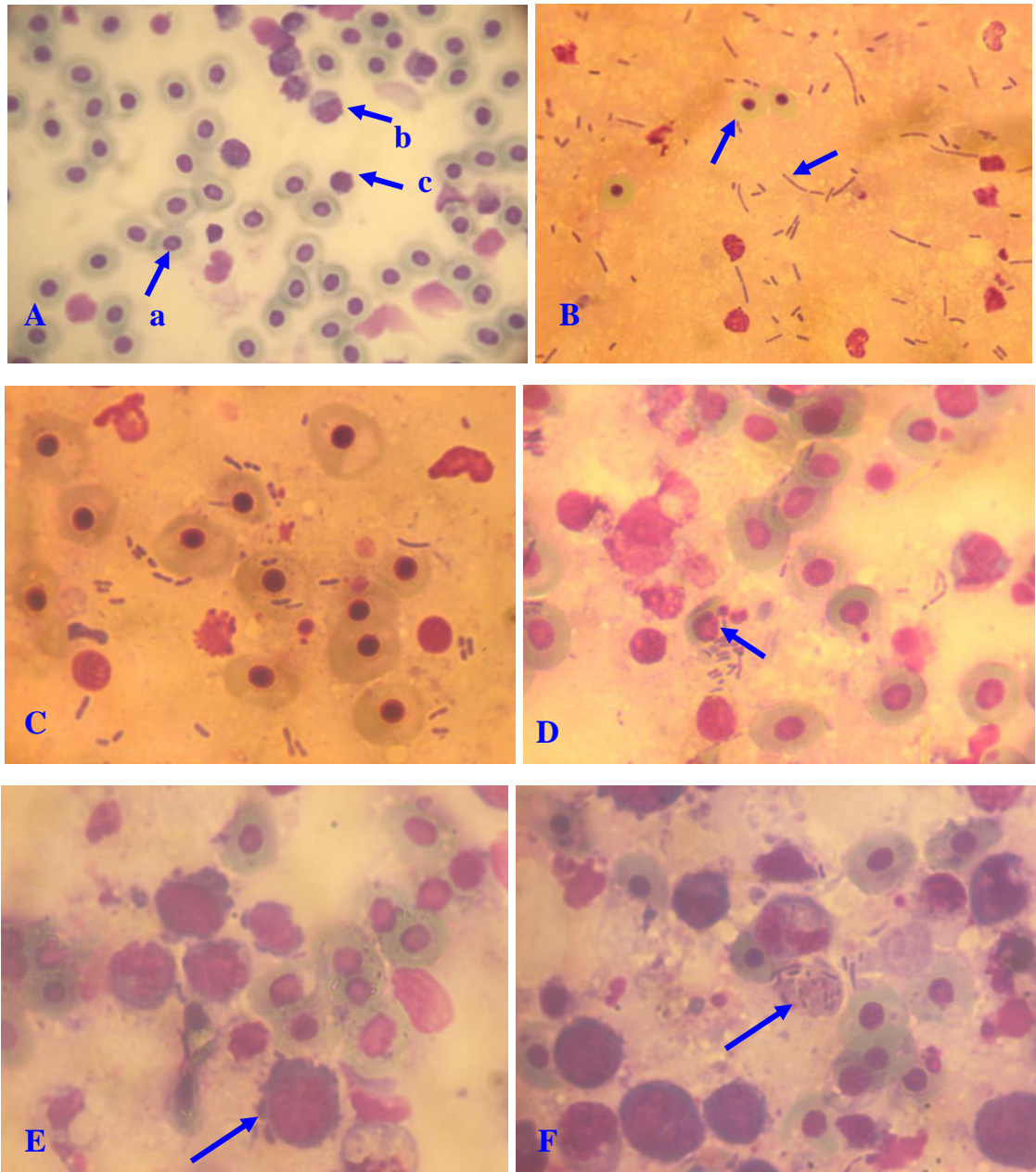
Vi khuẩn thường xuất hiện nhiều ở các cơ quan gan, thận và tỳ tạng, trong khi mô da-cơ và mang thì vi khuẩn thường xuất hiện ít hơn. Đối với NT ngâm thì tất cả cá biểu hiện 2 bệnh đều xuất hiện cả 2 loài vi khuẩn trên vùng mô. Tuy nhiên, ở các mẫu chỉ biểu hiện bệnh GTM hoặc XH thì trên vùng mô thường cũng chỉ xuất hiện vi khuẩn *E. ictaluri* hoặc *A. hydrophila*. Trong khi đó, kết quả phết kính ở NT tiêm cho thấy ở NT tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* trước thì trên vùng mô chỉ có vi khuẩn *A. hydrophila*, trong khi ở NT chưa tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* thì mẫu cá phết kính chỉ có sự xuất hiện của vi khuẩn *E. ictaluri*, riêng NT tiêm cùng lúc 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* thì có cả 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Tuy nhiên, 1 số trường hợp cá ở các NT tiêm lại có hiện diện cả 2 loài vi khuẩn trên vùng mô mặc dù biểu hiện bệnh chỉ 1 trong 2 bệnh trên. Ngoài ra, ở thời gian ban đầu thí nghiệm thì vi khuẩn xuất hiện ít hơn ở thời gian càng về cuối thí nghiệm. Nhiều mẫu phết kính cho thấy vi khuẩn bao quanh tế bào hồng cầu (Hình 4.19C) và chúng tấn công phá vỡ màng tế bào hồng cầu (Hình 4.19D). Bên cạnh đó, quan sát trên mô thận phết kính cho thấy nhiều tế bào vi khuẩn bao quanh các tế bào bạch cầu (Hình 4.19E). Đặc biệt, hiện tượng thực bào vi khuẩn của các đại thực bào (Hình 4.19F) cũng tham gia vào hệ thống miễn dịch của cơ thể, chống lại các tác nhân gây bệnh.

### **4.3.5 Biến đổi cấu trúc mô của 1 số cơ quan cá bệnh**

#### **4.3.5.1 Biến đổi cấu trúc mô da-cơ**

Cấu trúc mô da-cơ cá tra gồm lớp biểu bì bên ngoài, kế đến là lớp tế bào hắc tố, lớp hạ bì và lớp cơ (Hình 4.20A). Da cá có chức năng bảo vệ cơ thể không bị tổn thương và là hàng rào vật lý ngăn chặn các tác nhân gây bệnh. Qua khảo sát mô da-cơ của cá bệnh khi gây cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở các NT cho thấy cấu trúc mô ít biến đổi so với mô cá khỏe mặc dù kết quả phết kính sau khi thu mẫu cá cảm nhiễm 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* nhuộm Giemsa cho thấy có 2 dạng vi khuẩn hình que ngắn và que dài hiện diện trên vùng mô da-cơ của cá bệnh. Các biến đổi trên mô da-cơ cá nhiễm kép thường là hiện tượng XH trên các bó cơ (Hình 4.20B). Ngoài ra, ở 1 số mẫu mô cá bệnh cũng có hiện tượng các bó cơ liên kết rời rạc (Hình 4.20C) và xuất hiện vùng cơ bị biến đổi cấu trúc và hoại tử (Hình 4.20D). Theo Hybiya (1982) thì mô da-cơ ít bị ảnh hưởng trực tiếp bởi vi khuẩn là do cấu trúc cơ quan này khá

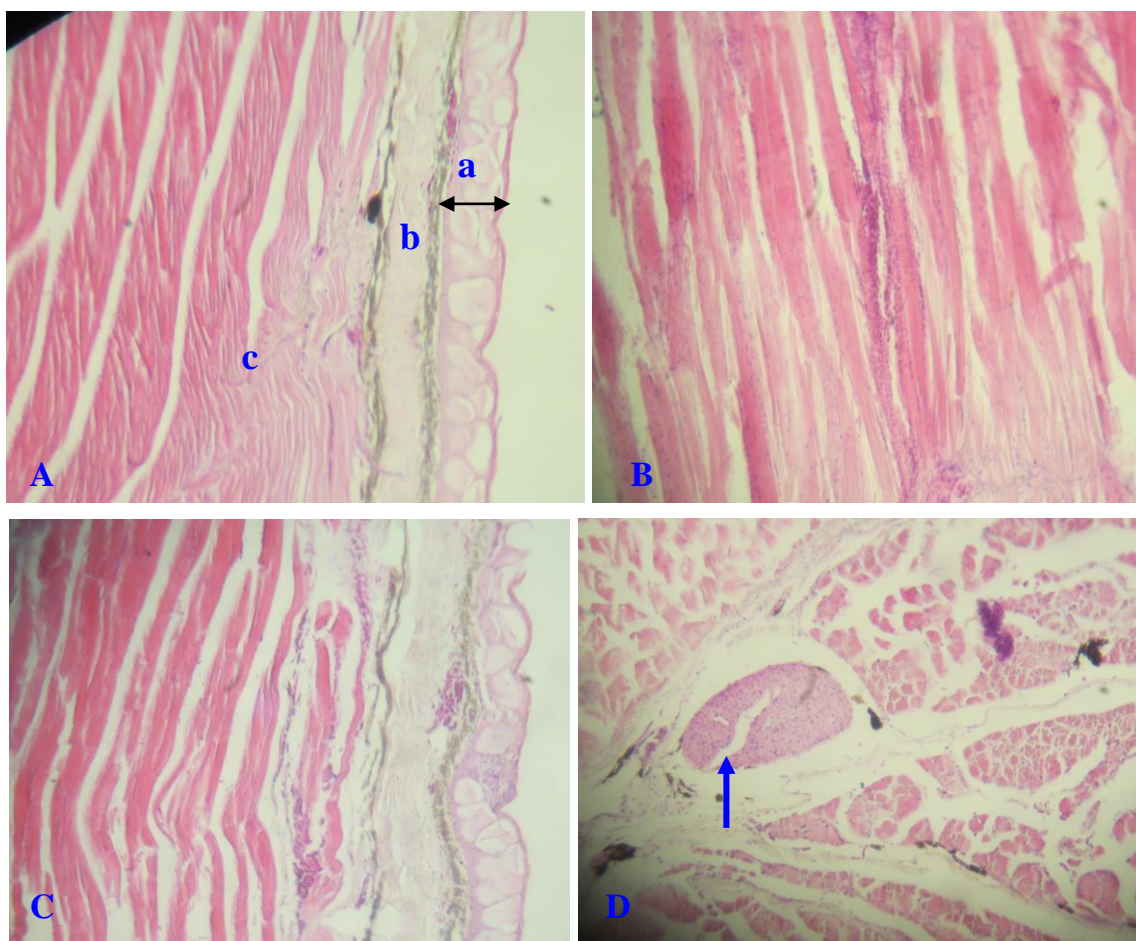
rắn chắc và không giữ vai trò quan trọng trong quá trình tạo máu và không trực tiếp tham gia vào hệ miễn dịch của cơ thể. Vì vậy, ít có khả năng tiếp xúc và ít bị tấn công bởi vi khuẩn.



Hình 4.19: Các mẫu phết kính cá nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (Wright-Giemsa, 100X).

A. Mẫu thận cá khô: a: hồng cầu, b: bạch cầu đơn nhân và c: tế bào lympho. B. Sự phân bố của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên mô tỳ tạng (100X) sau 12 giờ. C. Vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* bao quanh hồng cầu ở thận cá tra (100X) sau 12 giờ ( a: vi khuẩn *A. hydrophila*, b: vi khuẩn *E. ictaluri*). D. Màng tế bào hồng cầu bị vi khuẩn phá vỡ (mũi tên) sau 24 giờ (100X). E. Các vi khuẩn bao quanh các bạch cầu trên mô thận (mũi tên) sau 48 giờ (100X). F. Đại thực bào vi khuẩn ở thận (mũi tên) sau 24 giờ (100X).





Hình 4.20: Đặc điểm mô da-cơ cá tra nhiễm kếp (H&E).

A. Da-cơ cá khỏe (20X), a: lớp biểu bì, b: lớp hạ bì, c: lớp cơ. B. Các bó cơ bị XH sau 96 giờ (20X). C. Cấu trúc các bó cơ rời rạc sau 120 giờ (20X). D. Vùng cơ bị biến đổi cấu trúc và hoại tử sau 120 giờ (20X).

#### 4.3.5.2 Biến đổi cấu trúc mô mang

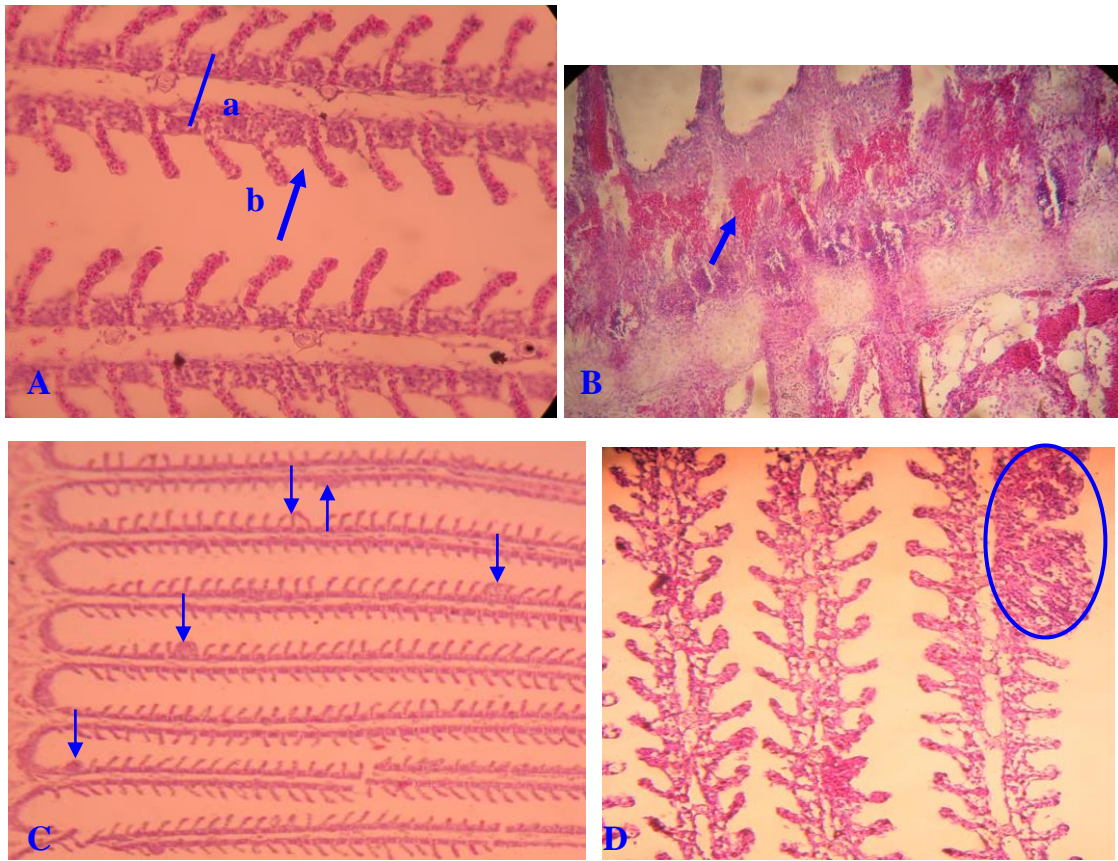
Mang cá tra gồm 2 bộ nằm ở 2 bên đầu, mỗi bộ có 4 cung mang và mỗi cung mang có 2 lá mang. Lá mang có màu đỏ và được cấu tạo bởi nhiều sợi mang sơ cấp và trên sợi mang sơ cấp có nhiều sợi mang thứ cấp sắp xếp theo hình lông chim (Hình 4.21A). Qua khảo sát mô mang cá bệnh nhiễm kếp 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở các NT của 2 phương pháp ngâm và tiêm cho thấy cấu trúc mô mang có những biến đổi như động mạch ra vào mang bị sung huyết và XH (Hình 4.21B); sợi mang sơ cấp và thứ cấp có hiện tượng sung huyết và XH, đặc biệt sự phình to và dính lại của nhiều sợi mang sơ cấp và thứ cấp (Hình 4.21C). Trong khi đó, ở NT đối chứng thì cấu trúc mang không có sự biến đổi trong thời gian theo dõi thí nghiệm.

Hiện tượng sợi mang thứ cấp bị dính lại với nhau, sung viêm và cấu trúc bị phá vỡ có thể là do khi vi khuẩn tấn công sẽ tạo nên phản ứng miễn dịch làm các tế bào ở mang sưng lên và khi các tế bào sưng càng to thì sẽ dẫn đến sự tiếp xúc

giữa các sợi mang này cùng với dịch viêm sẽ tạo nên sự dính lại của các sợi mang. Sự dính lại của các sợi mang làm giảm khả năng hô hấp của mang do giảm diện tích tiếp xúc với nước và có thể do mất chức năng ở các vùng sợi mang bị dính lại và hoại tử (Robert, 1989). Do đó, cá bệnh thường có biểu hiện thiếu oxy và thường lơ dờ trên mặt nước. Tuy nhiên, sự biến đổi của mang chỉ xuất hiện trên 1 số mẫu ở các NT qua các ngày thu mẫu, có thể do mang không giữ vai trò quan trọng trong quá trình tạo máu nên ít bị phá hủy bởi vi khuẩn gây bệnh.

#### **4.3.5.3 Biến đổi cấu trúc mô thận**

Thận cá gồm có 2 phần: thận trước và thận sau. Thận trước không được cấu tạo bởi các ống thận và tiểu cầu thận như ở thận sau mà được cấu tạo chủ yếu bởi các mô kẽ và cũng có các trung tâm đại thực bào sắc tố nằm rải rác như ở thận sau. Trong khi đó, thận sau được cấu tạo bởi 2 phần chính là tiểu cầu thận và các ống thận. Ngoài ra, trên thận sau còn có các mạch máu, các mô liên kết và đan xen giữa các ống thận là các tế bào kẽ hay mô kẽ và các trung tâm đại thực bào sắc tố (Hình 4.22A). Kết quả quan sát mô thận cá bệnh nhiễm kếp cho thấy cấu trúc mô có những biến đổi như quản cầu thận XH, sưng to và kéo dài; tĩnh mạch và tiểu cầu thận sung huyết và XH, cấu trúc thận mất cấu trúc, hoại tử nhiều vùng trên thận và ở các ống thận (Hình 4.22C). Trong khi đó, cấu trúc mô ở NT đối chứng thì không có sự biến đổi (Hình 4.22A). Hiện tượng sung huyết được xem là phản ứng đầu tiên của cơ thể đối với tác nhân gây bệnh do kích thích đặc biệt làm cho mao mạch nở ra một lượng máu lớn hơn bình thường được đưa đến gần ổ viêm. Khi những vùng sung huyết dưới ảnh hưởng của độc tố vi khuẩn, các mao mạch máu bị vỡ hoặc tính thấm thấu của mao mạch tăng lên, làm cho các tế bào máu trong vùng sung huyết thoát ra xen lẫn với các tế bào máu cơ quan sẽ gây ra hiện tượng XH. Hiện tượng sung huyết và XH kéo dài sẽ làm cho mô thận sung viêm mất cấu trúc và dẫn đến hoại tử (Roberts, 1979; Ferguson, 1989). Bên cạnh các hiện tượng đã quan sát ở trên thì các đại thực bào sắc tố cũng được tìm thấy trên mô thận cá bệnh (Hình 4.22D). Từ đó, làm thận mất đi những chức năng quan trọng của thận như điều hòa áp suất thẩm thấu, bài tiết các sản phẩm của quá trình biến dưỡng như  $\text{NH}_3$ , urê, các muối hóa trị 2, sản xuất hồng cầu cũng như tiết hormone điều hòa các quá trình sinh lý của cơ thể kết hợp với những yếu tố khác làm cho cá chết.



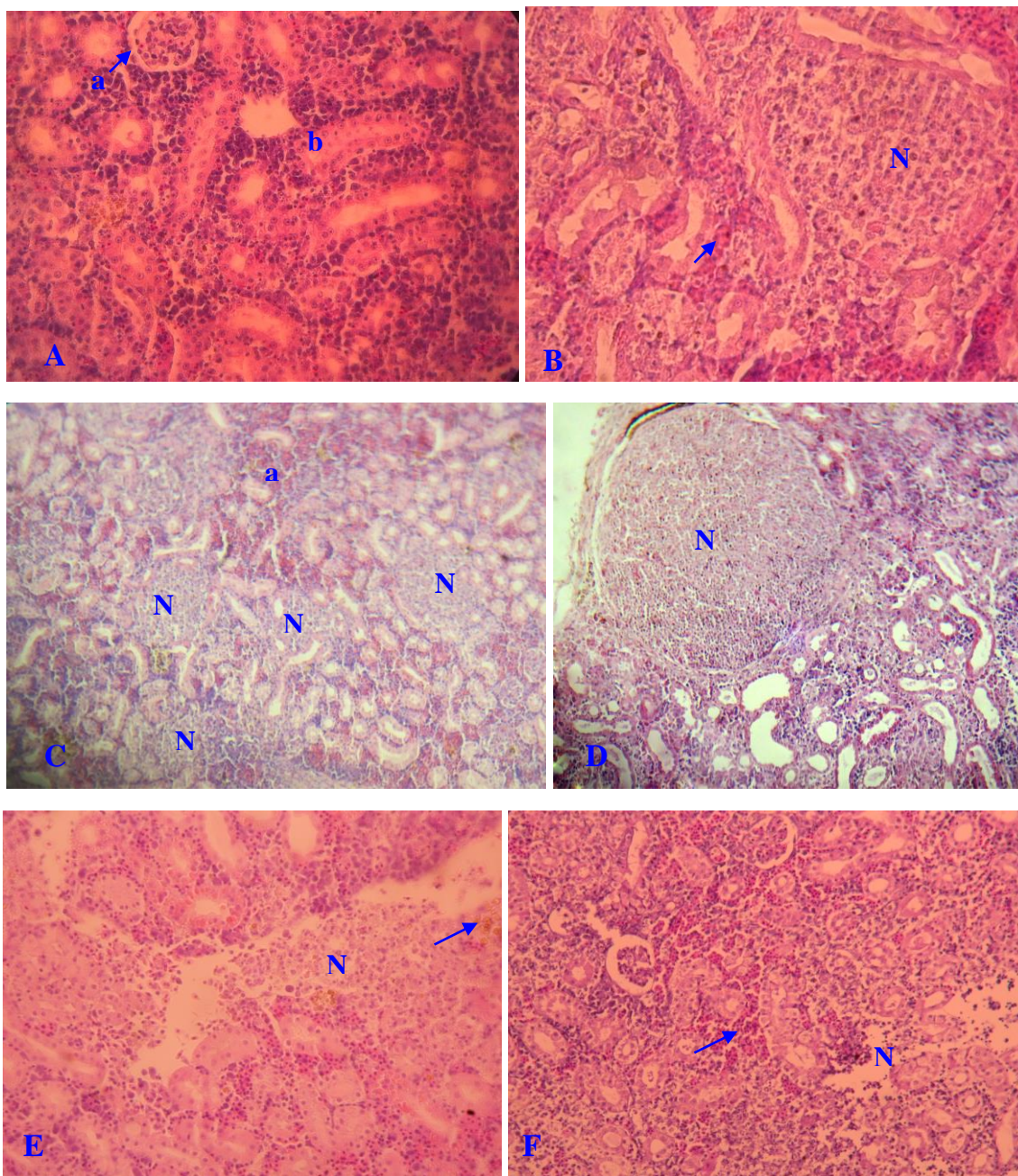
Hình 4.21: Đặc điểm mô mang cá tra nhiễm kếp (H&E).

A. Mang cá tra khỏe (20X). a: Sợi mang sơ cấp, b: sợi mang thứ cấp. B. XH ở động mạch ra và mang thứ cấp (mũi tên) sau 36 giờ (20X). C. Sợi mang sơ cấp và thứ cấp phình to (mũi tên) và sự tiếp xúc của các sợi mang thứ cấp sau 48 giờ (10X). D. Vùng nhiều sợi mang thứ cấp dính lại với nhau (vòng tròn) sau 48 giờ (20X).

#### 4.3.5.4 Biến đổi cấu trúc mô tỳ tạng

Tỳ tạng được bao bọc bởi lớp tế bào biểu mô lát đơn và mô liên kết. Cấu tạo của tỳ tạng gồm 2 phần chính là tủy đỏ và tủy trắng. Tủy trắng nằm bên trong bắt màu sậm hơn phần tủy đỏ, tủy đỏ tạo thành mạng lưới bao quanh tủy trắng. Ngoài tủy đỏ và tủy trắng, tỳ tạng còn có sự hiện diện của trung tâm đại thực bào sắc tố, có màu vàng nâu hoặc nâu đen, đóng vai trò kho lưu trữ những tế bào phá hủy, mảnh vụn kháng nguyên (Ferguson, 2006). Qua khảo sát mô tỳ tạng cá bệnh cho thấy cấu trúc mô tỳ tạng có những vùng bị hoại tử mất cấu trúc (Hình 4.23B). Không tìm thấy sự biến đổi cấu trúc tỳ tạng ở NT đối chứng. Đặc biệt, nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố màu vàng nâu xuất hiện trên mô tỳ tạng (Hình 4.23A).

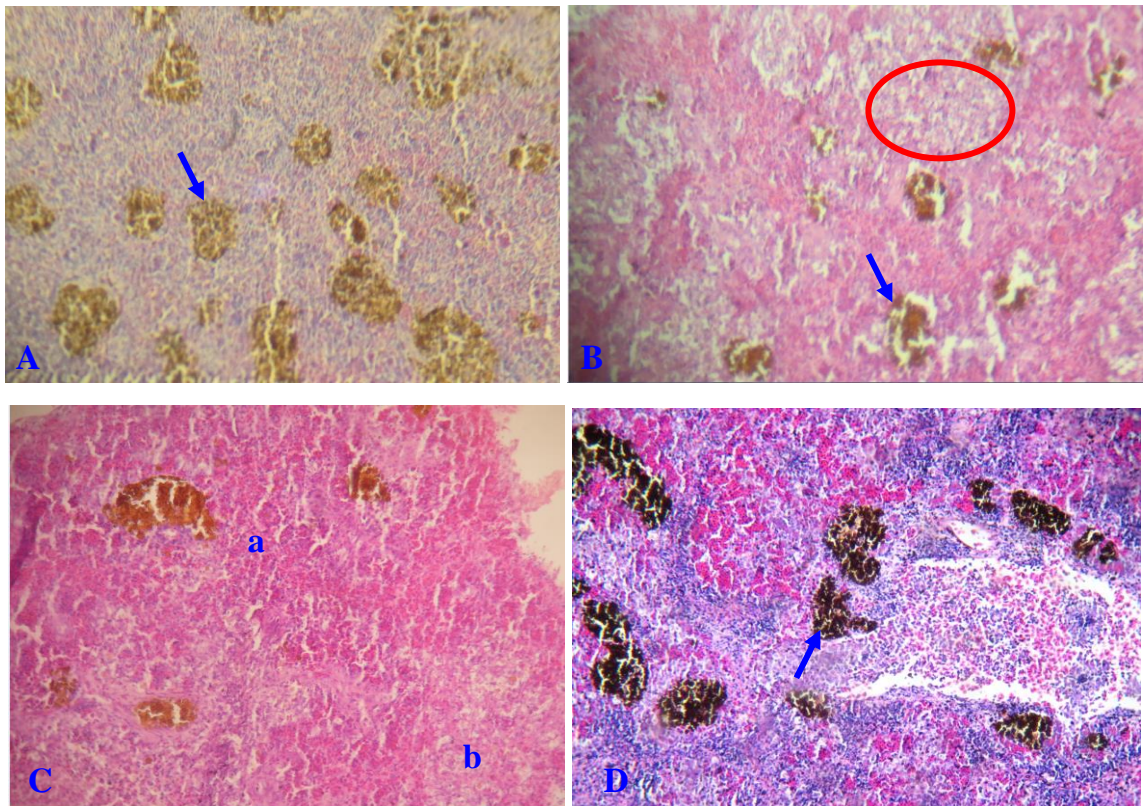




**Hình 4.22: Đặc điểm mô thận cá tra nhiễm kếp (H&E).**

*A. Thận cá khỏe (20X). a: tiểu cầu thận; b: ống thận; c: trung tâm đại thực bào sắc tố. B. Ống thận hoại tử sau 96 giờ (40X). C. Nhiều vùng thận bị hoại tử và XH sau 72 giờ (20X). D. Vùng mô thận hoại tử và biến đổi cấu trúc sau sau 96 giờ (20X). E. Thận trước hoại tử (N) và trung tâm đại thực bào sắc tố (mũi tên) sau 72 giờ (20X). F. Thận sau hoại tử, tiểu cầu thận thận sung huyết và XH sau 120 giờ (20X).*





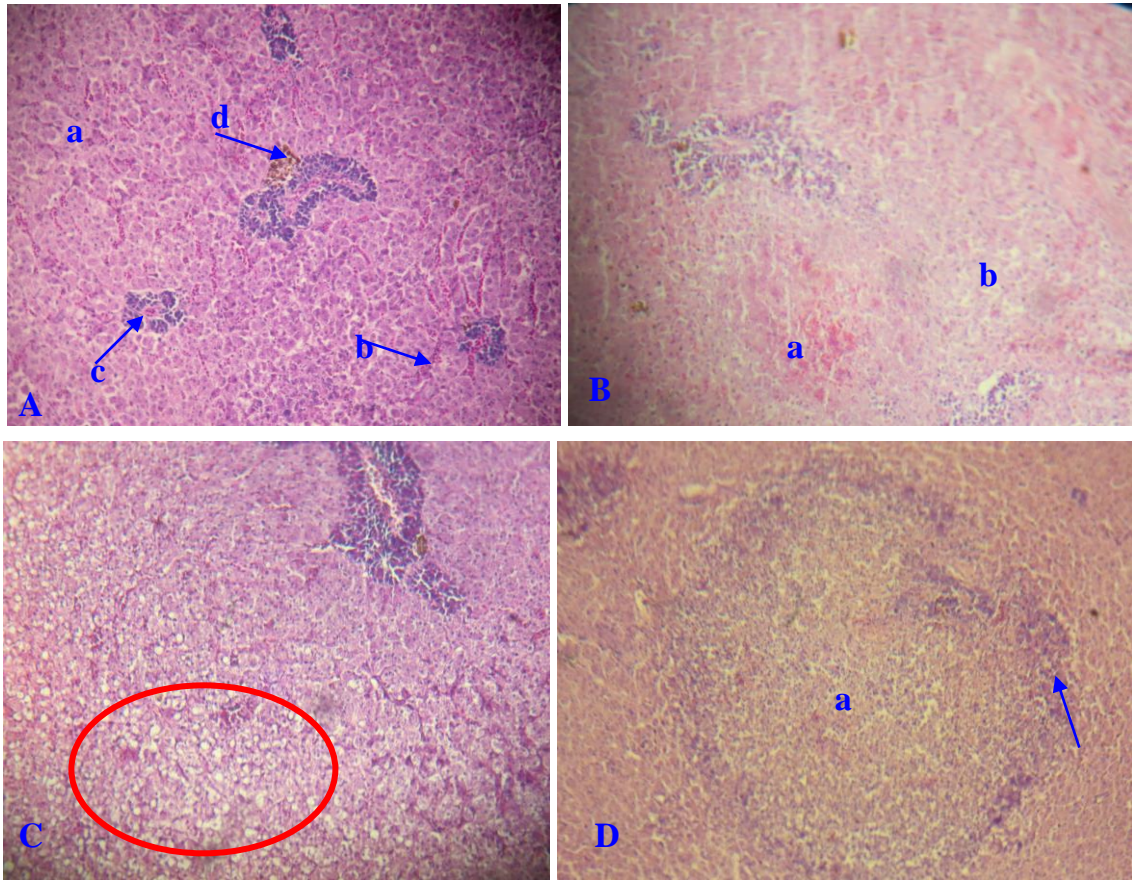
Hình 4.23: Đặc điểm mô tỳ tạng cá tra nhiễm kếp (H&E).

A. Tỳ tạng cá tra xuất hiện nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố (mũi tên) sau 48 giờ (20X). B. Tỳ tạng bị biến đổi cấu trúc (vòng tròn) và xuất hiện nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố (mũi tên) sau 96 giờ (10X). C. Vùng mô tỳ tạng bị sung huyết, XH (a) và hoại tử (b) sau 72 giờ (20X). D. Vùng mô tỳ tạng bị hoại tử, XH và xuất hiện nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố (mũi tên) sau 96 giờ (20X).

#### 4.3.5.5 Biến đổi cấu trúc mô gan

Gan cá tra có chức năng tiêu hóa thức ăn và điều hòa hàm lượng đường trong máu cá. Gan được cấu tạo từ các tế bào gan có hình đa giác, bên trong có nhân hình cầu, các tế bào gan sắp xếp theo hướng lan tỏa từ tĩnh mạch trung tâm. Giữa các tế bào gan là các xoang mao mạch. Ngoài ra, trên mô gan còn có các tĩnh mạch, động mạch, trung tâm đại thực bào sắc tố và các đảo tụy (Hình 4.24A). Kết quả quan sát tiêu bản mô gan cá bệnh cảm nhiễm kếp cho thấy mô bệnh xuất hiện 1 số biến đổi như liên kết cấu trúc tế bào bị phá hủy, nhiều vùng tế bào gan bị sung huyết, XH và hoại tử mất cấu trúc (Hình 4.24B, C&D). Không tìm thấy sự biến đổi cấu trúc gan ở NT đối chứng (Hình 4.24A). Tuy nhiên, hiện tượng hoại tử dạng hạt và hoại tử hóa lỏng không xảy ra ở gan cá cảm nhiễm. Theo Ferguson (1989) những tổn thương diễn ra toàn bộ tổ chức gan làm cho gan không còn chức năng khử độc, lọc máu, chuyển hóa protein, lipid, glucid, tiết mật. Từ đó, các độc lực của vi khuẩn không được loại bỏ sẽ tích lũy trong cơ thể và làm giảm khả năng đề kháng với mầm bệnh kết hợp với các điều kiện bất lợi

khác làm cá chết. Nhìn chung, cấu trúc mô gan cá bệnh ở NT nấm vi khuẩn có nhiều biến đổi hơn so với cá bệnh ở các NT tiềm vi khuẩn.



Hình 4.24: Đặc điểm mô gan cá tra cá nhiễm kếp (H&E).

A. Gan cá khỏe (20X): vùng tế bào gan (a), mao mạch (b), đảo tụy (c) và trung tâm đại thực bào sắc tố (d) (20X) (mũi tên). B. Vùng mô gan bị XH (a) và biến đổi cấu trúc (b) sau 72 giờ (20X). C. Vùng mô gan bị biến đổi cấu trúc hình thành nhiều không bào (vòng tròn) sau 48 giờ (20X). D. Vi khuẩn tấn công tế bào gan (mũi tên) và hình thành vùng hoại tử và thay đổi cấu trúc mô gan (a) sau 96 giờ (20X).

#### 4. 4 Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

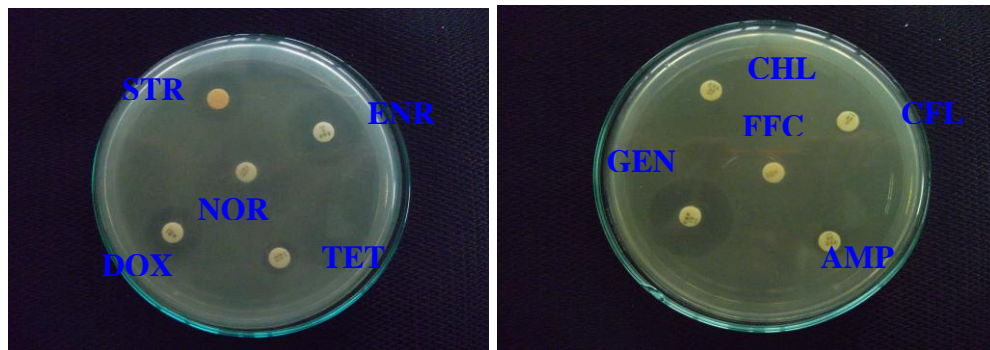
##### 4.4.1 Sự kháng thuốc của vi khuẩn của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Nghiên cứu đã thực hiện kháng sinh đồ trên 67 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* với 15 loại kháng sinh (Hình 4.25). Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn đối với từng loại kháng sinh được trình bày chi tiết ở Phụ lục R1.

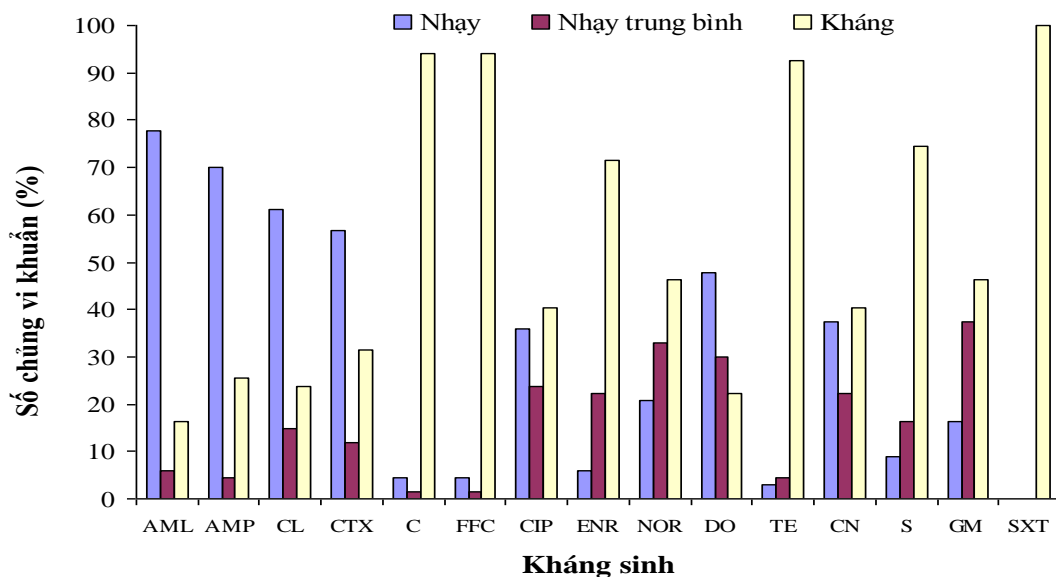
Qua Hình 4.26 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kiểm tra đều kháng với các loại kháng sinh, không có chủng vi khuẩn nào trong số 67 chủng *E. ictaluri* còn nhạy với 15 loại kháng sinh. Trong đó, vi khuẩn kháng hoàn toàn với SXT (100%), kháng cao với các kháng sinh nhóm fenicol (kháng với CHL và FFC là 94,03%), TET (92,54%), STR (74,63%), ENR (71,64%), GEN (46,27%) và NOR (46,27%). Trong khi đó, vi khuẩn có tỷ lệ kháng dưới 50% đối với các



kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam (CTX, CFL, AMP và AMO) với tỷ lệ kháng dao động từ 22-43%. Như vậy, qua các kết quả này cũng đồng nghĩa với việc vi khuẩn còn nhạy tương đối cao với các kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$ -lactam như AMO (77,61%), AMP (70,15%), CFL (61,19%) và CTX (56,72%), các kháng sinh nhạy dưới 50% gồm DOX (47,76%), CIP (35,82) và nhạy thấp nhất là TET (2,99%).



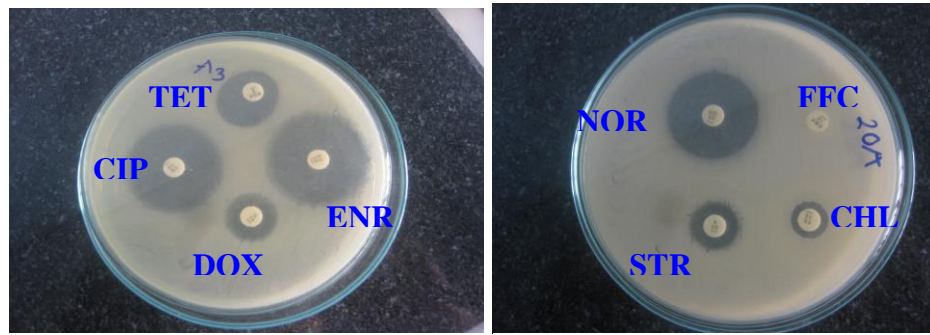
Hình 4.25: Kết quả thực hiện kháng sinh đồ vi khuẩn *E. ictaluri*.



Hình 4.26: Tỷ lệ (%) các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* nhạy cảm với các kháng sinh.

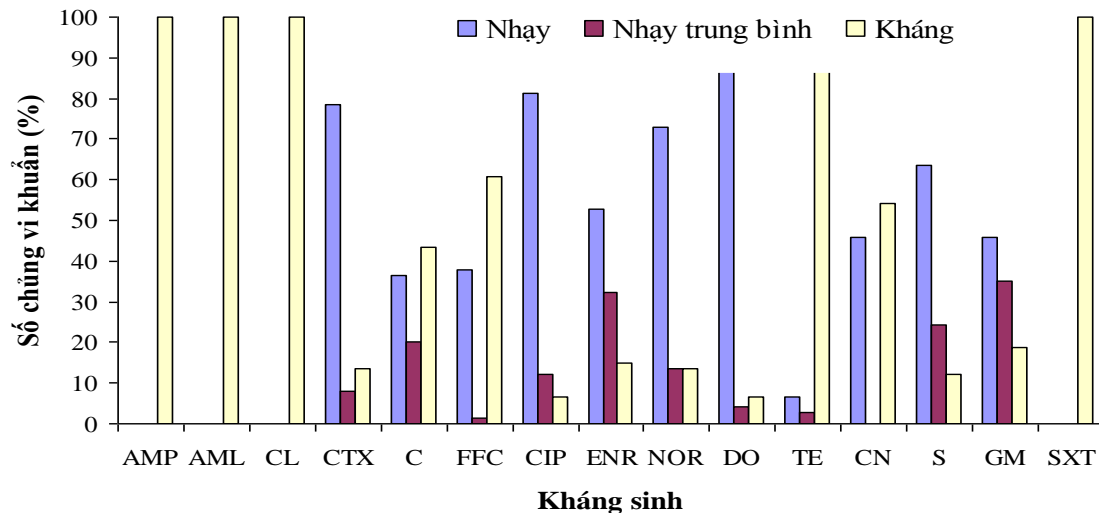
AMO: amoxicillin, AMP: ampicillin, CFL: cefalexin, CTX: cefotaxime, CHL: chloramphenicol, FFC: florfenicol, CIP: ciprofloxacin, ENR: enrofloxacin, NOR: norfloxacin, DOX: doxycycline, TET: tetracycline, NEO: neomycin, STR: streptomycin, GEN: gentamicin và SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole.

Trong khi đó, tính nhạy cảm kháng sinh của 74 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* cũng được thực hiện kháng sinh đồ với 15 loại kháng sinh (Hình 4.27). Kết quả thực hiện kháng sinh đồ đối với các chủng *A. hydrophila* thì được trình bày chi tiết ở Phụ lục R2.



Hình 4.27: Kết quả thực hiện kháng sinh đồ vi khuẩn *A. hydrophila*.

Kết quả thực hiện kháng sinh đồ các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (Hình 4.28) cho thấy vi khuẩn đã kháng hoàn toàn với STX (100%) và các kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam (ngoại trừ CTX) như AMO, AMP và CFL (100%), kháng cao với với các kháng sinh như TET (90,54%), FFC (60,81) và NEO (54,05%). Các kháng sinh có tỷ lệ kháng dưới 50% gồm ENR, STR, NOR, CTX, CIP và DOX (tỷ lệ kháng dao động từ 10-47%. Qua Hình 4.28 cũng cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* còn nhạy cao với các kháng sinh như DOX (89,19%), kể đến là CIP (81,08%), CTX (78,38%), NOR (72,97%), STR (63,51%), ENR (52,70%). Các kháng sinh NEO, GEN, FFC và CHL có tỷ lệ nhạy dưới 50% (dao động từ 36-45%) và thấp nhất là TET (6,76%).

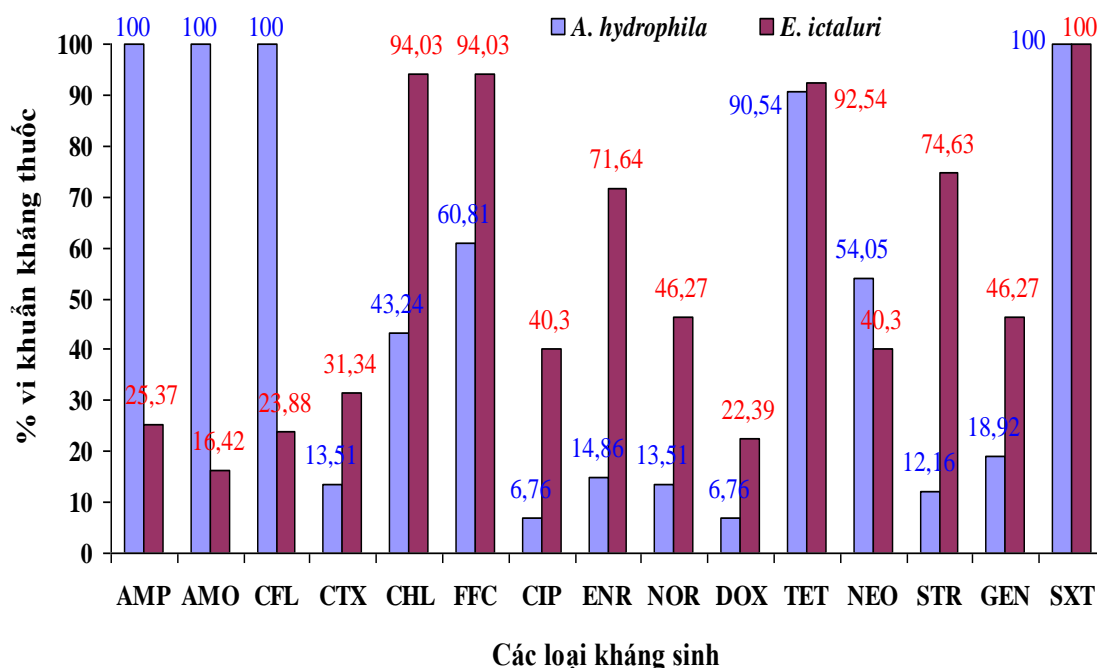


Hình 4.28: Tỷ lệ (%) các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* kháng, nhạy với các loại kháng sinh.

AMO: amoxicillin, AMP: ampicillin, CFL: cefalexin, CTX: cefotaxime, CHL: chloramphenicol, FFC: florfenicol, CIP: ciprofloxacin, ENR: enrofloxacin, NOR: norfloxacin, DOX: doxycycline, TET: tetracycline, NEO: neomycin, STR: streptomycin, GEN: gentamicin và SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole.

Như vậy, qua các kết quả trên cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* có tỷ lệ kháng cao với STX (100%), kể đến là TET (91,54%), FFC

(77,42%) và CHL (68,64%) (Hình 4.29). Trong khi vi khuẩn *A. hydrophila* kháng hoàn toàn với AMP, AMO và CFL (100%) thì vi khuẩn *E. ictaluri* còn nhạy tương đối cao với các kháng sinh này. Ngược lại, đối với các kháng sinh CIP, ENR, NOR, STR và GEN thì vi khuẩn *E. ictaluri* có tỷ lệ kháng cao hơn so với vi khuẩn *A. hydrophila* (Hình 4.29).



Hình 4.29: Tỷ lệ (%) kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đối với các loại kháng sinh.

AMO: amoxicillin, AMP: ampicillin, CFL: cefalexin, CTX: cefotaxime, CHL: chloramphenicol, FFC: florfenicol, CIP: ciprofloxacin, ENR: enrofloxacin, NOR: norfloxacin, DOX: doxycycline, TET: tetracycline, NEO: neomycin, STR: streptomycin, GEN: gentamicin và SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole.

Trong những năm gần đây, sự kháng thuốc của vi khuẩn trong ngành công nghiệp NTTS đã được báo cáo ở nhiều quốc gia trên thế giới (Miranda and Zemelman, 2002; Guz and Kozinska, 2004; Akinbowale *et al.*, 2007; Tipmongkolsilp *et al.*, 2012; Stratev *et al.*, 2013). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy toàn bộ 74 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và 67 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kháng hoàn toàn với kháng sinh SXT (Hình 4.29). Đây là kháng sinh phổ rộng có tác dụng ức chế sự tổng hợp acid folic của vi khuẩn (Prescott, 2000). Trong NTTS, SXT được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh do vi khuẩn Gram âm gây ra ở nhiều nước trên thế giới (Serrano, 2005). Theo Sarter *et al.* (2007) thì có 61% vi khuẩn Gram âm phân lập từ cá da trơn kháng với SXT. Nghiên cứu của Akinbowale *et al.* (2007) cho thấy chỉ có 1/129 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* spp. phân lập từ 9 vùng nuôi cá hồi ở Australia kháng với SXT. Tuy nhiên, theo

nghiên cứu của Nguyen *et al.* (2014) thì có đến 93% vi khuẩn *Pseudomonas* spp. và 72% vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân lập từ nước ao nuôi cá tra ở Việt Nam kháng với kháng sinh này. Trong khi đó, có đến 83,3% vi khuẩn *E. tarda* phân lập từ cá nước ngọt ở Malaysia kháng với SXT (Wei *et al.*, 2011). Nghiên cứu của Dung *et al.* (2008) cho thấy 71% vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh trên cá tra đã kháng với kháng sinh này và trong báo cáo của Phạm Thanh Hương (2010) thì tỷ lệ này đã tăng lên 100%. Qua kết quả của nghiên cứu này cho thấy người nuôi cá tra ở ĐBSCL không nên sử dụng kháng sinh này để trị bệnh GTM và XH.

Đối với các kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam thì kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy 100% vi khuẩn *A. hydrophila* kháng với AMP, AMO và CFL. Vi khuẩn *A. hydrophila* có tỷ lệ kháng cao với các kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam là do tế bào của chúng enzyme  $\beta$ -lactamase có tác dụng phá vỡ vòng  $\beta$ -lactam nên làm thuốc mất tác dụng (Wen-Chen *et al.*, 1998). Tuy nhiên, vi khuẩn vẫn còn nhạy cao với kháng sinh thuộc nhóm này là CTX (78,38%). Kết quả này có thể do CTX là kháng sinh thuộc thế hệ thứ 3 của nhóm cephalosporin được nghiên cứu để chống lại tác động phân hủy enzyme  $\beta$ -lactamase của vi khuẩn (Treves-Brown, 2000). Trong khi đó, vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này vẫn còn nhạy cao với các kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$ -lactam như AMO (77,61%), AMP (70,15%), CFL (61,19%) và CTX (56,72%). Tuy nhiên, tỷ lệ nhạy với của vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu đối với các kháng sinh nhóm này đã giảm so với các nghiên cứu trước đây, cụ thể nghiên cứu của Dung *et al.* (2008) cho thấy 100% vi khuẩn *E. ictaluri* nhạy với AMO và AMP. Tiếp theo, tỷ lệ nhạy của vi khuẩn *E. ictaluri* với AMP, AMO và CFL trong nghiên cứu của Dung *et al.* (2009); Phạm Thanh Hương và *ctv.* (2010) lần lượt là 85,7%, 84,1% và 86,5%. Vì vậy, có thể sử dụng CTX để điều trị bệnh XH do vi khuẩn *A. hydrophila* và các kháng sinh AMO và AMP để trị bệnh GTM trên cá tra trong trường hợp cần thiết.

Nghiên cứu cũng tìm thấy sự kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đối với kháng sinh thuộc nhóm phenicol là CHL và FFC. CHL là kháng sinh bị cấm sử dụng trong chăn nuôi và NTTS ở nhiều nước trên thế giới (Noga, 2010), bao gồm ở Việt Nam (Thông tư số 03/2012/TTBNNPTNT, BNN-PTNT) do chúng là nguyên nhân gây thoái hóa tủy xương (Dowling, 2006). Mặc dù đã bị cấm sử dụng trong NTTS từ năm 2005 nhưng kết quả của nghiên cứu này cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* vẫn kháng cao với CHL với tỷ lệ lần lượt là 95,52% và 63,51%, cao hơn so với báo cáo trước đây của Dung *et al.* (2009) là 73% và 4,92%. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để làm sáng tỏ vấn đề này. Hiện tượng kháng CHL cũng được phát hiện ở vi

khuẩn *E. coli*, *Aeromonas* spp. và *Pseudomonas* spp. trong nghiên cứu của Nguyen (2012) với tỷ lệ vi khuẩn kháng lần lượt là 30%, 25% và 89%. Trong khi đó, tỷ lệ vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* kháng với FFC cũng ở mức cao (95,52% và 62,16%). Kết quả này cũng cao hơn so với nghiên cứu trước đây của Dung *et al.* (2009) là 73% và 4,92%. Trong thời gian qua, FFC được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi và NTTS ở Việt Nam và nhiều nước trên thế giới (Dowling, 2006). Điều này đã dẫn đến sự xuất hiện nhiều loài vi khuẩn khác nhau trở nên kháng với FFC như *Klebsiella pneumoniae* (CloECKaert *et al.*, 2001), *E. coli* (Keyes *et al.*, 2000; CloECKaert *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000), *V. cholerae* (Hochhut *et al.*, 2001).

Đối với các kháng sinh nhóm quinolone, nghiên cứu cho thấy cả 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều kháng với các kháng sinh thuộc nhóm này. Trong khi vi khuẩn *A. hydrophila* còn nhạy tương đối cao với CIP, NOR và ENR (dao động từ 52-81%) thì vi khuẩn *E. ictaluri* kháng tương đối cao ENR, NOR và CIP (dao động từ 52-94%). Các nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ kháng của vi khuẩn đối với các kháng sinh nhóm quinolone thường thấp hơn 25% (Miranda and Zemelman, 2001, 2002; Akinbowale *et al.*, 2006). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này thì 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều có tỷ lệ kháng trên 30%. Tương tự CHL, ENR cũng nằm trong danh mục cấm sử dụng trong NTTS của BNN-PTNT. ENR là dẫn xuất của quinolone được sử dụng để chống lại vi khuẩn *A. salmonicida* (Bowser *et al.*, 1990) và cũng rất hiệu quả để điều trị bệnh do các loài vi khuẩn khác gây ra trên cá (Mashima and Lewbart, 2000, trích dẫn bởi Noga, 2010). Các nghiên cứu trước đây cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* vẫn nhạy với kháng sinh này (Dung *et al.*, 2008). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Phạm Thanh Hương (2010) thì vi khuẩn này đã kháng cao với ENR (74,5%). Hiện tại, ngoài ENR đã bị cấm sử dụng thì 2 kháng sinh CIP và NOR cũng nằm trong danh sách các kháng sinh hạn chế sử dụng trong NTTS của BNN-PTNT. Do đó, cần thận trọng và trong những trường hợp thật cần thiết mới sử dụng các kháng sinh nhóm quinolone.

Các kháng sinh thuộc nhóm tetracycline đã được sử dụng rộng rãi trong NTTS ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam (Serrano, 2005). Do đó, sự xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng với kháng sinh đã được nhiều tác giả báo cáo (DePaola *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 2001a&b; Miranda and Zemelman, 2002; Miranda *et al.*, 2003; Akinbowale *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011a). Nghiên cứu này cũng cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều kháng cao với TET (trên 90%). Tuy nhiên, trong khi vi khuẩn *E. ictaluri* đã kháng trên 50% với



DOX thì vi khuẩn *A. hydrophila* còn nhạy tương đối cao với DOX với tỷ lệ kháng dưới 50%. Kết quả này cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều đã giảm tính nhạy với DOX mặc dù DOX là kháng sinh thuộc thể hệ mới nhất của nhóm tetracycline. Theo Roberts (1996) thì vi khuẩn kháng đáp ứng với các kháng sinh nhóm tetracycline qua 2 cơ chế chủ yếu: qua các protein bảo vệ ribosome (RPPs-ribosomal protection proteins) và hệ thống bơm thải tetracycline phụ thuộc năng lượng (energy-dependent efflux pumps). Đây được xem là 2 cơ chế phổ biến và thường gặp nhất ở vi khuẩn (Chopra and Roberts, 2001).

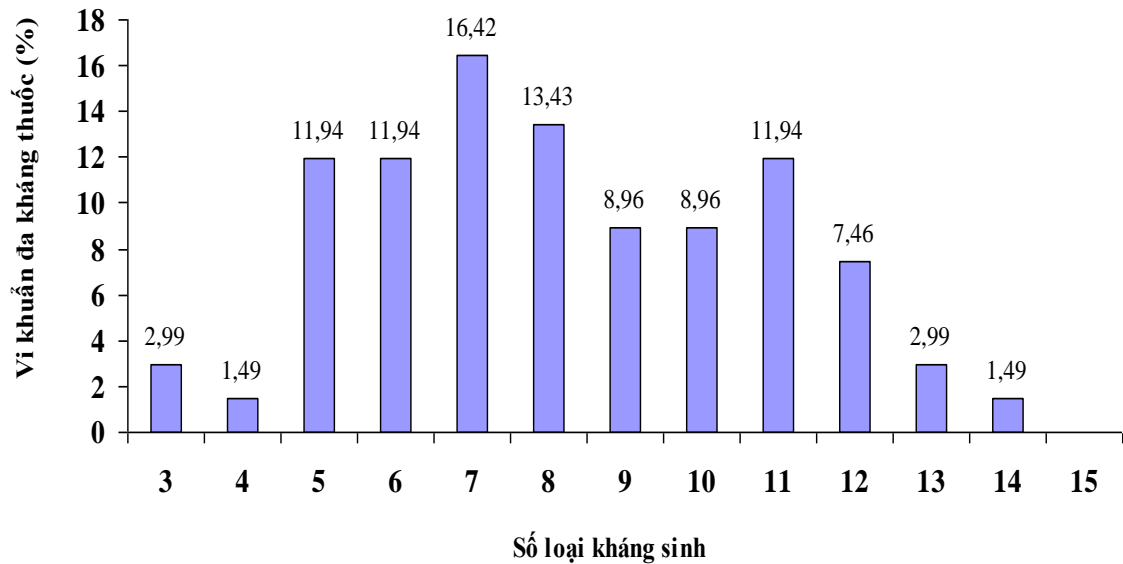
Trong nghiên cứu này, vi khuẩn *E. ictaluri* đã thể hiện tính kháng tương đối cao với các kháng sinh GEN, NEO và STR thuộc nhóm aminoglycoside (tỷ lệ kháng dao động từ 52-91%). Trong khi đó, vi khuẩn *A. hydrophila* còn nhạy với các kháng sinh như STR (tỷ lệ kháng dưới 50%), NEO và GEN (tỷ lệ nhạy 45,95%). Ngoài ra, qua kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* có tỷ lệ kháng STR cao hơn vi khuẩn *A. hydrophila*. Nghiên cứu của Nguyen *et al.* (2014) cũng cho thấy tỷ lệ kháng của các vi khuẩn *Aeromonas spp.* và *Pseudomonas spp.* phân lập từ các ao nuôi cá tra đối với STR cũng cao hơn các kháng sinh khác của nhóm aminoglycoside như GEN, NEO và kanamycin. Một trong những lý do vi khuẩn thường có tỷ lệ kháng STR cao hơn các kháng sinh còn lại của nhóm là do STR chỉ có 1 điểm gắn duy nhất trên ribosome, trong khi các kháng sinh còn lại có nhiều điểm gắn (Livermore, 2005).

#### **4.4.2 Sự đa kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

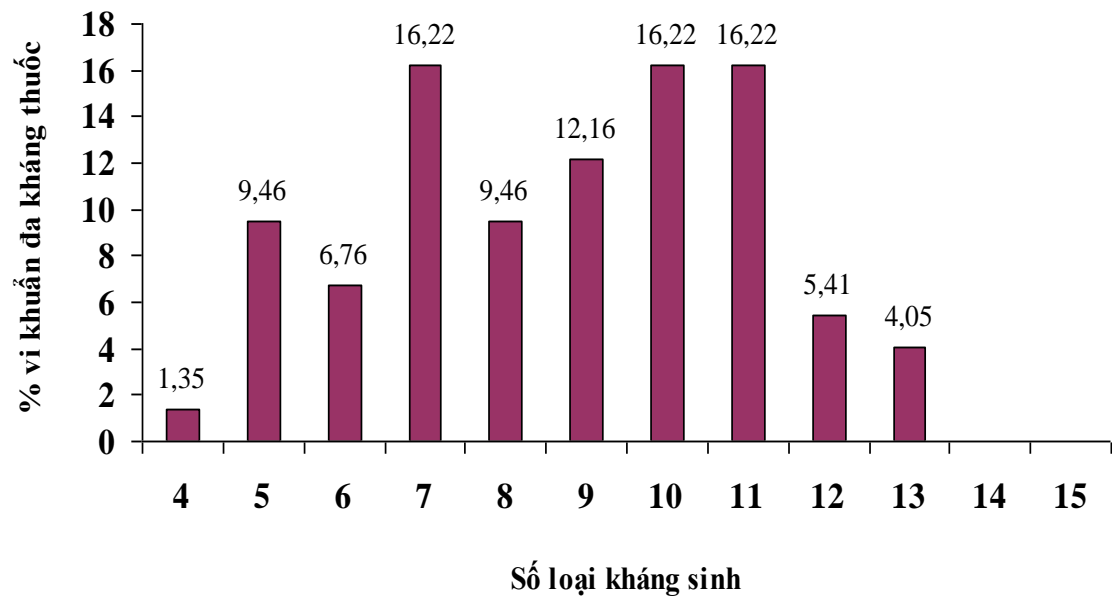
Đối với vi khuẩn *E. ictaluri*, qua kết quả thực hiện kháng sinh đồ cho thấy không có chủng vi khuẩn nào kháng chỉ 1 hoặc 2 loại kháng sinh cũng như không có chủng nào kháng toàn bộ 15 loại kháng sinh được kiểm tra (Hình 4.30). Nhìn chung, hầu hết các chủng vi khuẩn đều kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên, trong đó số chủng vi khuẩn kháng với 7 loại kháng sinh chiếm tỷ lệ cao nhất (16,42%), kế đến là 8 loại kháng sinh (13,43%), kháng 5, 6 và 11 loại kháng sinh chiếm tỷ lệ 11,94% và thấp nhất là kháng với 4 và 14 loại kháng sinh (1,49%).

Trong khi đó, qua kết quả thực hiện kháng sinh đồ của 74 chủng *A. hydrophila* cho thấy chỉ có 1/74 (chiếm tỷ lệ 1,49%) chủng còn nhạy với 11 loại kháng sinh, không có chủng vi khuẩn nào kháng chỉ 1, 2 và 3 loại kháng sinh cũng như kháng từ 14 và 15 loại kháng sinh (Hình 4.31). Nhìn chung, qua Hình 4.31 cho thấy các chủng vi khuẩn kháng từ 4 đến 8 loại kháng sinh trở lên chiếm đa số, trong đó số chủng vi khuẩn kháng với 7, 10 và 11 loại kháng sinh chiếm tỷ lệ cao nhất (16,22%), kế đến là kháng với 9 loại kháng sinh với tỷ lệ là 12,16%,

kháng 8 và 5 với cùng tỷ lệ là 9,46% và thấp nhất là kháng với 4, 13 và 12 loại kháng sinh với tỷ lệ lần lượt là 1,35%, 4,05% và 5,41% (Hình 4.31).



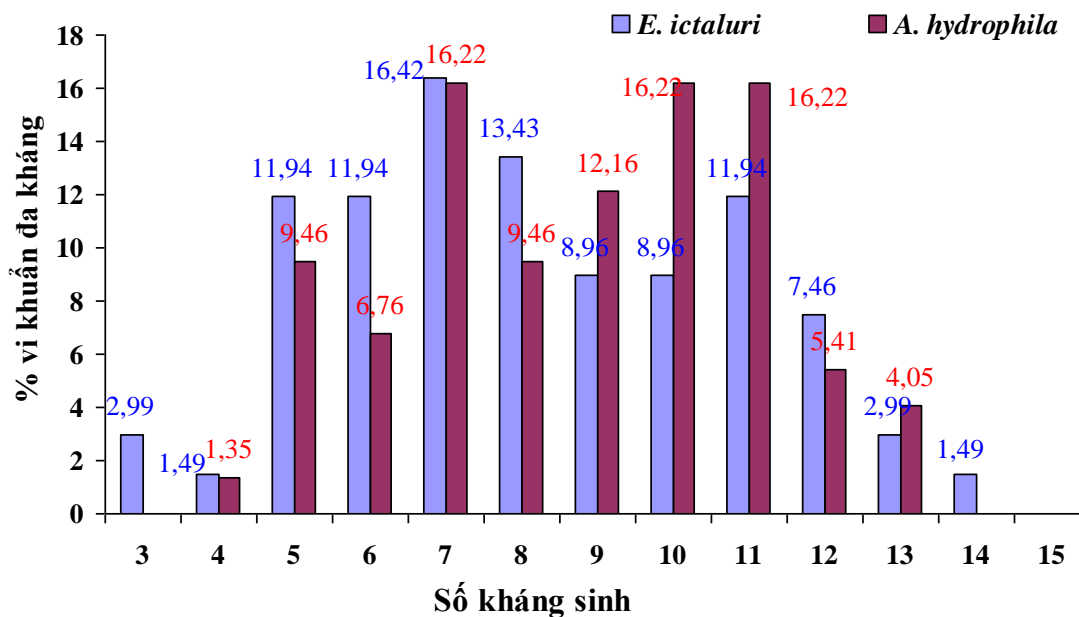
Hình 4.30: Tỷ lệ (%) vi khuẩn *E. ictaluri* đa kháng thuốc.



Hình 4.31: Tỷ lệ (%) vi khuẩn *A. hydrophila* đa kháng thuốc.

Như vậy, qua kết quả của nghiên cứu này cho thấy 100% vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều thể hiện sự đa kháng thuốc (kháng từ 3 loại kháng sinh trở lên) (Hình 4.32). Nghiên cứu của Dung *et al.* (2008) cũng cho thấy 73% vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra ở ĐBSCL đa kháng thuốc. Trong khi đó, nghiên cứu của Phạm Thanh Hương (2010) cho thấy có đến 96% vi khuẩn *E.*

*ictaluri* đa kháng thuốc. Gần đây, nghiên cứu của Nguyen *et al.* (2014) cũng ghi nhận 92,4% vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân lập từ môi trường ao nuôi cá tra ở ĐBSCL đa kháng thuốc, trong đó vi khuẩn kháng nhiều nhất là 14 loại kháng sinh (tỷ lệ 2,2%).



Hình 4.32: Tỷ lệ (%) vi khuẩn đa kháng thuốc ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

#### 4.4.3 Các kiểu hình đa kháng thuốc phổ biến của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Với 15 loại kháng sinh được kiểm tra, nghiên cứu đã xác định 54 kiểu hình đa kháng khác nhau từ 67 chủng vi khuẩn *E. ictaluri*. Qua kết quả từ Bảng 4.8 cho thấy có 12 loại kiểu hình đa kháng phổ biến của vi khuẩn *E. ictaluri*, trong đó vi khuẩn có kiểu hình đa kháng là CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT và AMO-AMP-CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT chiếm tỷ lệ cao nhất (5,56%). Tương tự, vi khuẩn *A. hydrophila* cũng có rất nhiều kiểu hình đa kháng khác nhau (51 kiểu hình đa kháng) được xác định từ 74 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* khi thực hiện kháng sinh đồ. Kết quả tổng hợp từ Bảng 4.9 cho thấy có 12 loại kiểu hình đa kháng phổ biến của vi khuẩn *A. hydrophila*, trong đó vi khuẩn có kiểu hình đa kháng AMP-AMO-CFL-TET-SXT chiếm tỷ lệ cao nhất (13,73%), kế đến là kiểu hình AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-SXT (11,76%) và AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-STR-GEN-SXT (5,88%).

Bảng 4.8: Các kiểu hình đa kháng phổ biến của vi khuẩn *E. ictaluri*

Kiểu hình đa kháng thuốc của vi khuẩn	Số chủng	Tỷ lệ (%)
CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	2	3,70
CHL-FFC-ENR-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
CHL-FFC-CIP-ENR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
CFL-CHL-FFC-ENR-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	3	5,56
AMP-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
CFL-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
AMO-AMP-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-GEN-SXT	2	3,70
AMO-AMP-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
AMP-CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	3,70
AMO-AMP-CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-GEN-SXT	3	5,56

AMO: amoxicillin, AMP: ampicillin, CFL: cefalexin, CTX: cefotaxime, CHL: chloramphenicol, FFC: florfenicol, CIP: ciprofloxacin, ENR: enrofloxacin, NOR: norfloxacin, DOX: doxycycline, TET: tetracycline, NEO: neomycin, STR: streptomycin, GEN: gentamicin và SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole.

Bảng 4.9: Các kiểu hình đa kháng phổ biến của vi khuẩn *A. hydrophila*

Kiểu hình đa kháng thuốc của vi khuẩn	Số chủng vi khuẩn	Tỷ lệ (%)
AMP-AMO-CFL-TET-SXT	7	13,73
AMP-AMO-CFL-TET-NEO-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-TET-NEO-STR-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-SXT	6	11,76
AMP-AMO-CFL-ENR-TET-NEO-GEN-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-TET-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-GEN-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-TET-NEO- GEN-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	3	5,88
AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-NOR-TET- NEO-STR-GEN-SXT	2	3,92
AMP-AMO-CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-SXT	2	3,92

AMO: amoxicillin, AMP: ampicillin, CFL: cefalexin, CTX: cefotaxime, CHL: chloramphenicol, FFC: florfenicol, CIP: ciprofloxacin, ENR: enrofloxacin, NOR: norfloxacin, DOX: doxycycline, TET: tetracycline, NEO: neomycin, STR: streptomycin, GEN: gentamicin và SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole.

#### 4.4.4 Chỉ số đa kháng thuốc MAR của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ số MAR của vi khuẩn *E. ictaluri* ở các tỉnh đều lớn hơn 0,2 (trung bình là 0,56), thấp nhất là 0,43 ở Trà Vinh và cao nhất là 0,65 ở Tp. Cần Thơ (Bảng 4.10). Tương tự, chỉ số đa kháng thuốc MAR của vi

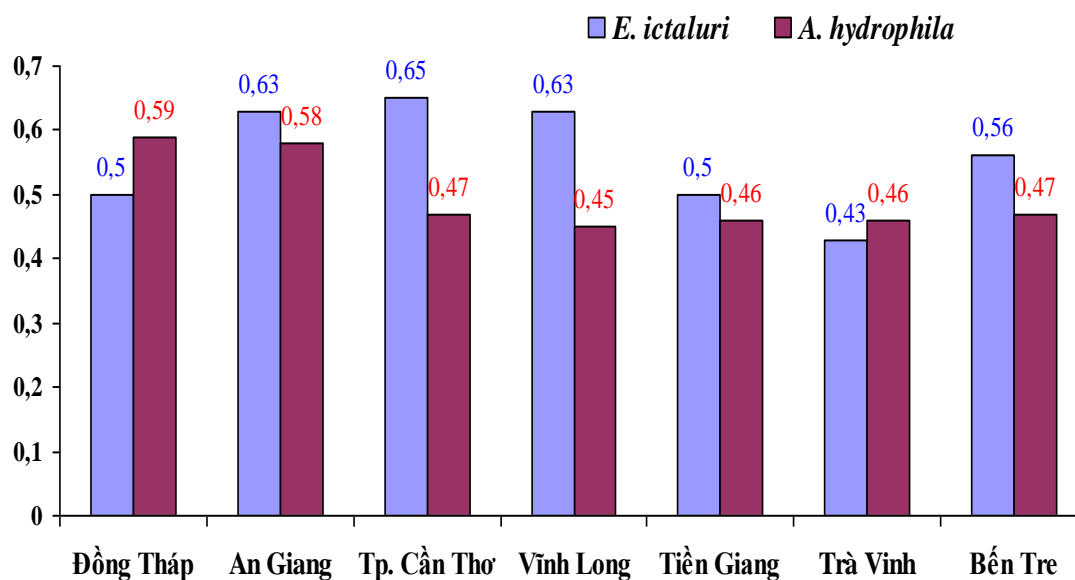
khuẩn *A. hydrophila* ở các tỉnh cũng đều lớn hơn 0,2 (trung bình là 0,50), thấp nhất là 0,45 ở Vĩnh Long và cao nhất là 0,59 ở Đồng Tháp (Bảng 4.10). Như vậy, chỉ số MAR của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong nghiên cứu phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của các tác giả (Sarter *et al.*, 2007; Matyar *et al.*, 2008; Matyar *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011). Nghiên cứu của Miranda and Zemelman (2002) cho thấy chỉ số MAR của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá hồi Chile có giá trị dao động từ 0,38 đến 0,48. Kết quả nghiên cứu của Jacobs and Chenia (2007) cho thấy chỉ số MAR của các chủng vi khuẩn *Aeromonas* spp. dao động từ 0,12 đến 0,59. Nghiên cứu của Wei *et al.* (2011) cho thấy chỉ số MAR của các chủng vi khuẩn *E. tarda* phân lập từ cá loài cá nuôi như *C. gariepinus*, *Oreochromis* sp., *Monopterus albus* và *Trichogaster pectoralis* ở Malaysia là 0,43, trong khi chỉ số này ở các vi khuẩn phân lập từ các loài cá hoang dã là 0,15. Kết quả nghiên cứu của Shah *et al.* (2012) cho thấy chỉ số MAR của hệ vi khuẩn thu thập từ các mẫu nước, bùn đáy ao, từ cá bệnh và cá khỏe của các ao nuôi cá chép ở Pakistan and Tanzania dao động từ 0,2 đến 0,1. Trong khi đó, báo cáo của Laith and Najiah (2013) cho thấy các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* đa kháng kháng có chỉ số MAR dao động từ 0,1 đến 0,5. ở ĐBSCL, nghiên cứu của Nguyen *et al.* (2014) trên các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* spp. và *Aeromonas* spp. phân lập từ môi trường ao nuôi cá tra cũng có chỉ số đa kháng là 0,457 và 0,293. Gần đây, chỉ số MAR của các vi khuẩn gây bệnh trên cá hồi nuôi ở Thổ Nhĩ Kỳ cũng được xác định là dao động từ 0,2 đến 0,6 (Türe and Alp, 2016).

Bảng 4.10: Chỉ số đa kháng MAR của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở 1 số tỉnh ĐBSCL

Vi khuẩn	Đồng Tháp	An Giang	Tp. Cần Thơ	Vĩnh Long	Tiền Giang	Trà Vinh	Bến Tre	Trung bình
<i>E. ictaluri</i>	0,50	0,63	0,65	0,63	0,50	0,43	0,56	0,56
<i>A. hydrophila</i>	0,59	0,58	0,47	0,45	0,46	0,46	0,47	0,50

Như vậy, chỉ số đa kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này ở các tỉnh thường cao hơn chỉ số đa kháng thuốc của vi khuẩn *A. hydrophila* với giá trị trung bình lần lượt là 0,56 và 0,50 (Bảng 4.10 và Hình 4.33). Kết quả này cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được phân lập từ nơi có việc sử dụng kháng sinh nhiều và thường xuyên trong ao nuôi cá tra. Điều này phù hợp với các điều tra về tình hình sử dụng kháng sinh trong các ao nuôi cá tra ở ĐBSCL của các tác giả trước đây (Trương Quốc Phú và Trần Kim Tính, 2012; Nguyễn Quốc Thịnh và *ctv.*, 2014). Theo Nguyễn Chính (2005) thì có đến 97% người nuôi cá bè và 62,5% người nuôi ao sử dụng thuốc và hoá chất trong

phòng và trị bệnh cá và các loại kháng sinh được sử dụng rộng rãi là ENR, CIP, AMO và AMP. Nghiên cứu của Lê Minh Long và *ctv.* (2014) cho thấy có 19 loại sản phẩm có chứa kháng sinh được sử dụng trong ao nuôi cá tra ở Đồng Tháp. Trong số đó thì kháng sinh cấm ENR được sử dụng nhiều nhất và các kháng sinh khác được sử dụng rộng rãi là AMO, trimethoprim, CIP, oxytetracycline và FFC. Trong khi đó, kết quả điều tra của Phu *et al.* (2015) cho thấy có 24 loại kháng sinh khác nhau được sử dụng trong ao nuôi cá và hầu hết các kháng sinh thường được kết hợp với nhau để phòng và trị bệnh trên cá tra ở ĐBSCL. Điều này cho thấy vi khuẩn trong môi trường ở các ao nuôi cá tra ở ĐBSCL đang phải chịu áp lực rất lớn của hàm lượng kháng sinh cao. Đây là lý do giải thích tại sao chỉ số đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập trong nghiên cứu có chỉ số đa kháng thuốc đều lớn hơn 0,2.



Hình 4.33: So sánh chỉ số đa kháng MAR của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở 1 số tỉnh ĐBSCL.

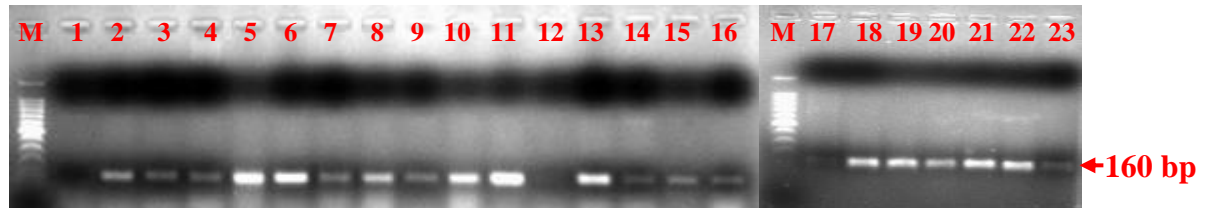
#### 4.5 Sự hiện diện các integron nhóm 1, 2 và 3 ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

##### 4.5.1 Sự hiện diện các integron nhóm 1, 2 và 3

Integron là yếu tố di truyền vận động có vai trò quan trọng trong việc phát tán các gen kháng thuốc của vi khuẩn Gram âm, đặc biệt là chúng hiện diện phổ biến ở các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* (Fluit and Schmitz, 1999). Cho đến nay, các integron đã được tìm thấy ở các loài vi khuẩn gây bệnh ở người, gia súc, gia cầm và các loài vi khuẩn hiện diện trong các môi trường tự nhiên (Iversen *et al.*, 2003; Martinez, 2009; Barlow *et al.*, 2004; Vasilakopoulou *et al.*

2009; Yang *et al.*, 2010; Odumosu *et al.*, 2013; Koczura *et al.*, 2014). Trong lĩnh vực NTTS, nhiều báo cáo cho thấy sự hiện diện của các integron nhóm 1 ở các loài vi khuẩn kháng thuốc (Gorbach, 2001; Teuber, 2001; Cabello, 2006; Nawaz *et al.*, 2009; Burrridge *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật PCR đã xác định được 62/141 (43,97%) chủng vi khuẩn dương tính với gen *IntI1* với kích thước sản phẩm PCR được khuếch đại là 160 bp (Hình 4.34). Trong số 62 chủng vi khuẩn dương tính với gen *IntI1* thì có 24/67 (chiếm 35,82%) chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (Bảng 4.11) và 38/74 (chiếm 51,35%) chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (Bảng 4.12). Sản phẩm PCR của 1 số chủng dương tính với gen *IntI1* (chọn 3 mẫu từ vi khuẩn *E. ictaluri* và 3 mẫu từ vi khuẩn *A. hydrophila*) để giải trình tự nhằm xác nhận tính chính xác của phản ứng PCR (Phụ lục S1). Kết quả Blast trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy các gen *IntI1* ở 2 loài vi khuẩn tương đồng 98-100% với gen *IntI1* của vi khuẩn *P. aeruginosa* chủng B-2175P/15 (KY171972.1) và vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* (FJ711659.1). Nhìn chung, qua kết quả nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ xuất hiện các integron nhóm 1 ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* cao hơn các nghiên cứu đã được báo cáo. Kết quả này có thể là do việc sử dụng kháng sinh trong NTTS không được kiểm soát và quản lý chặt chẽ nên dẫn đến hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn ngày càng tăng. Kết quả nghiên cứu của Nawaz *et al.* (2009) cho thấy 14/63 (chiếm 22%) chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ các ao trên cá da trơn ở Mỹ có sự hiện diện của các integron nhóm 1. Các chủng vi khuẩn *A. veronii* phân lập từ cá da trơn trong nghiên cứu của Nawaz *et al.* (2010) có tỷ lệ xuất hiện các integron nhóm 1 là 48%, cao hơn tỷ lệ này ở vi khuẩn *E. ictaluri* nhưng thấp hơn vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này. Trong khi đó, nghiên cứu của Ndi and Barton (2012) cho thấy 23% số chủng vi khuẩn *Pseudomonas* spp. phân lập trên cá hồi và trong bùn ở Australia có sự hiện diện của các integron nhóm 1. Vega-Sanchez *et al.* (2014) đã phát hiện chỉ có 3 loài vi khuẩn *A. allosaccharophila*, *A. hydrophila* và *A. sobria* phân lập từ cá hồi (*Onchorynchus mykiss*) ở Mexico có các integron nhóm 1 với tỷ lệ là 6,2%. Nghiên cứu của Koczura *et al.* (2014) cho thấy các vi khuẩn Gram âm như *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pasteurella multocida* và *A. hydrophila* thu thập ở 1 công viên của Ba Lan có các integron nhóm 1 hiện diện với tỷ lệ là 76,47% (13/17 chủng). Báo cáo của Kotlarska *et al.* (2015) cho thấy tỷ lệ integron nhóm 1 hiện diện ở vi khuẩn *E. coli* phân lập từ nhà máy xử lý nước thải ở Ba Lan là 32,06%. Trong khi đó, các nghiên cứu khác cho thấy tỷ lệ xuất hiện các integron nhóm 1 cao hơn trong nghiên cứu này. Schmidt *et al.* (2001a) cho thấy các integron nhóm 1 được tìm thấy ở 26/40 (chiếm 65%) chủng vi khuẩn *A. salmonicida* phân lập từ cá hồi ở Bắc Mỹ và Bắc Âu. Nghiên cứu của Jacobs and Chenia (2007) cho thấy

các chủng vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân lập từ các hệ thống nuôi thủy sản ở Nam Phi có tần số xuất hiện các integron nhóm 1 là 51,3% cao hơn vi khuẩn *E. ictaluri*. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Lukkana *et al.* (2012) cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis nilotica*) nuôi ở Thái Lan có integron nhóm 1 hiện diện là 46% (23/50 chủng).



Hình 4.34: Kết quả PCR xác định các gen *IntI1* ở vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

*M*: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1: đối chứng âm; giếng 2-16: thứ tự vi khuẩn *A. hydrophila*: 1A3, 2A3, 3A3, 6A3, 7A3, 10A3, 11A3, 14A3, 17A3, 19A3, 20A3, 23A3, 28A3, 31A3 và 34A3; giếng 17-23: thứ tự vi khuẩn *E. ictaluri*: 1ED3, 4ED3, 7ED3, 8ED3, 11ED3, 12ED3 và 13ED3.

Ngoài ra, qua kết quả nghiên cứu của đề tài cũng cho thấy tỷ lệ hiện diện các integron nhóm 1 của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* thấp hơn so với các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* (Hình 4.35). *A. hydrophila* là loài vi khuẩn gây bệnh cho nhiều loài ĐVTS và phân bố rộng rãi trên thế giới (Pathiratne *et al.*, 1994; Lio-Po *et al.*, 1998; Vivas *et al.*, 2004). Sự hiện diện của các integron nhóm 1 ở giống *Aeromonas* trong NTTS được báo cáo ở nhiều quốc gia trên thế giới như Hà Lan, Na Uy, Scotland, Pháp, Nhật, Nam Phi và Mỹ (Jacobs and Chenia, 2007; Nawaz *et al.*, 2010; Kadlec *et al.*, 2011; Ndi and Barton, 2011). Trong nghiên cứu này, các integron nhóm 1 được tìm thấy ở vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh XH trên cá tra với tỷ lệ là 51,35%. Nghiên cứu của L'abée-Lund and Sørnum (2001) đã phát hiện các integron nhóm 1 trên vi khuẩn *A. salmonicida* với tỷ lệ là 55,3%. Đồng thời, các integron nhóm này cũng đã được báo cáo ở vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi ở Thái Lan với tỷ lệ là 46% (Lukkana *et al.*, 2011) và trên cá chép ở Mexico là 43,5% (Sarria-Guzmán *et al.*, 2014). Trong khi đó, sự hiện diện của các integron nhóm 1 trên vi khuẩn *E. ictaluri* thì hầu như ít được đề cập đến mặc dù các loài vi khuẩn thuộc giống *Edwardsiella* cũng là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng cho nhiều động vật trong NTTS (Hawke *et al.*, 1981; Yussua *et al.*, 2003, Crumlish *et al.*, 2002). Qua khảo sát cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh GTM trên cá tra trong nghiên cứu này có tần xuất hiện diện các integron nhóm 1 là 35,82%. Như vậy, tỷ lệ các integron nhóm 1 ở vi khuẩn *E. ictaluri* thấp hơn so với vi khuẩn *A. hydrophila* (Hình 4.32). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Goldstein *et al.* (2001) thì không phát hiện các integron nhóm 1 và 2 ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *E. tarda* phân lập từ cá da trơn, lươn và cá hồi.



Bảng 4.11: Sự hiện diện các integron nhóm 1 và kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn *E. ictaluri*

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	Số lượng plasmid	Gen <i>IntI1</i>	Kích thước vùng gen cassette (kbp)	Gen được mã hóa	Gen <i>qacEΔ1</i>	Gen <i>Sul1</i>	Gen <i>Sul2</i>	Gen <i>Sul3</i>
1	1ED3	CFL-CTX-CHL-FFC-ENR-DOX-TET-NEO-STR-SXT	2	+	1,0	<i>aadA1</i>	+	+	-	“
2	4ED3	AMO-AMP-CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	2	+	2,5	<i>blaVIM-1-aadB-dfrA1</i>	+	+	-	“
3	7ED3	CFL-CTX-CHL-FFC-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	-	-	“	+
4	8ED3	CFL-CHL-FFC-ENR- TET-NEO-STR-SXT	2	+	1,0	<i>aadA1</i>	+	+	+	“
5	11ED3	FFC-STR-SXT	2	+	0,65	<i>dfrA1- OrfC</i>	-	-	“	“
6	12ED3	CHL-FFC-TET-STR-NEO-SXT	2	+	0,95	<i>aadA2</i>	+	+	+	
7	13ED3	CHL-FFC-DOX-TET-STR-SXT	2	+	0,95	<i>aadA2</i>	-	-	“	“
8	17ED3	CFL-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	+	2,5	<i>blaVIM-1-aadB-dfrA1</i>	+	+	-	“
9	20ED3	AMP-CHL-FFC- ENR-NOR- TET-NEO-S-SXT	2	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	+	+	+	“
10	21ED3	AMP-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-GEN-SXT	2	+	2,5	<i>blaVIM-1-aadB-dfrA1</i>	+	+	+	“
11	22ED3	CHL-FFC-CIP-TET-SXT	2	+	0,65	<i>dfrA1</i>	-	-	“	+
12	2ED4	AMP-CHL-FFC-TET-STR-GEN-SXT	2	+	0,8	<i>dfrA7</i>	-	-	“	+
13	3ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	-	“
14	6ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	+	“
15	10ED4	CHL-FFC-ENR-TET-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	+	“
16	15ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	+	“
17	17ED4	AMP-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-SXT	2	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	+	+	-	“
18	19ED4	CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	2	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	-	-	“	“
19	25ED4	CHL-FFC-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	2	+	1,0	<i>aadA1</i>	+	+	-	“
20	26ED4	CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-STR-	2	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	+	+	-	“

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	Số lượng plasmid	Gen <i>IntI1</i>	Kích thước vùng gen cassette (kbp)	Gen được mã hóa	Gen <i>qacEΔ1</i>	Gen <i>Sul1</i>	Gen <i>Sul2</i>	Gen <i>Sul3</i>
		SXT								
21	29ED4	AMP-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-GEN-SXT	2	+	2,5	<i>blaVIM-1-aadB-dfrA1</i>	-	-	“	+
22	32ED4	CHL-FFC-CIP-TET-STR-GEN-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	-	“
23	33ED4	CHL-FFC-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	-	“
24	35ED4	CHL-FFC- ENR-NOR-DOX-TET-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	-	“

+: dương tính, -: âm tính, “: không thực hiện phản ứng PCR để phát hiện gen kháng sulfonamide ở chủng vi khuẩn tương ứng.

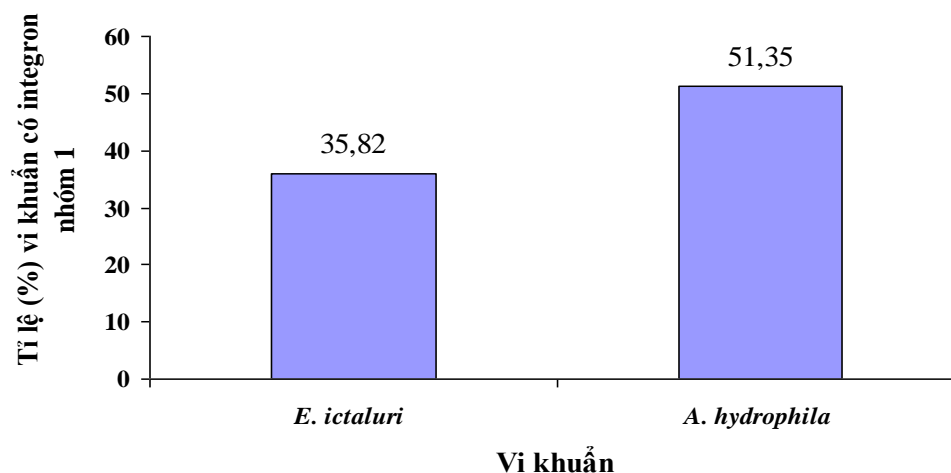
Bảng 4.12: Sự hiện diện các integron nhóm 1 và kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn của vi khuẩn *A. hydrophila*

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	Số lượng plasmid	Gen <i>IntI1</i>	Kích thước vùng gen cassette (kbp)	Gen được mã hóa	Gen <i>qacEΔ1</i>	Gen <i>Sul1</i>	Gen <i>Sul2</i>	Gen <i>Sul3</i>
1	1A3	AMP-AMO-CFL-CTX-CHL-FFC-TET-SXT	3	+	1,2	<i>dfrA27</i>	-	-	“	+
2	2A3	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	+	“
3	3A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	3	+	-		+	+	-	“
4	6A3	AMP-AMO-CFL- TET-NEO-SXT	1	+	0,95	<i>aadA2</i>	+	+	-	“
5	7A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-SXT	2	+	-		-	-		+
6	10A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC- TET-NEO-SXT	2	+	-		+	+	+	“
7	11A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	3	+	0,95	<i>aadA2</i>	+	+	+	“
8	14A3	AMP-AMO-CFL- CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	3	+	2,5	<i>blaVIM-1- aadB- dhfrA1</i>	+	+	-	“
9	17A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	2	+	2,5	<i>blaVIM-1- aadB- dhfrA1</i>	+	+	-	“
10	19A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	2	+	-		-	-	“	+
11	20A3	AMP-AMO-CFL-CHL-TET-STR-SXT	1	+	0,95	<i>aadA2</i>	+	+	-	“

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	Số lượng plasmid	Gen <i>IntI1</i>	Kích thước vùng gen cassette (kbp)	Gen được mã hóa	Gen <i>qacEΔ1</i>	Gen <i>Sul1</i>	Gen <i>Sul2</i>	Gen <i>Sul3</i>
12	23A3	AMP-AMO-CFL-CHL-TET-SXT	4	+	0,95	<i>aadA2</i>	+	+	-	“
13	25A3	AMP-AMO-CFL-FFC-SXT	3	+	-		-	-		+
14	28A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	2	+	0,95	<i>aadA2</i>	+	+	+	“
15	31A3	AMP-AMO-CFL- TET-SXT	2	+	0,65	<i>dfrA1</i>	+	+	+	“
16	34A3	AMP-AMO-CFL-CHL- CIP-ENR-NOR-TET-NEO-GEN-SXT	2	+	2,5	<i>blaVIM-1- aadB- dhfrA1</i>	-	-	“	“
17	37A3	AMP-AMO-CFL-FFC-ENR-DOX-TET-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	-	-	“	“
18	38A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-NOR-TET-SXT	2	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	+	+	+	“
19	39A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	2	+	0,95	<i>aadA2</i>	+	+	-	“
20	40A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-SXT	2	+	-		+	+	-	“
21	1A4	AMP-AMO-CFL-TET-SXT	2	+	-		-	-	“	“
22	2A4	AMP-AMO-CFL-CTX-FFC-TET-NEO-STR-GEN-SXT	3	+	2,5	<i>blaVIM-1- aadB- dhfrA1</i>	+	+	+	“
23	5A4	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-SXT	2	+	1,0	<i>aadA1</i>	+	+	+	“
24	9A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-NOR-TET-NEO-SXT	2	+	-		+	+	-	“
25	10A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-SXT	4	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	-	“
26	13A4	AMP-AMP-CFL-TET-NEO-SXT	2	+	0,65	<i>dfrA1</i>	-	-	“	+
27	17A4	AMP-AMP-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	3	+	1,2	<i>dfrA27</i>	-	-	“	+
28	18A4	AMP-AMO-CFL-NEO-SXT	4	+	0,65	<i>dfrA1</i>	-	-	“	“
29	22A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	1	+	1,0	<i>aadA1</i>	-	-	“	+
30	23A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	1	+	1,0	<i>aadA1</i>	+	+	-	“
31	25A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-GEN-SXT	4	+	1,2	<i>dfrA27</i>	+	+	-	“
32	26A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	1	+	1,0	<i>aadA1</i>	+	+	+	“
33	28A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-	1	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	+	+	-	“

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	Số lượng plasmid	Gen <i>IntI1</i>	Kích thước vùng gen cassette (kbp)	Gen được mã hóa	Gen <i>qacEΔ1</i>	Gen <i>Sul1</i>	Gen <i>Sul2</i>	Gen <i>Sul3</i>
34	29A4	NEO-STR-NEO-SXT AMP-AMO-CFL-FFC-DOX-TET-NEO-SXT	2	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	+	+	+	“
35	30A4	AMP-AMO-CFL-CIP-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	+	1,2	<i>dfrA27</i>	-	-	“	“
36	31A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-GEN-SXT	3	+	1,2	<i>dfrA27</i>	-	-	“	“
37	32A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	+	2,5	<i>blaVIM-1- aadB- dhfrA1</i>	+	+	+	“
38	33A4	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	+	1,5	<i>dfrA1-aacA4</i>	-	-	“	+

+: dương tính; -: âm tính; “: không thực hiện phản ứng PCR để phát hiện gen kháng sulfonamide ở chủng vi khuẩn tương ứng.



Hình 4.35: Tỷ lệ (%) xuất hiện các các integron nhóm 1 ở 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

Trong khi đó, các integron nhóm 2 và 3 không được phát hiện ở tất cả các chủng của 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy nhiều loài vi khuẩn cũng không có sự xuất hiện của các integron nhóm 2 và 3 (Lee *et al.*, 2008; Lukkana *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2016). Các integron nhóm 2 hiện diện phổ biến ở các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* và thường liên kết với các transposon Tn7 (Cambray *et al.*, 2010). Hiện tại, các integron nhóm 2 được tìm thấy chủ yếu ở vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho người, động vật và hiện diện trên các môi trường tự nhiên (Goldstein *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2010). Nghiên cứu của Saenz *et al.* (2004) cho thấy 4/17 chủng (chiếm 23,53%) *E. coli* có nguồn gốc từ con người, động vật và thực phẩm có các integron nhóm 2. Kết quả nghiên cứu của Tajbakhsh *et al.* (2015) cho thấy chỉ có 10% các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ nước nuôi trồng thủy sản ở Iran có các integron nhóm 2. Trong lĩnh vực NTTS, cho đến nay chưa có báo cáo nào về sự hiện diện của các integron nhóm 2 ở vi khuẩn *E. ictaluri*, kể cả các vi khuẩn khác của giống *Edwardsiella*. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Goldstein *et al.* (2001) cho thấy trong tổng số 59 chủng vi khuẩn *Edwardsiella* (gồm 11 chủng *E. ictaluri* và 48 chủng *E. tarda*) phân lập từ cá da trơn, lương và cá hồi không có sự hiện diện của các integron nhóm 2. Trong khi đó, sự hiện diện của các integron nhóm 2 ở nhóm vi khuẩn *Aeromonas* nói chung và ở vi khuẩn *A. hydrophila* chế nói riêng cũng còn rất hạn chế. Kết quả nghiên cứu của Jacobs and Chenia (2007) cho thấy 27% (10/37) chủng vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân lập từ các hệ thống nuôi thủy sản ở Nam Phi mang các integron nhóm 2. Đặc biệt, kết quả nghiên cứu còn cho

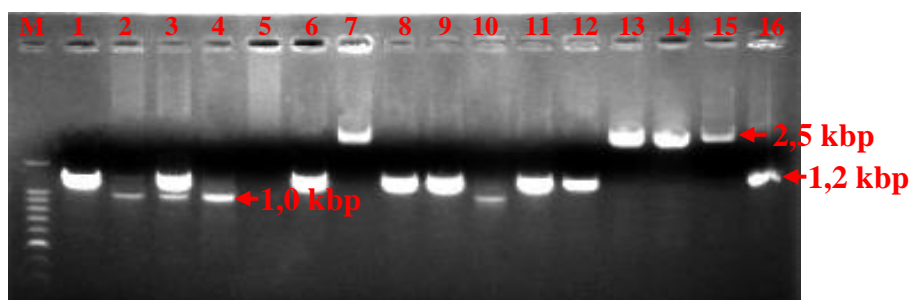
thấy 1 chủng vi khuẩn *A. salmonicida* và 4 chủng *A. veronii* biovar *sobria* mang cùng lúc integron nhóm 1 và 2. Trong khi đó, chỉ có 2/82 (chiếm 2% ) chủng vi khuẩn *E. coli* được khảo sát trong nghiên cứu của Shaheen *et al.* (2010) cho kết quả dương tính với các integron nhóm 2. Nawaz *et al.* (2010) thì không phát hiện các integron nhóm 2 đối với các chủng vi khuẩn *A. veronii* phân lập từ cá da trơn ở Mỹ, trong khi các chủng vi khuẩn này dương tính với integron nhóm 1 là 48%. Kết quả tương tự được tìm thấy trong báo cáo của Ndi and Barton (2011) khi *Aeromonas* spp. phân lập từ cá hồi ở Úc không có integron nhóm 2 (90 chủng). Nghiên cứu của Nguyen *et al.* (2014) cho thấy sự hiện diện của các integron nhóm 1 ở vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân lập từ môi trường ao nuôi cá tra ở ĐBSCL là 28,3% (15/53 chủng) nhưng không có bất kỳ integron nhóm 2 nào được phát hiện trong báo cáo này. Trong khi đó, kết quả khảo sát sự hiện diện của các integron nhóm 1 và 2 ở vi khuẩn *E. coli* gây bệnh đường ruột (enteropathogenic) của Memariani *et al.* (2014) cho thấy chỉ có 2/42 chủng (4.8%) có integron nhóm 2, trong khi các integron nhóm 1 là 57,1% (24/42 chủng). Gần đây, Deng *et al.* (2016) đã phân lập và xác định các integron nhóm 1, 2 và 3 ở 122 chủng vi khuẩn *Aeromonas* spp. (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. dhakensis*, *A. jandaei*, *A. trota* và *A. media*) gây bệnh trên các loài ĐVTS như cá, cá cảnh, tôm, rùa và lưỡng cư. Kết quả cho thấy chỉ có 22 (chiếm 19,6%) chủng vi khuẩn dương tính với các integron nhóm 1, trong khi các integron nhóm 2 và 3 thì không được phát hiện.

Các integron nhóm 3 được phát hiện lần đầu tiên bởi Arakawa *et al.* (1995) từ chủng vi khuẩn *Serratia marcescens* TN9106 kháng carbapenem. Cho đến nay, rất ít loài vi khuẩn được báo cáo là có sự hiện diện của integron nhóm 3 và các integron nhóm này chỉ được báo cáo trên 1 vài loài vi khuẩn như *Alcaligenes xylosoxidans* (Fluit and Schmitz, 2004), *Citrobacter freundii* (Tchuinte *et al.*, 2016), *E. coli* (Kargar *et al.*, 2014), *Klebsiella pneumoniae* (Correia *et al.*, 2003; Fluit and Schmitz, 2004), *P. aeruginosa* (Fluit and Schmitz, 2004), *P. putida* (Fluit and Schmitz, 2004), *Salmonella* spp. (Ploy *et al.*, 2003) và *Enterobacter cloacae* (Barraud *et al.*, 2013). Nghiên cứu của Jacobs and Chenia (2007) đã xác định 5/37 (chiếm 13.5%) chủng vi khuẩn *A. veronii* biovar *sobria* phân lập từ các hệ thống nuôi thủy sản ở Nam Phi dương tính với cả 2 integron nhóm 2 và 3. Xu *et al.* (2007) lần đầu tiên phát hiện các integron nhóm 3 từ 2 chủng vi khuẩn *Delftia acidovorans* C17 và *D. tsuruhatensis* A90. Tương tự, Barraud *et al.* (2013) đã xác định các integron nhóm 3 từ vi khuẩn *Enterobacter cloacae* phân lập từ nước thải bệnh viện ở Pháp. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của các tác

giả Ndi and Barton (2011), Ndi and Barton (2012), Deng *et al.* (2016) thì không phát hiện các integron nhóm 3 ở các loài vi khuẩn thuộc giống *Aeromonas* như *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. dhakensis*, *A. jandaei*, *A. trota* và *A. media* và các loài vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* và *Pseudomonas* spp.).

#### 4.5.2 Đặc điểm vùng gen cassette của các chủng *E. ictaluri* và *A. hydrophila* dương tính với integron nhóm 1

Các gen cassette nằm giữa vùng 5'-CS và 3'-CS của các integron nhóm 1 và có kích thước thay đổi tùy thuộc vào các gen kháng thuốc chèn vào. Trong nghiên cứu này, đặc điểm vùng gen cassette của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* dương tính với các integron nhóm 1 cũng được xác định bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự. Kết quả khảo sát của đề tài cho thấy vùng gen cassette được khuếch đại ở tất cả 24 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* dương tính với các integron nhóm 1 (Hình 4.36) với các kích thước khoảng 0,65 kbp, 0,8 kbp, 0,95 kbp, 1,0 kbp, 1,2 kbp, 1,5 kbp và 2,5 kbp (Bảng 4.13). Vùng gen cassette được khuếch đại nhiều nhất trong nghiên cứu này là vùng có kích thước 1,2 kbp (8/24 chủng, chiếm 33,33%), kế đến là 1,5 và 2,5 kbp (4/24 chủng, chiếm 16,67%), 1,0 kbp (3/24 chủng, chiếm 12,5%), 0,65 và 0,95 kbp (2/24 chủng, chiếm 8,33%) và thấp nhất là 0,8 kbp (1/24 chủng, chiếm 4,17%).



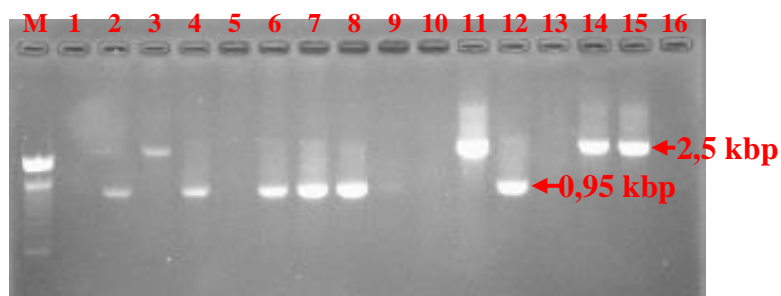
Hình 4.36: Vùng gen cassette của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* dương tính với các integron nhóm 1.

M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 2,4, 10 (KT 1,0 kbp): thử tự các chủng *E. ictaluri*: 1ED3, 8ED3, 25ED3; giếng 1,3,6, 8, 9, 11,12,16 (KT 1,2 kbp): thử tự các chủng *E. ictaluri*: 7ED3,3ED4, 10ED4, 15ED4,32ED4, 33ED4 và 35ED4; giếng 7, 13, 14, 15(KT 2,5 kbp): thử tự các chủng *E. ictaluri*: 4ED3, 17ED3, 21ED3 và 29ED4; giếng 5: đối chứng âm.

Trong khi đó, chỉ có 30/38 (chiếm 78,94%) chủng vi khuẩn *A. hydrophila* dương tính với các integron nhóm 1 khuếch đại được vùng gen cassette (Hình 4.37) với các kích thước khoảng 0,65 kbp, 0,95 kbp, 1,0 kbp, 1,2 kbp, 1,5 kbp và 2,5 kbp (Bảng 4.13). Như vậy, tỷ lệ các chủng vi khuẩn không có vùng gen cassette được khuếch đại chiếm tỷ lệ tương đối cao trong nghiên cứu này (8/38 chủng âm tính, chiếm 21,05%). Vùng gen cassette được khuếch đại nhiều nhất

trong nghiên cứu này là vùng có kích thước 1,2 kbp (8/30 chủng, chiếm 26,67%), kế đến là vùng 0,95 kbp (6/30 chủng, chiếm 20%), vùng 2,5 kbp (5/30 chủng, chiếm 16,67%), vùng 1,0 và 1,5 kbp (4/30 chủng, chiếm 13,33%) và thấp nhất là vùng có kích thước 0,65 kbp (3/30, chiếm 10%).

Các chủng vi khuẩn có vùng gen cassette được khuếch đại với các kích thước khác nhau được chọn để giải trình tự (Bảng 4.13). Kết quả Blast trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy vùng gen cassette có kích thước 0,65 kbp mang gen *dfrA1* (kết quả giải trình tự được trình bày ở Phụ lục S2A), mã hóa enzyme dihydrofolate reductase kháng đối với kháng sinh trimethoprim) tương đồng 99% với gen *dfrA1* của vi khuẩn *A. jandaei* chủng M3 (KR270484.1) và vi khuẩn *A. hydrophila* chủng A-B12B (KM401409.1).



Hình 4.37: Vùng gen cassette của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* dương tính với các integron nhóm 1.

M: thang chuẩn 100 bp; giếng 2, 4, 6, 7, 8 và 12 (KT 0,95 kbp): 6A3, 11A3, 20A3, 23A3, 28A3 và 39A3; giếng 3, 11, 14, 15 (KT 2,5 kbp): 14A3, 17A3, 34A3 và 2A4.

Vùng gen cassette có kích thước 0,8 kbp mang gen *dfrA7* (Phụ lục S2B) cũng là gen mã hóa enzyme dihydrofolate reductase kháng đối với kháng sinh trimethoprim tương đồng 99-100% với gen *dfrA7* của vi khuẩn *S. enterica* chủng S16699 (KM823525.1), *E. coli* chủng APp10411 (KF914306.1) và vi khuẩn *S. flexneri* (AF139109.1).

Vùng gen cassette có kích thước 0,95 kbp mang gen *aadA2* (Phụ lục S2C) mã hóa enzyme aminoglycoside adenytransferase kháng đối với kháng sinh streptomycin và spectinomycin tương đồng 99-100% với gen *aadA2* của vi khuẩn *P. aeruginosa* chủng M-B10D (KJ723459.1), *P. putida* chủng BF25 (KY047415.1) và vi khuẩn *Campylobacter jejuni* chủng CIT134C (AF530636.1).

Vùng gen cassette có kích thước 1,0 kbp mang gen *aadA1* (Phụ lục S2D) cũng mã hóa enzyme aminoglycoside adenytransferase kháng đối với kháng sinh streptomycin và spectinomycin tương đồng 99% với gen *aadA1* của vi khuẩn *A.*



*media* chủng ER.1.5 (FJ460176.2 ) và vi khuẩn *V. cholerae* chủng TJVC95528 (GQ214171.1),

Vùng gen cassette có kích thước 1,2 kbp mang gen *dfrA27* (Phụ lục S2E) cũng là gen mã hóa enzyme dihydrofolate reductase kháng đối với kháng sinh trimethoprim tương đồng 99-100% với gen *dfrA27* của vi khuẩn *K. pneumoniae* chủng Kp1 (FJ459817.1), *E. coli* chủng NF901916 (HQ880264.1) và *Aeromonas* sp. chủng VIICFP4 (HQ386839.1).

Vùng gen cassette có kích thước 1,5 kbp thì mang gen 2 gen *dfrA1* và *aacA4* (Phụ lục S2G) mã hóa enzyme dihydrofolate reductase và aminoglycoside N(6')-acetyltransferase kháng đối với kháng sinh trimethoprim và các kháng sinh nhóm aminoglycoside tương đồng 99-100% với vùng gen *dfrA1-aacA4* của vi khuẩn *E. coli* chủng i2-3 (KY114596.1) và vi khuẩn *E. coli* chủng i1-8 (KY114592.1).

Trong khi đó, vùng gen cassette có kích thước 2,5 kbp mang 3 gen *blaVIM-1*, *aadB* và *dfrA1* (Phụ lục S2F) mã hóa lần lượt cho các enzyme  $\beta$ -lactamase, aminoglycoside-2'adenyltransferase và dihydrofolate reductase kháng đối với kháng sinh các kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam, nhóm aminoglycoside và trimethoprim tương đồng 99% với vùng gen *blaVIM-1-aadB-dfrA1* của vi khuẩn *Providencia vermicola* chủng NBA-2365 (KC709652.1).

Cho đến nay, có hơn 100 vùng gen cassette khác nhau đã được phát hiện ở các integron và hầu hết chúng đều mã hóa cho kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn (Fluit and Schmitz, 1999; White *et al.*, 2001; Jacobs and Chenia, 2007). Kết quả nghiên cứu này cho thấy có 7 vùng gen cassette (Bảng 4.13) được tìm thấy ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* và phần lớn các vùng gen cassette trong nghiên cứu đều mã hóa cho tính kháng kháng sinh trimethoprim (gen *dfrA27*: 16/54 chủng, gen *dfrA1*: 5/54 chủng, *dfrA7*: 1 chủng) và aminoglycoside (gen *aadA1* (7/54 chủng), gen *aadA2* và *aacA4*: 8/54 chủng). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy phần lớn các vùng gen cassette liên kết với integron nhóm 1 của nhiều loài vi khuẩn mang gen kháng với aminoglycoside, sulfonamide và trimethoprim (White *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2010). Tuy nhiên, sự khác nhau về tỷ lệ xuất hiện cũng như sự kết hợp, sắp xếp của các gen trong vùng gen cassette ở các vi khuẩn cho đến nay vẫn chưa được chứng minh. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để làm sáng tỏ vấn đề này.

Bảng 4.13: Kết quả so sánh trình tự các vùng gen cassette của 2 loài vi khuẩn trên ngân hàng NCBI

TT	Gen cassette (kbp)	<i>E. ictaluri</i>	<i>A. hydrophila</i>	Gen mã hóa	Enzyme mã hóa	Kháng sinh
1	0,65	2/24	3/30	<i>dfrA1</i>	Dihydrofolate reductase	Trimethoprim
2	0,8	1/24	0	<i>dfrA7</i>	Dihydrofolate reductase	Trimethoprim
3	0,95	2/24	6/30	<i>aadA2</i>	Aminoglycoside adenytransferase	Streptomycin spectinomycin
4	1,0	3/24	4/30	<i>aadA1</i>	Aminoglycoside adenytransferase	Streptomycin và spectinomycin
5	1,2	8/24	8/30	<i>dfrA27</i>	Dihydrofolate reductase	Trimethoprim
6	1,5	4/24	4/30	<i>dfrA1</i> và <i>aacA4</i>	Dihydrofolate reductase và aminoglycoside N(6')-acetyltransferase	Trimethoprim và các kháng sinh nhóm aminoglycoside
7	2,5	4/24	5/30	<i>blaVIM-1</i> , <i>aadB</i> và <i>dfrA1</i>	$\beta$ -lactamase, aminoglycoside-2'adenyltransferase và dihydrofolate reductase	$\beta$ -lactam, nhóm aminoglycoside và trimethoprim

Cho đến nay, ít nhất 40 gen *dfr* đã được xác định ở các loài vi khuẩn (Roberts *et al.*, 2012). Trong số đó, các gen *dfr* như *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA6*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA13*, *dfrA14*, *dfrA15*, *dfrA16*, *dfrA17*, *dfrA21*, *dfrA22*, *dfrA25* và *dfrA27* đã được tìm thấy trên các integron nhóm 1 (Miko *et al.*, 2005; Peirano *et al.*, 2006; Agersø *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Lukkana *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2014). Các gen *dfrA1*, *dfrA7* và *dfrA27* được phát hiện ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong nghiên cứu này đều nằm trong vùng gen cassette của các integron nhóm 1. Vùng gen cassette mang gen *dfrA1* đã được báo cáo trên nhiều loài vi khuẩn và được cho là vùng gen hiện diện phổ biến nhất ở vi khuẩn (van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007; Vinue *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2012). Nghiên cứu của Schmidt *et al.* (2001a&b) và Miko *et al.* (2005) cho thấy gen *dfrA1* xuất hiện với tỷ lệ cao ở các loài vi khuẩn *Aeromonas* và *Salmonella enterica*. Tuy nhiên, nghiên cứu của Jacobs and Chenia (2007) cũng chỉ phát hiện chỉ có 2 chủng vi khuẩn trong nghiên cứu có gen *dfrA1*, thấp hơn trong nghiên cứu này (5/54 chủng dương tính với integron nhóm 1). Nghiên cứu của Lukkana *et al.* (2012) cũng cho kết quả tương tự khi chỉ xác định gen *dfrA1* trên 3 chủng vi

khuẩn *A. hydrophila* AH146, AH199 và AH173. Vinué *et al.* (2010) đã xác định gen *dfrA1* từ 2 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ máu các bệnh nhân ở 1 bệnh viện của Tây Ban Nha. Nghiên cứu của Saenz *et al.* (2010) cũng đã xác định gen *dfrA1* từ 1 chủng vi khuẩn *E. coli* (thu thập từ các nguồn khác nhau như từ người, động vật và thực phẩm) trong số 13 chủng dương tính với các integron nhóm 1 nhưng không có vùng 3'-CS. Gần đây, kết quả nghiên cứu của Canal *et al.* (2016) cũng đã xác định gen *dfrA1* ở vi khuẩn *E. coli* từ nước bề mặt ở Brazil. Trong khi đó, gen *dfrA27* mặc dù xuất hiện với tỷ lệ cao nhất (16/54 chủng) trong số các gen *dfr* được phát hiện trong nghiên cứu này nhưng vùng gen cassette chỉ mang gen này được báo cáo lần đầu tiên ở vi khuẩn như *E. coli* (Wei *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2015) ở Trung Quốc và Hàn Quốc và *V. cholera* ở Trung Quốc (Sun *et al.*, 2010). Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để làm sáng tỏ nguồn gốc cũng như sự hiện diện phổ biến của gen này trong số các gen kháng trimethoprim được phát hiện ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong nghiên cứu này. Tương tự, vùng gen cassette chỉ mang gen *dfrA7* được tìm thấy chỉ ở 1 chủng vi khuẩn *E. ictaluri*. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nhiều báo cáo trước đây cho thấy vùng gen cassette mang gen *dfrA7* được tìm thấy ở vi khuẩn *Salmonella enterica* (Miko *et al.*, 2005), *E. coli* (White *et al.*, 2000; Karczmarczyk *et al.*, 2011; Mokracka *et al.*, 2012; Bagré *et al.*, 2017), *Proteus* sp. (Shah *et al.*, 2012), *Kluyvera* sp. và *Pantoea* sp. (Mokracka *et al.*, 2012), *Shigella* spp. (Navia *et al.*, 2005; Mandomando *et al.*, 2009). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của Frank *et al.* (2007) cho thấy trong số các gen *dfr* được phát hiện ở các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Shigella* spp. và *Salmonella* spp.) thì gen chiếm tỷ lệ cao nhất *dfrA7* (49%), trong khi đó tỷ lệ xuất hiện của gen *dfrA1* là 17%.

Vùng gen cassette chứa 2 gen *aadA1* và gen *aadA2* đã được tìm thấy trên nhiều loài vi khuẩn khác nhau (Goldstein *et al.*, 2001; Infante *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2006; Kadlec and Schwarz, 2008; Vinue *et al.*, 2008; Shaheen *et al.*, 2010; Vega-Sanchez *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2016). Lee *et al.* (2008) đã tìm thấy gen *aadA1* và gen *aadA2* ở vi khuẩn *Aeromonas* spp. từ các mẫu máu và vết thương của bệnh nhân ở Đài Loan. Nghiên cứu của van Essen-Zandbergen *et al.* (2007) cho kết quả tương tự khi 2 gen *aadA1* và gen *aadA2* được xác định ở 2 loài vi khuẩn *Salmonella* spp. và *E. coli*. Gen *aadA2* trong nghiên cứu của Lukkana *et al.* (2011) được xác định ở 4/14 chủng *A. hydrophila*. Canal *et al.* (2016) cũng đã xác định gen *aadA1* ở vi khuẩn *E. coli* từ nước bề mặt ở Brazil. Kết quả nghiên cứu của Hussein *et al.* (2009) và Kotlarska *et al.* (2015) đã xác định 2 gen *aadA1* và

*aadA2* từ các vi khuẩn Gram âm phân lập ở các bệnh viện của Palestin. Cũng trên các vi khuẩn Gram âm có nguồn gốc từ các mẫu nước ở Ba Lan, Koczura *et al.* (2014) đã xác định gen *aadA1* ở các vi khuẩn *A. hydrophila*, *Pasteurella multocida* và *E. coli*. Trong khi đó, 2 vùng gen cassette có kích thước 1,5 và 2,5 mang 2 gen *dfrA1-aacA4* (8/54 chủng) hoặc 3 gen *blaVIM-1-aadB-dfrA1* (9/54 chủng) trong nghiên cứu này chưa được nhiều nghiên cứu công bố. Cho đến nay, vùng gen cassette *blaVIM-1-aadB-dfrA1* chỉ được báo cáo ở vi khuẩn *Providencia vermicola* từ các bệnh nhân bị tiêu chảy ở Ấn Độ (Rajpara *et al.*, 2015).

#### 4.5.3 Khảo sát vùng 3'-conserved segment (CS) của các integron nhóm 1

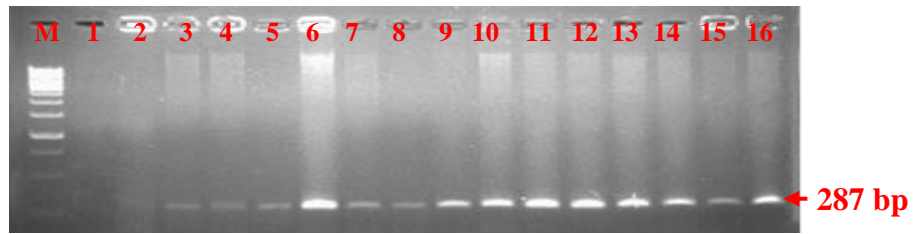
Vùng 3'-conserved segment (3'-CS) của các integron nhóm 1 chứa 2 gen: gen *qacEΔ1* (*qacEΔ1* gene) và gen *sull* (*sull* gene) lần lượt mã hóa cho việc kháng các hợp chất ammonium bậc bốn (quaternary ammonium compound) và các kháng sinh sulfonamide (White *et al.*, 2001; Mazel, 2006). Kết quả PCR cho thấy 41/62 chủng (chiếm 66,13%) vi khuẩn dương tính với các integron nhóm 1 mang cả 2 gen *qacEΔ1* và gen *sull*, bao gồm 17/24 chủng (chiếm 70,83%) *E. ictaluri* và 24/38 chủng (chiếm 63,16%) *A. hydrophila* (Hình 4.38&39). Kết quả giải trình tự để xác nhận lại tính chính xác của phản ứng PCR (Phụ lục S3) cho thấy gen *qacEΔ1* trong nghiên cứu tương đồng 99-100% với gen *qacEΔ1* của vi khuẩn *K. pneumoniae* (AB894355.1), *P. putida* chủng BF25 (KY047415.1), *Variovorax* sp. chủng BF19 (KY047414.1), *Ochrobactrum* sp. chủng BF02 (KY047413.1) và vi khuẩn *Alcaligenes* sp. chủng BF42 (KY047417.1). Tương tự, kết quả giải trình tự gen *sull* (Phụ lục S4) cũng cho thấy gen này tương đồng 100% với gen *sull* trên plasmid R388 (X12869.1). Ngoài ra, qua kết quả nghiên cứu cũng cho thấy không có bất kỳ chủng vi khuẩn thuộc 2 loài vi khuẩn chỉ có gen *qacEΔ1* hoặc gen *sull*. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhiều báo cáo cho thấy các vi khuẩn dương tính với các integron thì đa phần đều có vùng 3'-CS mang 2 gen *qacEΔ1* và gen *sull* (Antunes *et al.*, 2005; Jacobs and Chenia, 2007; Vinue *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2016). Trong khi đó, 21/62 chủng (chiếm 33,87%) vi khuẩn còn lại trong nghiên cứu cho thấy vùng 3'-CS mang 2 gen *qacEΔ1* và gen *sull* không được khuếch đại (Bảng 4.11&12). Như vậy, các integron nhóm 1 không có vùng 3'-CS (được gọi là atypical integron) trong nghiên cứu hiện diện với tỷ lệ thấp hơn các integron nhóm 1 có vùng 3'-CS (được gọi là typical integron). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Vinué *et al.* (2008) cho thấy chỉ có 4/26 chủng vi khuẩn *E. coli* có nguồn gốc từ người dương tính với các integron nhóm 1 không có vùng 3'-CS.

Tuy nhiên, nghiên cứu của Sunde *et al.* (2005) cho thấy các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ thịt và các sản phẩm của thịt lại ở Thụy Điển có các integron nhóm 1 không có gen *sul1* chiếm tỷ lệ cao (9/29 chủng dương tính các integron nhóm 1). Trong nghiên cứu của Dung *et al.* (2009) cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* dương tính với các integron nhóm 1 đều không có vùng 3'-CS. Nghiên cứu của Saenz *et al.* (2010) cho thấy các chủng vi khuẩn *E. coli* có nguồn từ người, động vật và thực phẩm cũng không có gen *qacEΔ1* và gen *sul1*.

Bên cạnh gốc đó, ngoài các gen *sul1* thì nghiên cứu cũng xác định được 18/41 chủng vi khuẩn mang gen *sul2* (Bảng 4.11&12 và Hình 4.40) trên 2 loài vi khuẩn, bao gồm 7 gen *sul2* ở vi khuẩn *E. ictaluri* và 11 gen *sul2* ở vi khuẩn *A. hydrophila*. Kết quả giải trình tự cho thấy các gen *sul2* (Phụ lục S5) trong nghiên cứu tương đồng 99% với gen *sul2* của vi khuẩn *V. cholerae* MO10 (NG 051852.1), *P. multocida* pCCK154 (NG 048114.1), *Mannheimia varigena* pMVSCS1 (NG 048109.1), *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* chủng CJ042 (KU603661.1), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* chủng KP188 (KU603645.1) và vi khuẩn *P. multocida* pVM111 (NG 048112.1). Trong khi đó, kết quả PCR đã phát hiện được 12 gen *sul3* trong tổng số 21 chủng vi khuẩn không có vùng 3'-CS (4 gen *sul3* ở vi khuẩn *E. ictaluri* và 8 gen *sul3* ở vi khuẩn *A. hydrophila* (Bảng 4.11&12 và Hình 4.41). Kết quả giải trình tự cho thấy các gen *sul3* (Phụ lục S5) trong nghiên cứu tương đồng 99% với gen *sul3* của vi khuẩn *E. coli* pVP440 (AJ459418.2), *E. coli* chủng P528.10.99.C4 (FJ196388.1) và *E. coli* chủng P328.10.99.C2 (FJ196386.1). Các kháng sinh sulfonamide từ lâu đã được sử dụng nên nhiều vi khuẩn khác nhau kháng với kháng sinh nhóm này đã được báo cáo (Guerra *et al.*, 2004; Hoa *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2011). Cho đến nay, 3 gen *sul1*, *sul2* và *sul3* liên quan cơ chế kháng sulfonamide đã được xác định (Enne *et al.*, 2002; Petersen and Dalsgaard, 2003; Adesoji *et al.*, 2017). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn kháng sulfonamide đều mang 1 trong 3 gen *sul1*, *sul2* hoặc *sul3*. Trong đó, gen *sul1* thường được phát hiện với tỷ lệ cao hơn 2 gen *sul2* và *sul3* là do gen này là 1 phần trong cấu trúc của các integron nhóm 1 (Carattoli, 2001). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hoa *et al.* (2008) cho thấy tỷ lệ gen *sul1* từ các ao nuôi tôm, kênh trong thành phố và các ao nuôi cá ở Việt Nam và 1 số nước châu Á lần lượt là 92%, 72% và 43%, trong khi gen *sul2* (51%, 19% và 20%) và *sul3* (14%, 6% và 8%). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Infante *et al.* (2005) cho thấy gen *sul2* chiếm tỷ lệ cao (15/20 chủng, chiếm 75%), kể đến là gen *sul1* (7/20, chiếm 35%) và *sul3*

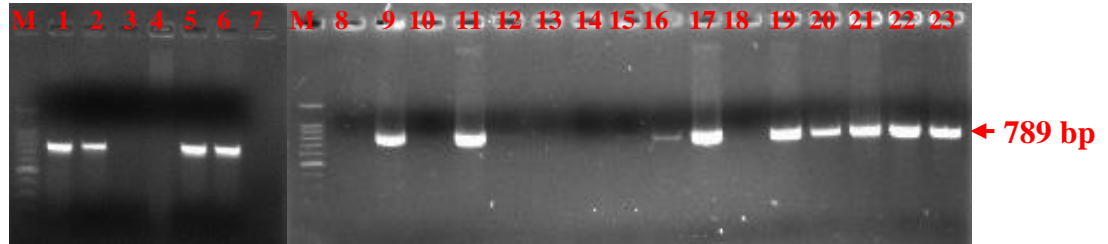
(1/20 chủng, chiếm 5%) ở vi khuẩn *E. coli* được phân lập từ phân trẻ con ở Bolivia và Peru.

Cho đến nay, gen *sul2* đã được tìm thấy trên nhiều loài vi khuẩn kháng sulfonamide trên thế giới và tỷ lệ xuất hiện của gen *sul2* thường thấp hơn gen *sul1*. Kết quả nghiên cứu của Adesoji *et al.* (2017) cho thấy gen *sul2* được xác định với tỷ lệ là 27,8% trong tổng số 162 chủng vi khuẩn kháng sulfamethoxazole thu thập từ các hệ thống phân phối nước uống ở Tây Nam Nigeria, trong khi chỉ có 21,16% vi khuẩn cho kết quả dương tính với gen *sul1*. Tương tự, nghiên cứu của Frank *et al.* (2007) đã xác định được gen *sul2* ở 72/78 chủng vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *Shigella* spp. và *Salmonella* spp.) gây bệnh cho người ở Pháp, trong khi gen *sul1* được tìm thấy ở 67/78 chủng. Trong khi đó, kể từ khi gen *sul3* lần đầu tiên được phát hiện trên plasmid tiếp hợp pVP440 (kích thước 54 kbp) ở vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên heo ở Thụy sĩ (Perreten and Patrick Boerlin, 2003) thì cho đến nay các báo cáo thông tin về sự hiện diện của gen này trên các loài vi khuẩn còn hạn chế. Grape *et al.* (2003) đã xác định gen *sul3* từ 2 chủng vi khuẩn *E. coli* kháng sulfonamide ở Thủy Điển. Guerra *et al.* (2004) lần đầu tiên đã phát hiện gen *sul3* ở vi khuẩn các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập từ các loài thú nuôi và các nguồn thực phẩm khác nhau ở Đức. Tương tự, Infante *et al.* (2005) lần đầu tiên phát hiện gen *sul3* của vi khuẩn *E. coli* ở Bolivia và Peru. Nghiên cứu của Arabi *et al.* (2015) cho thấy 3 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ các bệnh viện ở Iran mang gen *sul3*. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của Adesoji *et al.* (2017) cho thấy không có chủng vi khuẩn nào có gen *sul3* trong tổng số 162/168 chủng vi khuẩn có kiểu hình đa kháng thuốc kháng sulfamethoxazole từ các hệ thống phân phối nước uống ở Tây Nam Nigeria. Ngoài ra, qua kết quả từ Bảng 4.11&4.12 cũng cho thấy có 18 chủng vi khuẩn mang cả 2 gen *sul1* và *sul2*, trong đó vi khuẩn *E. ictaluri* có 7 chủng và *A. hydrophila* có 11 chủng. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với báo cáo của Hammerum *et al.* (2006), Frank *et al.* (2007), Kashif *et al.* (2013) và Adesoji *et al.* (2017) cho thấy sự hiện diện đồng thời của 2 gen *sul1* và *sul2* hoặc nhiều hơn 2 gen kháng sulfonamide trên 1 số loài vi khuẩn. Nghiên cứu không tìm thấy chủng vi khuẩn mang gen *sul1* và *sul3* cũng như chủng vi khuẩn mang cả 2 gen *sul2* và *sul3*.



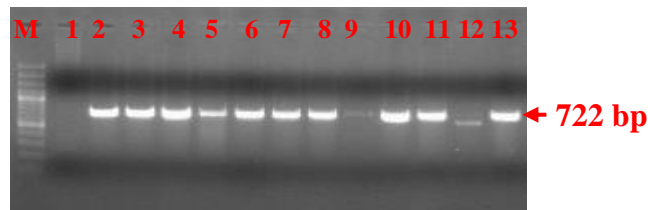
Hình 4.38: Gen *qacEΔ1* của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn 1 kbp; giếng 1: đối chứng âm; 2-16: thứ tự các chủng *A. hydrophila* và *E. ictaluri*: 2A3, 3A3, 6A3, 10A3, 11A3, 14A3, A7A3, 20A3, 23A3, 1ED3, 4ED3, 8ED3, 12ED3, 17ED3 và 20ED3.



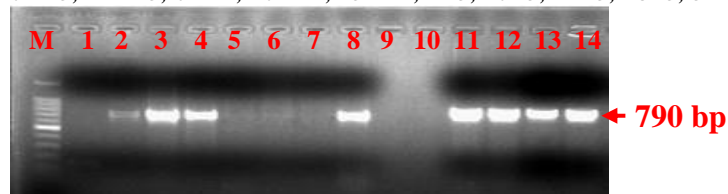
Hình 4.39: Gen *sulI* của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1, 2, 5 và 6: thứ tự các chủng *E. ictaluri* gồm: 1ED3, 4ED3, 8ED3 và 12ED3; giếng 9, 11, 16, 17, 19-23: thứ tự các chủng *A. hydrophila* gồm: 2A3, 3A3, 6A3, 10A3, 11A3, 14A3, 20A3, 23A3 và 28A3. Giếng 7&8: đối chứng âm; giếng 3, 4, 10, 12, 13, 14 và 15: mẫu âm tính.



Hình 4.40: Gen *sul2* của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1: đối chứng âm; giếng 2-13: thứ tự các chủng *A. hydrophila* và *E. ictaluri*: 8ED3, 12ED3, 20ED3, 21ED3, 6ED4, 10ED4, 15ED4, 2A3, 10A3, 11A3, 28A3, 31A3.



Hình 4.41: Gen *sul3* của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

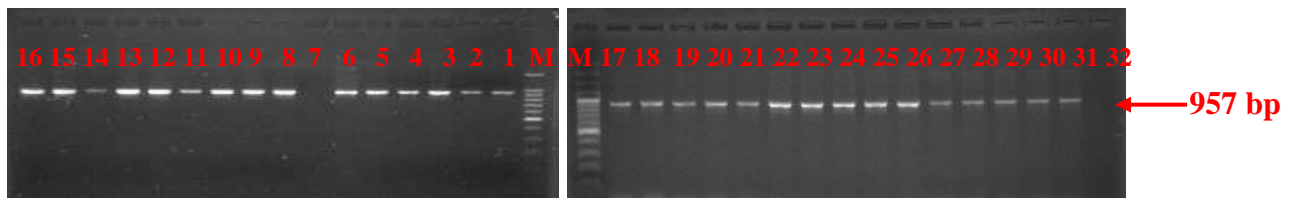
M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1: đối chứng âm; giếng 5, 6, 7, 9 và 10: mẫu âm tính; giếng 2-14: thứ tự các chủng *A. hydrophila* và *E. ictaluri*: 1A3, 7A3, 9A3, 33A4, 7ED3, 22ED3, 2ED4 và 29ED4.

## 4.6 Sự hiện diện của các gen kháng florfenicol và tetracycline ở 2 loài vi khuẩn

### 4.6.1 Sự hiện diện của các gen kháng tetracycline ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

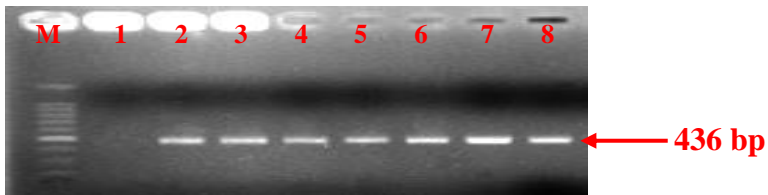
Kết quả điện di cho thấy các gen kháng tetracycline như *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetK* và *tetS* đã được phát hiện ở 2 loài vi khuẩn trên (Bảng 4.14). Trong số các gen *tet* được phát hiện thì gen *tetA* (Hình 4.42) chiếm tỷ lệ cao nhất (66/80

chúng, chiếm 82,5%, gồm 35/40 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và 31/40 chủng *E. ictaluri*); kể đến là các gen *tetG* (Hình 4.42) (27/80 chủng, chiếm 33,75%, gồm 14/40 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và 13/40 chủng *E. ictaluri*); gen *tetC* (Hình 4.41) (25/80 chủng, chiếm 31,25%, gồm 11/40 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và 14/40 chủng *E. ictaluri*); *tetK* (Hình 4.43) (7/80 chủng, chiếm 8,75%, gồm 4/40 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và 3/40 chủng *E. ictaluri*) và *tetB* (Hình 4.40) (7/80 chủng, chiếm 8,75%, gồm 5/40 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và 2/40 chủng *E. ictaluri*) và thấp nhất là *tetS* (Hình 4.44) (6/80 chủng, chiếm 7,5%, gồm 2/40 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và 4/40 chủng *E. ictaluri*). Như vậy, các gen *tetD*, *tetE*, *tetL*, *tetM*, *tetO* và *tet34* không được phát hiện ở các chủng *A. hydrophila* và *E. ictaluri* trong nghiên cứu này.



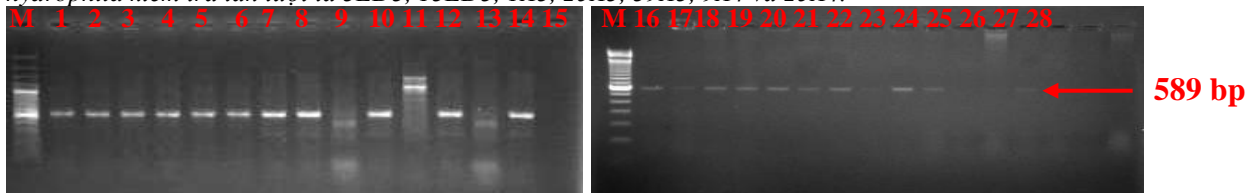
Hình 4.42: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen *tetA* ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn 100 bp plus và 100 bp; giếng 1-16 thứ tự các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kiểm tra: 1ED3, 2ED3, 3E3, 4ED3, 8E3, 10ED3, 11ED3, 13ED3, 17ED3, 20ED3, 21ED3, 22ED3, 24ED3, 25ED3 và 28DE3; giếng 17-31 thứ tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* kiểm tra: 1A3, 3A3, 6A3, 7A3, 10A3, 11A3, 14A3, 17A3, 19A3, 25A3, 28A3, 37A3, 38A3, 39A3 và 40A3; giếng 7: mẫu vi khuẩn âm tính với *tetA* (chủng 7E3) và giếng 32: đối chứng âm.



Hình 4.43: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen *tetB* ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*

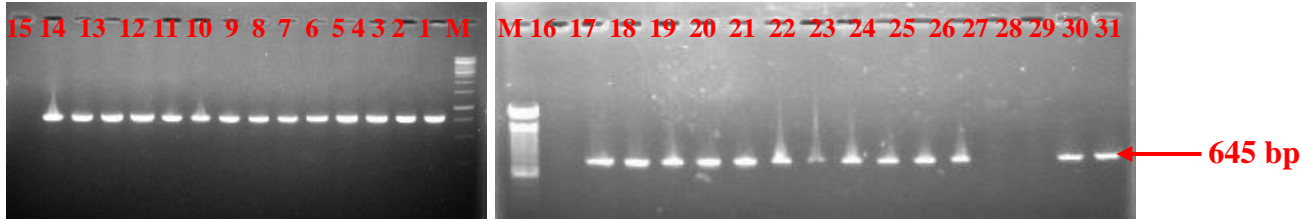
M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1: đối chứng âm; giếng 2-8 thứ tự các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* kiểm tra lần lượt là 3ED3, 13ED3, 1A3, 25A3, 39A3, 9A4 và 25A4.



Hình 4.44: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen *tetC* ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*

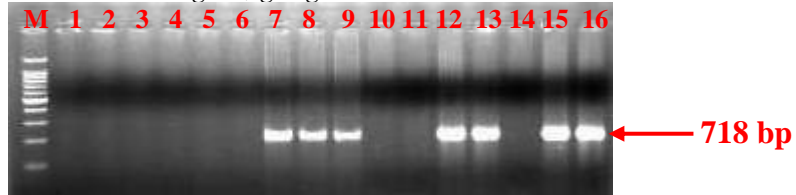
M: thang chuẩn 100 bp; giếng 1-14 thứ tự các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kiểm tra: 1ED3, 5ED3, 7ED3, 20ED3, 26ED3, 28ED3, 15ED4, 28ED4, 31ED4, 35ED4 và 37ED4; giếng 16-28 thứ tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* kiểm tra: 2A3, 4A3, 17A3, 25A3, 28A3, 38A3, 1A4, 10A4, 26A4, 32A4 và 33A4; giếng 9, 26 và 27: mẫu âm tính và giếng 15: mẫu đối chứng âm.





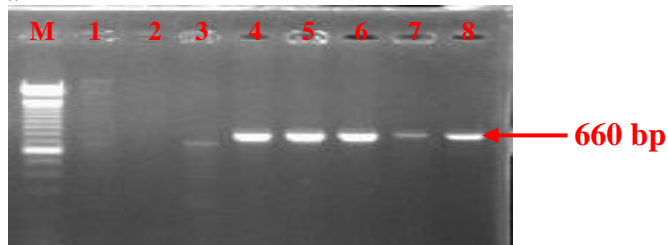
Hình 4.45: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen *tetG* ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn 100 bp; giếng 1-15 thứ tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* kiểm tra: 2A3, 4A3, 6A3, 17A3, 23A3, 28A3, 34A3, 39A3, 5A4, 18A4, 29A4, 31A4 và 33A4; giếng 16-31 thứ tự các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kiểm tra: 2ED3, 4ED3, 6ED3, 8ED3, 16ED3, 2ED4, 3ED4, 14ED4, 19ED4, 27ED4, 29ED4, 31E4 và 33ED4; giếng 15 và 16: đối chứng âm; giếng 28 và 29: mẫu âm tính.



Hình 4.46: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen *tetK* ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1: đối chứng âm; giếng 7, 8, 9, 12, 13, 15, và 16: thứ tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*: 3A3, 5A3, 17A4, 30A4, 25ED3, 28ED4 và 30ED4; giếng 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11 và 14: các mẫu âm tính.



Hình 4.47: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen *tetS* ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn 100 bp; giếng 1: đối chứng âm; giếng 3-8 thứ tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* lần lượt là 5A3, 22A4, 16ED3, 25ED3, 19ED4, 28ED4 và 30ED4; giếng 2: mẫu âm tính.

Đặc biệt, qua kết quả tổng hợp từ Bảng 4.14 cho thấy 1 số chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* có nhiều hơn 1 gen *tet* trong bộ gen của chúng, cụ thể đối với các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* thì có 7 chủng mang 2 gen *tetA-C*, 9 chủng mang 2 gen *tetA-G*, 2 chủng mang 2 gen *tetA-B*, 3 chủng mang 2 gen *tetG-S*, 2 chủng mang 2 gen *tetC-G*, 2 chủng mang 2 gen *tetK-S* và 1 chủng mang 3 gen *tetA-G-S* (Bảng 14). Đối với các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* thì các chủng mang gen như sau: 4 chủng mang 2 gen *tetA-B*, 8 chủng mang 2 gen *tetA-C*, 10 chủng mang 2 gen *tetA-G*, 4 chủng mang 2 gen *tetA-K*, 1 chủng mang 2 gen *tetA-S*, 1 chủng mang 2 gen *tetB-C*, 5 chủng mang 2 gen *tetC-G* và 3 chủng mang 3 gen *tetA-C-G* (Bảng 4.14).

Bảng 4.14: Sự hiện diện các gen kháng florfenicol và tetracycline ở các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	<i>Gen Int11</i>	<i>Gen floR</i>	<i>tet A</i>	<i>tet B</i>	<i>tet C</i>	<i>tet D</i>	<i>tet E</i>	<i>tet G</i>	<i>tet K</i>	<i>tet L</i>	<i>tet M</i>	<i>tet O</i>	<i>tet S</i>	<i>tet 34</i>
1	1ED3	CFL-CTX-CHL-FFC-ENR-DOX-TET-NEO-STR-SXT	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2ED3	AMO-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	3ED3	CTX-FFC-ENR-TET-STR-GEN-SXT	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	4ED3	AMO-AMP-CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	5ED3	CFL-CTX-CHL-FFC-ENR-DOX-TET-NEO-STR-SXT	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	6ED3	AMP-CFL-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	7ED3	CFL-CTX-CHL-FFC-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	8ED3	CFL-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-STR-SXT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	11ED3	FFC-STR-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	12ED3	CHL-FFC-TET-STR-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	13ED3	CHL-FFC-DOX-TET-STR-SXT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	16ED3	AMO-AMP-CTX-FFC-CIP-ENR-DOX-NEO-STR-GEN-SXT	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
13	17ED3	CFL-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	20ED3	AMP-CHL-FFC-ENR-NOR-TET-NEO-S-SXT	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	21ED3	AMP-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	22ED3	CHL-FFC-CIP-TET-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	24ED3	AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-STR-SXT	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	25ED3	AMO-AMP-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
19	26ED3	CFL-CHL-FFC-ENR-NOR-TET-STR-SXT	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	<i>Gen IntI1</i>	<i>Gen floR</i>	<i>tet A</i>	<i>tet B</i>	<i>tet C</i>	<i>tet D</i>	<i>tet E</i>	<i>tet G</i>	<i>tet K</i>	<i>tet L</i>	<i>tet M</i>	<i>tet O</i>	<i>tet S</i>	<i>tet 34</i>
20	28ED3	CHL-FFC-ENR-TET-STR-NEO-SXT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	30ED3	CTX-CHL-FFC-ENR-NOR-TET-STR-SXT	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	2ED4	AMP-CHL-FFC-TET-STR-GEN-SXT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
23	3ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
24	6ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	10ED4	CHL-FFC-ENR-TET-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	14ED4	CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-SXT	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
27	15ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	17ED4	AMP-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	19ED4	CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
30	25ED4	CHL-FFC-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	26ED4	CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-STR-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	27 ED4	AMP-CTX-CHL-FFC- CIP-ENR-NOR-TET-GEN-SXT	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
33	28 ED4	CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
34	29ED4	AMP-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
35	30 ED4	AMO-CFL-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
36	31 ED4	AMO-CTX-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-GEN-SXT	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
37	32ED4	CHL-FFC-CIP-TET-STR-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	33ED4	CHL-FFC-TET-NEO-STR-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
39	35ED4	CHL-FFC- ENR-NOR-DOX-TET-SXT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	37ED4	CHL-FFC-CIP-TET-STR-SXT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	1A3	AMP-AMO-CFL-CTX-CHL-FFC-TET-SXT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	2A3	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-SXT	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
43	3A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	<i>Gen IntI1</i>	<i>Gen floR</i>	<i>tet A</i>	<i>tet B</i>	<i>tet C</i>	<i>tet D</i>	<i>tet E</i>	<i>tet G</i>	<i>tet K</i>	<i>tet L</i>	<i>tet M</i>	<i>tet O</i>	<i>tet S</i>	<i>tet 34</i>
44	4A3	AMP-AML-CL-TE-CN-SXT	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
45	5A3	AMP-AML-CL-C-FFC-TE-CN-SXT	-	+	-	-	-	-	-		+	-	-	-	+	-
46	6A3	AMP-AMO-CFL- TET-NEO-SXT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
47	7A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-SXT	+	+	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
48	10A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC- TET-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
49	11A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	+	+	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
50	14A3	AMP-AMO-CFL- CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	17A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
52	19A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	20A3	AMP-AMO-CFL-CHL-TET-STR-SXT	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	23A3	AMP-AMO-CFL-CHL-TET-SXT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
55	25A3	AMP-AMO-CFL-FFC-SXT	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	28A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
57	31A3	AMP-AMO-CFL- TET-SXT	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	34A4	AMP-AMO-CFL-CHL-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-GEN-SXT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
59	37A4	AMP-AMO-CFL-FFC-ENR-DOX-TET-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	38A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-NOR-TET-SXT	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	39A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
62	40A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	1A4	AMP-AMO-CFL-TET-SXT	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	2A4	AMP-AMO-CFL-CTX-FFC-TET-NEO-STR-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	5A4	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-SXT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
66	9A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-NOR-TET-NEO-SXT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	10A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-SXT	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	13A4	AMP-AMP-CFL-TET-NEO-SXT	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TT	Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	<i>Gen IntI1</i>	<i>Gen floR</i>	<i>tet A</i>	<i>tet B</i>	<i>tet C</i>	<i>tet D</i>	<i>tet E</i>	<i>tet G</i>	<i>tet K</i>	<i>tet L</i>	<i>tet M</i>	<i>tet O</i>	<i>tet S</i>	<i>tet 34</i>
69	17A4	AMP-AMP-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
70	18A4	AMP-AMO-CFL-NEO-SXT	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
71	22A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
72	23A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	25A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-GEN-SXT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	26A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	28A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-STR-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	29A4	AMP-AMO-CFL-FFC-DOX-TET-NEO-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
77	30A4	AMP-AMO-CFL-CIP-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
78	31A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-GEN-SXT	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
79	32A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-NOR- TET-NEO-STR-GEN-SXT	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	33A4	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-STR-GEN-SXT	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Ngoài ra, để xác định lại tính chính xác của phản ứng PCR thì nghiên cứu chọn 1 số mẫu dương tính với các *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetK* và *tetS* từ 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* để giải trình tự (Phụ lục S7). Kết quả Blast trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy trình tự của các gen *tetA* (Phụ lục S7A) trong nghiên cứu tương đồng 98-99% với gen *tetA* gen của vi khuẩn *V. cholerae* V21 (NG 048155.1) và *P. aeruginosa* RP4 (NG 048148.1). Gen *tetB* (Phụ lục S7B) tương đồng 98-99% với gen *tetB* của vi khuẩn *Clostridium perfringens* (AY304476.1). Gen *tetC* (Phụ lục S7C) tương đồng 98-100% với gen *tetC* của vi khuẩn *Yersinia ruckeri* chủng Y9 (KY001929.1), *Chlamydia suis* R27 (NG048178.1), *A. salmonicida* pRAS3.2 (NG 048177.1), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium R46 (NG 048175.1) và vi khuẩn *Francisella tularensis* LVS pOM1 (NG 048174.1). Gen *tetG* (Phụ lục S7D) tương đồng 96-100% với gen *tetG* của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. plasmid pPSTG1 (AF133139.1), *Brevundimonas* sp. PB-P1-8 (DQ910312.1) và vi khuẩn *Ochrobactrum* sp. LM2-P1-53 (EF055280.1). Gen *tetK* (Phụ lục S7E) tương đồng 98-99% với gen *tetK* của vi khuẩn *S. aureus* pT181 (NG 048200.1), *Nocardia seriolae* (AB511891.1), *Mycobacterium fortuitum* (S74032.1), *Prevotella intermedia* chủng 345.2M (KX034800.1), *S. hominis* (KX098501.1), *S. xylosum* (KX098500.1), *S. epidermidis* (KX098499.1) và vi khuẩn *S. lugdunensis* (KX098498.1) và gen *tetS* (Phụ lục S7F) tương đồng 99-100% với gen *tetS* của vi khuẩn *Lactococcus garvieae* pKL0018 (NG 048277.1), *Streptococcus thermophilus* E2 (NG 048276.1), *Streptococcus intermedius* (NG 048275.1), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K214 pK214 (NG 048274.1), *Listeria monocytogenes* (NG 048273.1) và vi khuẩn *Enterococcus faecalis* chủng WBH16 (JN980097.1).

TET thuộc nhóm kháng sinh phổ rộng, được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực thú y và NTTS ở nhiều nước trên thế giới, bao gồm Việt Nam để kiểm soát các nguồn bệnh do vi khuẩn (Smith *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2003). Do đó, nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn đã kháng với nhiều loại kháng sinh nhóm này (Boerlin *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2008; Van *et al.*, 2007, 2008). Nhiều gen *tet* mã hóa cho các loại protein tham gia vào các cơ chế đề kháng tetracycline của vi khuẩn đã được xác định. Hiện tại, có hơn 40 gen kháng TET đã được xác định và giải trình tự (Chopra *et al.*, 2001; Roberts, 2005; Brown *et al.*, 2008). Tuy nhiên, 3 trong số các gen kháng TET thường gặp nhất là *tetA*, *tetB* và *tetC* (Roberts, 2005).

Ở vi khuẩn *E. ictaluri*, các thông tin về gen kháng TET của vi khuẩn này trên thế giới và ở Việt Nam còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, các gen *tetA*,

*tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetK* và *tetS* đã được phát hiện ở 2 loài vi khuẩn trên (Bảng 4.14). Trong số các gen *tet* được phát hiện thì *tetA* chiếm tỷ lệ cao nhất (82,5%). Sự hiện diện của gen *tetA* mã hóa cho cơ chế bơm đẩy trong cơ chế kháng TET của vi khuẩn đã được nhiều tác giả báo cáo (Miranda *et al.*, 2003; Dang *et al.*, 2007; Balassiano *et al.*, 2007; Agerse and Sandvang, 2005; Chenia and Vietze, 2012). Nghiên cứu của Dung *et al.* (2009) cũng chỉ phát hiện được gen *tetA* trong số 8 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kháng tetracycline phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ ở ĐBSCL. Đặc biệt, gen *tetA* trong nghiên cứu trên là gen nằm trên plasmid không tương hợp nhóm K (*incK*). Ở Úc, nghiên cứu của Akinbowale *et al.* (2007) cho thấy vi khuẩn *E. tarda* cũng có mang các gen *tetA* và *tetM*. Trong khi đó, nghiên cứu của Jun *et al.* (2004) cho thấy ngoài *tetB* và *tetG* thì *tetA* và *tetD* là 2 kiểu gen xuất hiện nhiều nhất ở vi khuẩn *E. tarda* phân lập từ các trại nuôi cá ở Hàn Quốc với tỷ lệ lần lượt là 55% và 45% và đây là 2 *tet* luôn luôn hiện diện trên các plasmid di động (mobile plasmid). Tương tự với nghiên cứu này, Sun *et al.* (2009) cũng phát hiện *tetA* ở vi khuẩn *E. tarda* nằm trên plasmid tiếp hợp (conjugative plasmid) và chúng có thể truyền sang vi khuẩn *Pseudomonas sp.* và *E. coli*.

Theo Boerlin *et al.* (2005) thì đa số các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ heo tiêu chảy tại Canada có mang các gen kháng tetracycline với tỷ lệ như sau *tetA* (89%), *tetB* (12%) và *tetC* (1%). Ngoài ra, các gen *tetA*, *tetB* và *tetC* cũng được tìm thấy ở các chủng vi khuẩn *E. coli* được phân lập từ các nguồn khác như chó, mèo (Costa *et al.*, 2008) và trên cá (Van *et al.*, 2008). Tuy nhiên, gen *tetA* trên vi khuẩn *Aeromonas* trong NTTS còn ít công trình nghiên cứu (Jacobs and Chenia, 2007; Akinbowale *et al.*, 2007), đặc biệt là trên cá tra nuôi ở Việt Nam. Ở Mỹ, nghiên cứu của DePaola *et al.* (1988) cho thấy 35% vi khuẩn *A. hydrophila* kháng oxytetracycline mang *tetA*. Tương tự nghiên cứu này, nghiên cứu của Akinbowale *et al.* (2007) ở Úc cũng cho thấy các vi khuẩn *Aeromonas sp.*, *A. hydrophila*, *A. veronii* spp. *sobria* và *A. hydrophila* spp. *dhakensis* cũng mang gen *tetA*. Trên cá hồi ở Đan Mạch, các vi khuẩn thuộc giống *Aeromonas* được phân lập cũng có sự hiện diện của gen *tetA* hoặc gen *tetE* (Schmidt *et al.*, 2001a).

Trong nghiên cứu này, kết quả khảo sát bước đầu cho thấy các gen *tet* như *tetD*, *tetE*, *tetL*, *tetM*, *tetO* và *tet34* không được phát hiện ở các chủng *A. hydrophila* và *E. ictaluri* kháng TET được kiểm tra. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy sự đa dạng và phong phú của các gen này trên nhiều loài vi khuẩn trong tự nhiên (Aarestrup *et al.*, 2000; Chee-Sanford *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2001a; Jun *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2007; Chenia and Vietze, 2012; Ryu *et al.*, 2012).

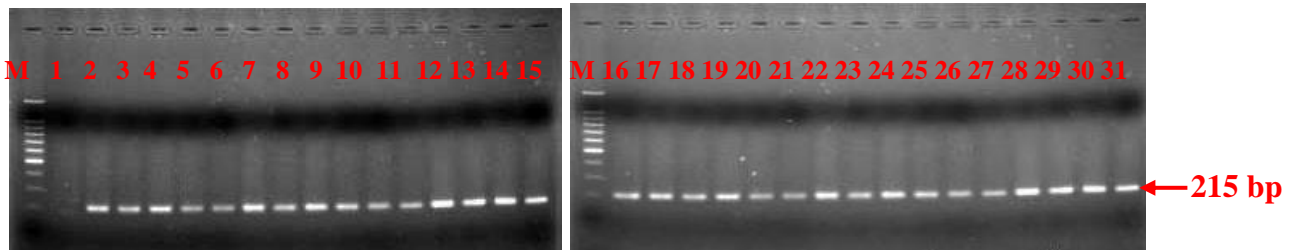


Nghiên cứu của DePaola *et al.* (1988) đã xác định gen *tetD* hoặc *tetE* từ các loài vi khuẩn Gram âm trên cá da trơn kháng với TET. Theo Furushita *et al.* (2003) và Nawaz *et al.* (2006, 2008) thì phần lớn các vi khuẩn kháng TET phân lập từ cá thu (tuna) và cá da trơn chứa gen *tetB*. Các gen *tetB*, *tetD*, *tetE* hoặc *tetM* còn được tìm thấy trên vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ nước nuôi hải sản ở Trung Quốc (Dang *et al.*, 2009). Tương tự, nghiên cứu của Nawaz *et al.* (2012) cho thấy vi khuẩn *Klebsiella* spp. phân lập từ tôm nhập khẩu của Thái Lan mang nhiều gen *tetB* (92%) hơn so với gen *tetD* (43%). Nghiên cứu sự đa dạng của các gen kháng tetracycline trên vi khuẩn từ các nguồn NTTS ở Úc của Akinbowale *et al.* (2007) cho thấy gen *tetM* hiện diện phổ biến nhất (50%), kế đến là các gen *tetE*, *tetA* và *tetD* với tỷ lệ xuất hiện lần lượt là 45%, 35% và 15%.

#### **4.6.2 Sự hiện diện của các gen kháng florfenicol ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

Sự hiện diện của các gen kháng florfenicol (*floR* gene) ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* cũng được xác định bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu được trình bày ở Bảng 3.3. Kết quả điện di cho thấy 100% (29/29) chủng vi khuẩn *A. hydrophila* có kiểu hình kháng florfenicol cho phản ứng dương tính với gen *floR* khi xuất hiện vạch ADN ở kích thước là 215 bp (Hình 4.48). Trong khi đó, các chủng vi khuẩn nhạy với florfenicol (11/40 chủng, chiếm 27,50%) thì không phát hiện sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose. Đối với các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* thì qua kết quả PCR cho thấy tỷ lệ vi khuẩn có sự hiện diện các gen *floR* (Hình 4.48) cao hơn vi khuẩn *A. hydrophila* với 35/40 chủng dương tính (chiếm tỷ lệ 87,5%). Theo Singer *et al.* (2004) thì có mối tương quan giữa kiểu hình và kiểu gen kháng florfenicol ở vi khuẩn *E. coli*. Tuy nhiên, kết quả của nghiên cứu này cho thấy có 5/40 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kháng với florfenicol nhưng cho kết quả âm tính với gen *floR* trong phản ứng PCR. Kết quả này có thể giải thích là ngoài gen *floR* đã biết thì có thể ở các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này mang gen kháng florfenicol khác. Cho đến nay, ngoài gen *floR* thì 2 gen kháng florfenicol khác là *cfr* và *fexA* đã được phát hiện ở vi khuẩn *Staphylococcus lentus* và *S. sciuri* (Schwarz *et al.*, 2000; Kehrenberg and Schwarz, 2004). Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần thực hiện để làm sáng tỏ vấn đề này. Tương tự, các chủng *E. ictaluri* nhạy với florfenicol thì gen *floR* không được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Ngoài ra, để xác định lại tính chính xác của phản ứng PCR thì nghiên cứu chọn 2 mẫu dương tính với gen *floR* từ vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* để giải trình tự (Phụ lục S8). Kết quả Blast trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy trình tự của các gen *floR* trong nghiên cứu tương đồng 98-

99% với gen *floR* của vi khuẩn *E. coli* AR060302 (NG 047878.1), *Pasteurella multocida* pCCK1900 (NG 047873.1), *K. pneumoniae* R55 (NG 047865.1), *V. cholerae* MO10 (NG 047864.1), *Bordetella bronchiseptica* (NG 047873.1) và *Bibersteinia trehalosi* pCCK13698 (NG 047871.1).



Hình 4.48: Phổ điện di sản phẩm PCR của gen kháng florfenicol ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

*M*: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1-15: thứ tự các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*: 1ED3, 3ED3, 4ED3, 5ED3, 6ED3, 7ED3, 12ED3, 13ED3, 16ED3, 17ED3, 22ED3, 24ED3, 25ED3, 26ED3, 28ED3 và 30ED3. Giếng 16-31: thứ tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila*: 1A3, 3A3, 5A3, 7A3, 10A3, 11A3, 14A3, 17A3, 19A3, 25A3, 28A3, 37A3, 38A3, 39A3 và 40A3.

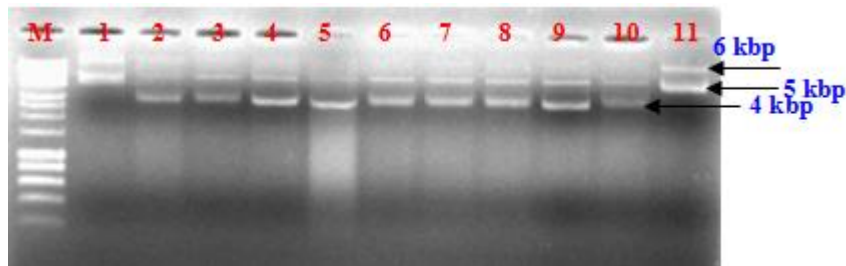
Cho đến nay, gen *floR* ít được nghiên cứu trong NTTS và trên các môi trường tự nhiên (Dang *et al.*, 2007). Hiện tại, hầu hết các nghiên cứu về gen *floR* đều tập trung vào vi khuẩn *E. coli* và 1 số vi khuẩn khác (Kim and Aoki, 1996; Briggs and Fratamico, 1999; Bolton *et al.*, 1999; Keyes *et al.*, 2000; Doublet *et al.*, 2005; Blickwede and Schwarz, 2004; Kuo *et al.*, 2009; Kadlec *et al.*, 2008; Fernández-Alarcón *et al.* (2010). Lần đầu tiên trong nghiên cứu này, gen *floR* được tìm thấy ở vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* gây bệnh trên cá tra ở ĐBSCL. Tuy nhiên, sự hiện diện của gen *floR* ở *A. hydrophila* thấp hơn vi khuẩn *E. ictaluri* (Bảng 4.14). Nghiên cứu gần đây của Dang *et al.* (2007) trên vi khuẩn thuộc các loài *Vibrio* và *Pseudoalteromonas* kháng oxytetracycline từ môi trường nuôi hải sản ở Trung Quốc, tác giả đã tìm thấy sự hiện diện của các gen *floR* ở 1 số chủng của 2 loài vi khuẩn này. Nghiên cứu của Gordon *et al.* (2008) cũng tìm thấy gen *floR* ở vi khuẩn *A. bestiarum* và gen này liên kết với các gen kháng TET. Một nghiên cứu khác gần đây của Fernández-Alarcón *et al.* (2010) cũng phát hiện gen *floR* từ nhiều loài vi khuẩn hình que, Gram âm khác nhau phân lập từ các trại nuôi cá hồi nước ngọt ở Chile. Nghiên cứu của Türe and Alp (2016) cũng đã xác định gen *floR* ở vi khuẩn *Vibrio fluvialis* và *Lactococcus garvieae* gây bệnh trên cá hồi ở Thổ Nhĩ Kỳ.

#### 4.7 Sự hiện diện của các plasmid ở vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

##### 4.7.1 Sự hiện diện của các plasmid ở vi khuẩn *E. ictaluri*

24 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* dương tính với các integron nhóm 1 cũng được khảo sát sự hiện diện của các plasmid. Kết quả điện di cho thấy 20/24 chủng

(chiếm 83,33%) trong tế bào của chúng đều có 2 plasmid với kích thước khoảng 4 kbp và 5 kbp (Hình 4.49) và chỉ có 4/24 (chiếm 16,67%) chủng trong tế bào của chúng cũng có 2 plasmid nhưng với kích thước lớn hơn, khoảng 5 kbp và 6 kbp (Hình 4.49). Số lượng và kích thước của các plasmid ở các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được trình bày chi tiết ở Bảng 4.15.



Hình 4.49: Kết quả điện di plasmid các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*.

M: thang chuẩn HyperLadder™ 1kb; giếng 1-11: thứ tự các chủng *E. ictaluri* là 1ED3, 4ED3, 7ED3, 8ED3, 11ED3, 12ED3, 13ED3, 17ED3, 20ED3, 21ED3 và 22ED3.

Nghiên cứu plasmid của vi khuẩn *E. ictaluri* đã được 1 số tác giả đề cập trước đây (Speyerer and Boyle, 1987; Newton *et al.*, 1988; Reid and Boyle, 1989; Lobb *et al.*, 1993; Bartie *et al.*, 2012). Nhìn chung, hầu hết các báo cáo cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* thường có plasmid có kích thước nhỏ hơn 10 kbp (Abbott and Janda, 2006). Kết quả khảo sát các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* trong nghiên cứu này cũng cho thấy kích thước plasmid vi khuẩn dao động từ 4-6 kbp và đa số các chủng phân lập có 2 plasmid trong tế bào của chúng (Lobb and Rhoades, 1987; Fernandez *et al.*, 2001). Nghiên cứu của Hawke *et al.* (2013) cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá ngựa vằn (*Danio rerio*) 3,5 và 4,0 kbp (6 chủng) và 4,0-4,5 kbp (7 chủng). Tương tự, kết quả nghiên cứu của Suanyuk *et al.* (2014) cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ loài cá lai giữa loài *Clarias macrocephalus* (Gunther) và *Clarias gariepinus* (Burchell) cũng có 2 plasmid với kích thước là 4,0 kbp và 5,6 kbp trong tế bào của chúng.

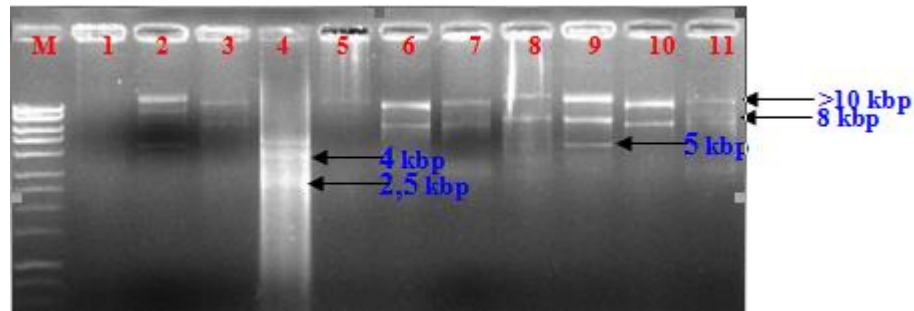
#### 4.7.2 Sự hiện diện của các plasmid ở vi khuẩn *A. hydrophila*

Tương tự, kết quả điện di plasmid của 38 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* dương tính với các integron nhóm 1 cho thấy đa phần các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* được kiểm tra có 2 plasmid trong tế bào của chúng (20/38 chủng, chiếm 52,63%) (Bảng 4.16 và Hình 4.50), kể đến là các chủng có 3 plasmid trong tế bào (8/38 chủng, chiếm 21,05%), có 6/38 chủng (chiếm 15,79%) có 1 plasmid và 4/38 chủng (chiếm 10,53%) có 4 plasmid trong tế bào (Bảng 4.16 và Hình 4.50). Ngoài ra, qua Hình 4.50 cho thấy hầu hết các chủng *A. hydrophila* trong nghiên cứu đều có plasmid với kích thước lớn hơn 10 kbp. Tuy nhiên, cũng có 1 số chủng vi khuẩn như 3A3, 23A3, 10A4, 18A4, 25A4 có kích thước rất nhỏ với

trọng lượng khoảng 2,5 kbp và 4 kbp (Hình 4.50). Số lượng và kích thước của các plasmid ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* được trình bày chi tiết ở Bảng 4.16.

Bảng 4.15: Số lượng và kích thước plasmid ở các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*

Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	Số lượng	~4 kbp	~5 kbp	~6 kbp
1ED3	CFL-CTX-CHL-FFC-ENR-DOX-TET-NEO-STR-SXT	2		X	X
4ED3	AMO-AMP-CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	2	X	X	
7ED3	CFL-CTX-CHL-FFC-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	2	X	X	
8ED3	CFL-CHL-FFC-ENR- TET-NEO-STR-SXT	2	X	X	
11ED3	FFC-STR-SXT	2	X	X	
12ED3	CHL-FFC-TET-STR-NEO-SXT	2	X	X	
13ED3	CHL-FFC-DOX-TET-STR-SXT	2	X	X	
17ED3	CFL-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	X	X	
20ED3	AMP-CHL-FFC- ENR-NOR- TET-NEO-S-SXT	2	X	X	
21ED3	AMP-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-GEN-SXT	2	X	X	
22ED3	CHL-FFC-CIP-TET-SXT	2		X	X
2ED4	AMP-CHL-FFC-TET-STR-GEN-SXT	2	X	X	
3ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	2	X	X	
6ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	2	X	X	
10ED4	CHL-FFC-ENR-TET-SXT	2	X	X	
15ED4	CHL-FFC-TET-STR-SXT	2	X	X	
17ED4	AMP-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-STR-SXT	2	X	X	
19ED4	CFL-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	2	X	X	
25ED4	CHL-FFC-ENR-NOR-TET-STR-GEN-SXT	2	X	X	
26ED4	CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-STR-SXT	2	X	X	
29ED4	AMP-CTX-CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-TET-NEO-GEN-SXT	2		X	X
32ED4	CHL-FFC-CIP-TET-STR-GEN-SXT	2		X	X
33ED4	CHL-FFC-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2	X	X	
35ED4	CHL-FFC- ENR-NOR-DOX-TET-SXT	2	X	X	



Hình 4.50: Kết quả điện di plasmid các chủng vi khuẩn *A. hydrophila*.

M: thang chuẩn HyperLadder™ 1kb; giếng 2-11: thứ tự các chủng *A. hydrophila* là 1A3, 2A3, 3A3, 6A3, 7A3, 10A3, 11A3, 14A3, 17A3 và 19A3; giếng 1: đối chứng âm.

Như vậy, qua các kết quả trên cho thấy kích thước plasmid của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu trước đây của nhiều tác giả (Shome *et al.*, 2001; Majumdar *et al.*, 2007; Younes *et al.*, 2015). Tuy nhiên, kích thước plasmid của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu này thì nhỏ hơn so với kích thước của các plasmid đã được báo cáo trước đây. Majumdar *et al.* (2006) đã phân lập các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* từ cá trê (*Clarias batrachus*) ở Ấn Độ bị hội chứng lở loét (ulcerative disease syndrome, UDS) có plasmid trong tế bào với kích thước là 21 kbp. Ngoài ra, chủng *A. hydrophila* 646 cũng mang 2 plasmid có kính thước nhỏ là 1,5 và 1,9 kbp. Kết quả phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* từ các mẫu nước của Abulhamd (2009) cho thấy vi khuẩn có plasmid lớn hơn với kích thước dao động từ 1,5 kbp đến 16,0 kbp. Tương tự, nghiên cứu của Das *et al.* (2009) cho thấy các chủng vi khuẩn *Aeromonas* phân lập từ cá Katla (*Catla catla*), Mrigel (*Cirrhinus mrigala*) and Punti (*Puntius sp.*) bị bệnh lở loét (epizootic ulcerative syndrome, EUS) ở Ấn Độ có plasmid dao động từ 23 đến 64 kbp, trong đó phổ biến là các plasmid có kích thước 23 kbp. Nghiên cứu của Zaky *et al.* (2010) cho thấy hầu hết các chủng *A. hydrophila* phân lập ở Ai Cập có kích thước nhỏ hơn 2,2-4,0 kbp. Tương tự, nghiên cứu của Ngoci *et al.* (2012) cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* đa kháng thuốc phân lập ở Kenya có kích thước là 21 kbp. Nghiên cứu của Tipmongkolsilp *et al.* (2012) đã phát hiện plasmid pR148 đa kháng thuốc từ cá rô phi *O. niloticus* ở Thái Lan có kích thước rất lớn (165 kbp). Báo cáo của Younes *et al.* (2015) cho thấy các chủng *A. hydrophila* phân lập từ cá rô phi *O. niloticus* có 3 plasmid với kích thước là 2,7 kbp, 5,8 kbp và 14 kbp.

Bảng 4.16: Số lượng và kích thước plasmid ở các chủng vi khuẩn *A. hydrophila*

Chủng vi khuẩn	Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn	Số lượng	2-4 kbp	5-8 kbp	>10 kbp
1A3	AMP-AMO-CFL-CTX-CHL-FFC-TET-SXT	3		X	X
2A3	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-SXT	2		X	X
3A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	3	X	X	
6A3	AMP-AMO-CFL- TET-NEO-SXT	1			X
7A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-SXT	2		X	X
10A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC- TET-NEO-SXT	2		X	X
11A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	3		X	X
14A3	AMP-AMO-CFL- CHL-FFC-CIP-ENR-NOR-DOX-TET-NEO-GEN-SXT	3		X	X
17A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	2		X	X
19A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	2		X	X
20A3	AMP-AMO-CFL-CHL-TET-STR-SXT	1			X
23A3	AMP-AMO-CFL-CHL-TET-SXT	4	X	X	X
25A3	AMP-AMO-CFL-FFC-SXT	3		X	X
28A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	2		X	
31A3	AMP-AMO-CFL- TET-SXT	2		X	
34A3	AMP-AMO-CFL-CHL- CIP-ENR-NOR-TET-NEO-GEN-SXT	2		X	X
37A3	AMP-AMO-CFL-FFC-ENR-DOX-TET-SXT	2		X	X
38A3	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-NOR-TET-SXT	2		X	X
39A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	2		X	X
40A3	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-SXT	2		X	X
1A4	AMP-AMO-CFL-TET-SXT	2		X	X
2A4	AMP-AMO-CFL-CTX-FFC-TET-NEO-STR-GEN-SXT	3		X	X
5A4	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-SXT	2		X	X
9A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-NOR-TET-NEO-SXT	2		X	X
10A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-ENR-TET-NEO-SXT	4	X	X	X
13A4	AMP-AMP-CFL-TET-NEO-SXT	2		X	X
17A4	AMP-AMP-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	3		X	X
18A4	AMP-AMO-CFL-NEO-SXT	4	X	X	X
22A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-SXT	1			X
23A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	1		X	
25A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-GEN-SXT	4	X	X	X
26A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-SXT	1		X	
28A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-TET-NEO-STR-NEO-SXT	1		X	
29A4	AMP-AMO-CFL-FFC-DOX-TET-NEO-SXT	2		X	X
30A4	AMP-AMO-CFL-CIP-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2		X	X
31A4	AMP-AMO-CFL-FFC-TET-NEO-GEN-SXT	3		X	X
32A4	AMP-AMO-CFL-CHL-FFC-NOR-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2		X	X
33A4	AMP-AMO-CFL-TET-NEO-STR-GEN-SXT	2		X	X

#### 4.8 Kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng tiếp hợp và trao đổi gen kháng thuốc của các vi khuẩn

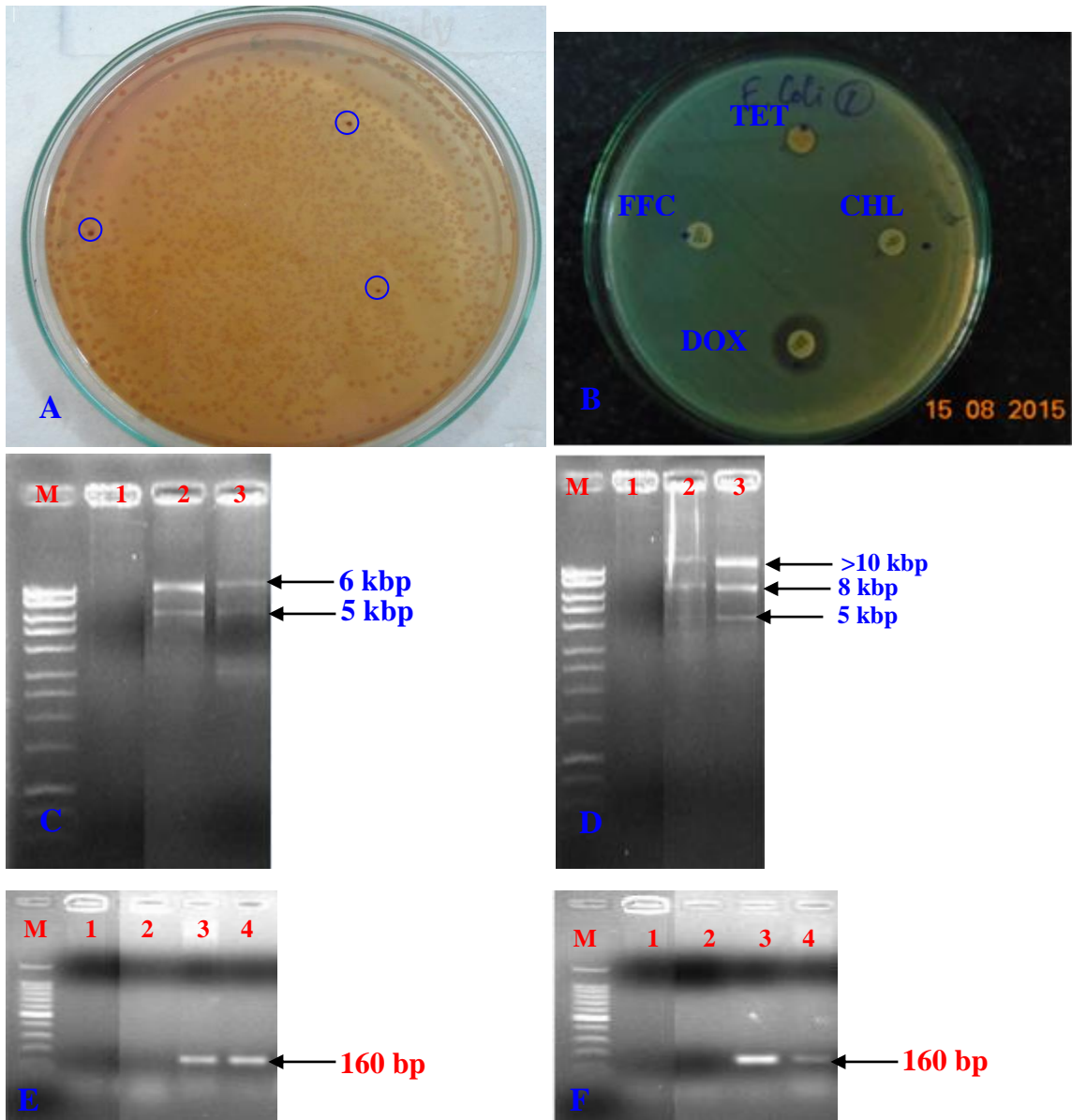
Kết quả thí nghiệm cho thấy 2 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* được chọn khảo sát có khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc sang vi khuẩn *E. coli* (Hình 4.51A). Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ 2 chủng *E. coli* nhận gen kháng thuốc sau khi tiếp hợp cho thấy 2 chủng này kháng với các kháng sinh từ vi khuẩn cho gen kháng thuốc (Bảng 4.17). Ngoài ra, 2 chủng vi khuẩn nhận gen kháng thuốc sau khi tiếp hợp được kiểm tra sự hiện diện của các plasmid và integron nhóm 1. Kết quả cho thấy vi khuẩn cho kết quả dương tính với integron nhóm 1 (Hình 4.51E&F) và xuất hiện các plasmid từ vi khuẩn cho gen kháng thuốc (Hình 4.51C&D).

Trong khi đó, kết quả thí nghiệm tiếp hợp giữa các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* cho thấy giữa các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* không có khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc cho nhau. Các chủng nhận gen kháng thuốc sau khi tiếp hợp không thể phát triển trên môi trường chọn lọc (có bổ sung kháng sinh TET) mà chỉ có vi khuẩn cho gen kháng thuốc phát triển. Ngoài ra, kết quả PCR kiểm tra các gen *tet* thì vi khuẩn nhận gen kháng thuốc cũng cho kết quả âm tính. Nghiên cứu của Bello-López *et al.* (2012) cho thấy có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tiếp hợp như giữa tế bào cho và nhận không nhận biết nhau (cell recognition), sự không tương hợp giữa chúng (incompatibility), hiện tượng loại trừ bề mặt (surface exclusion) và quá trình cắt giới hạn giới của ADN đến xảy ra trong tế bào nhận (restriction of incoming DNA). Do đó các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện hiện để làm sáng tỏ vấn đề này.

Theo Nikaido (2009) thì các plasmid được xem là nhân tố quan trọng dẫn đến hiện tượng đa kháng thuốc ở vi khuẩn do chúng mang các gen mã hóa cho việc kháng lại nhiều loại kháng sinh như  $\beta$ -lactam, macrolide, aminoglycoside, TET, SXT và phenicol. Hiện tượng kháng thuốc thông qua plasmid (plasmid-mediated antibiotic resistance) lần đầu tiên được phát hiện trên vi khuẩn *A. salmonicida* (Aoki *et al.*, 1971a) và vi khuẩn *A. liquefaciens* (hiện tại được phân loại lại là loài *A. hydrophila* (Aoki *et al.*, 1971b) gây bệnh trên cá. Nhiều nghiên cứu sau đó cũng đã phát hiện hiện tượng này ở nhiều loài vi khuẩn gây bệnh khác như vi khuẩn *E. tarda* (Aoki and Kitao, 1981), vi khuẩn *V. anguillarum* (Aoki *et al.*, 1987), vi khuẩn *Salmonella enterica* (Carattoli, 2003), vi khuẩn *E. coli* và *Klebsiella pneumoniae* (Lina *et al.*, 2007) và vi khuẩn *Shigella sonnei* (Chang *et al.*, 2011). Nghiên cứu của Saitanu *et al.* (1994) đã phát hiện các R-plasmid của vi



khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ 1 loài cá ở Thái Lan đã kháng lại kháng sinh CHL, sulfamonomethoxine và TET. Gần đây, nghiên cứu của Tipmongkolsilp *et al.* (2012) cũng đã tìm thấy R-plasmid đa kháng AMP, CHL, SXT và TET của vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập trên cá rô phi ở Thái Lan.



Hình 4.51: Kết quả tiếp hợp giữa vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* với vi khuẩn *E. coli*.

A. Kết quả tiếp hợp giữa vi khuẩn *A. hydrophila* (chủng 1A3) và vi khuẩn *E. coli* (chủng ECR2) trên môi trường MacConkey có kháng sinh chọn lọc. B. Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ của chủng vi khuẩn *E. coli* nhận gen kháng thuốc (transconjugant) sau khi tiếp hợp. C. Kết quả kiểm tra plasmid chủng cho (chủng 1ED3 ở giếng 2) và chủng nhận *E. coli* ECR2 sau khi tiếp hợp (giếng 3); giếng 1: chủng *E. coli* ECR2 trước khi tiếp hợp. D. Kết quả kiểm tra plasmid chủng cho (chủng 1A3 ở giếng 2) và chủng nhận *E. coli* ECR2 sau khi tiếp hợp (giếng 3); giếng 1: chủng *E. coli* ECR2 trước khi tiếp hợp. E&F. Kết quả kiểm tra sự hiện diện của các integron nhóm 1 của chủng vi khuẩn *E. coli* ECR2 nhận gen kháng thuốc sau khi tiếp hợp.

Bảng 4.17: Kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn nhận gen kháng thuốc sau khi tiếp hợp

Chủng cho	Kiểu hình kháng thuốc chủng cho	Kiểu hình kháng thuốc chủng nhận	Kiểu hình kháng thuốc chủng nhận sau khi tiếp hợp
1ED3	CFL, CTX, CHL, FFC, ENR, DOX,	ECR2: nhạy với 15 loại.	CFL, CTX, CHL, FFC, ENR, DOX, TET, NEO, STR, SXT
1ED3	TET, NEO, STR, SXT	ECR8: nhạy với 15 loại.	CFL, CTX, CHL, FFC, ENR, DOX, TET, NEO, STR, SXT
2ED4	AMP, CHL, FFC, TET, STR, NEO,	ECR2: nhạy với 15 loại.	AMP, CHL, FFC, TET, STR, NEO, SXT
2ED4	SXT	ECR8: nhạy với 15 loại.	AMP, CHL, FFC, TET, STR, NEO, SXT
1A3	AMP, AMO, CFL, CTX, CHL, FFC,	ECR2: nhạy với 15 loại.	AMP, AMO, CFL, CTX, CHL, FFC, TET, SXT
1A3	TET, SXT	ECR8: nhạy với 15 loại.	AMP, AMO, CFL, CTX, CHL, FFC, TET, SXT
1A4	AMP, AMO, CFL, TET, SXT	ECR2: nhạy với 15 loại.	AMP, AMO, CFL, TET, SXT
1A4		ECR8: nhạy với 15 loại.	AMP, AMO, CFL, TET, SXT

Trong khi đó, hiện tượng kháng thuốc qua plasmid ở vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ được phát hiện lần đầu tiên vào đầu những năm 1990 (Starliper *et al.*, 1993). Plasmid này có kích thước khoảng 55 kbp và mang gen kháng kháng sinh TET, OXY, STR, trimethoprim và SXT. Gần đây, 1 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* kháng FFC phân lập từ cá nheo Mỹ mang plasmid IncA/C (không tương hợp) với kích thước khoảng 150 kbp (Welch *et al.*, 2009). Ngoài ra, plasmid IncA/C còn được xác định ở vi khuẩn *A. hydrophila* (Aoki *et al.*, 1971b; Fricke *et al.*, 2009). Ở Việt Nam, lần đầu tiên phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá tra có plasmid IncK (kích thước khoảng 140 kbp) chứa gen kháng TET, STR, trimethoprim và sulfonamide (Dung *et al.*, 2009). Trong khi đó, cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về hiện tượng kháng thuốc qua plasmid ở vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh XH trên cá tra ở Việt Nam được công bố. Đặc biệt, tình trạng kháng thuốc sẽ trở nên nghiêm trọng khi giữa các vi khuẩn cùng loài và khác loài trong môi trường có khả năng tiếp hợp, trao đổi gen kháng thuốc qua các yếu tố di truyền vận động như plasmid và integron (Kruse *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 2014). Nhiều nghiên cứu đã xác định có sự trao đổi plasmid kháng thuốc kháng sinh trên 1 số loài vi khuẩn gây bệnh trên cá ở cả môi trường nước biển và nước ngọt như *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila* và *E. tarda* (Aoki and Takahashi, 1987; Depaola *et al.*, 1988). Kết quả tiếp hợp trong nghiên cứu này cũng cho thấy 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* có thể truyền gen kháng thuốc của chúng cho vi

khuẩn *E. coli* qua các plasmid và integron. Kết quả nghiên cứu của Das *et al.* (2009) cho thấy các plamid từ 11 chủng vi khuẩn *Aeromonas* phân lập từ cá Katla (*Catla catla*), Mrigel (*Cirrhinus mrigala*) và Punti (*Puntius* sp.) bị bệnh lở loét (epizootic ulcerative syndrome, EUS) ở Ấn Độ đã truyền các gen kháng thuốc ampicillin, erythromycin và chloramphenicol sang vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## Chương V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 5.1 Kết luận

Đề tài đã phân lập và định danh được 67 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và 74 chủng *A. hydrophila* từ các mẫu cá tra bệnh gan thận mũ và xuất huyết ở ĐBSCL tra dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa truyền thống và sinh học phân tử (PCR và giải trình tự gen). Kết quả giải trình tự gen cho thấy các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* phân lập có tỷ lệ tương đồng với các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên ngân hàng GenBank dao động từ 99-100% và 98-100%.

Việc cảm nhiễm kép 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* bằng phương pháp ngâm và tiêm đã làm tăng độc lực vi khuẩn với thời gian bệnh xuất hiện sớm và tỷ lệ cá chết cũng cao hơn so với NT chỉ tiêm hoặc ngâm đơn. Cá nhiễm kép có dấu hiệu bệnh kết hợp của 2 loại bệnh GTM và bệnh XH với các biểu hiện thường gặp là XH bên ngoài cơ thể và các đốm trắng nhỏ li ti trên các nội quan gan, thận và tỳ tạng. Cấu trúc tế bào và vùng mô các cơ quan cá nhiễm kép như gan, thận và tỳ tạng thường xuất hiện các hiện tượng như sưng huyết, XH và hoại tử mất cấu trúc.

Vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong nghiên cứu đã giảm tính nhạy và đa kháng đối với nhiều loại kháng sinh được sử dụng phổ biến trong NTTS. Các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* còn nhạy tương đối cao với 2 kháng sinh AMP và AMO với tỷ lệ lần lượt là 77,61% và 70,15%, trong khi tỷ lệ nhạy của vi khuẩn *A. hydrophila* đối với CTX, CIP và DOX lần lượt là 78,38%, 81,08% và 89,19%. Ngoài ra, vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong nghiên cứu này thường xuyên tiếp xúc với kháng sinh trong môi trường nuôi cá tra với chỉ số MAR ở các tỉnh đều lớn hơn 0,2.

Luận án đã xác định các đặc điểm phân tử liên quan đến cơ chế đa kháng thuốc của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* như sự hiện diện các integron nhóm 1, các plamid kháng thuốc, các gen kháng tetracycline, sulfonamide và florfenicol. Đặc biệt, nghiên cứu đã phát hiện và giải trình tự 7 vùng gen casste mã hóa cho các enzyme kháng với nhiều loại kháng sinh khác nhau ở 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* có thể tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc cho vi khuẩn *E. coli* trong môi trường ao nuôi cá tra thông qua các plamid và integron. Tuy nhiên, giữa 2 loài vi khuẩn này không xảy ra quá trình tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc cho nhau.

## 5.2 Đề nghị

Cần xác định thêm các gen độc lực của 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* gây bệnh trên cá tra nuôi ở ĐBSCL.

Cần tiếp tục nghiên cứu khả năng tiếp hợp và truyền gen kháng thuốc giữa 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên nhiều chủng vi khuẩn để có kết luận đầy đủ và chính xác hơn về khả năng này của 2 loài vi khuẩn.

Cần tiếp tục nghiên cứu các gen kháng thuốc khác trên 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và vi khuẩn *A. hydrophila* như gen kháng kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam, quinolone và aminoglycoside.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aarestrup, F.M., Y. Agerso, Y. Gerner-Smidt, M. Madsen and L.B. Jensen, 2000. Comparison of microbial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 37: 127-137.
- Abbott, S.L. and J.M. Janda, 2006. The genus *Edwardsiella*. *Prokaryotes*, 6: 72-89.
- Aberoum A. and H. Jooyandeh, 2010. A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2: 519-523.
- Abulhamd A.T., 2009. Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Aquatic Environments Using Phenotypic and Genotyping Methods. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5: 923-931.
- Adesoji A.T., A.A. Ogunjobi and I.O. Olatoye, 2017. Characterization of Integrons and Sulfonamide Resistance Genes among Bacteria from Drinking Water Distribution Systems in Southwestern Nigeria. *Chemotherapy*, 62: 34-42.
- Agersø Y. and D. Sandvang, 2005. Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. Isolated from Pigsties and Manured Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7941-7947.
- Agersø Y., G. Peirano and F.M. Aarestrup, 2006. *dfra25*, a novel trimethoprim resistance gene from *Salmonella* Agona isolated from a human urine sample in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 1044-1047.
- Agerso, Y., M.S. Bruun, I. Dalsgaard and J.L. Larsen, 2007. The tetracycline resistance gene *Tet(E)* is frequently occurring and present on large horizontally transferrable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms. *Aquaculture*, 266: 47-52.
- Aguilar, A., S. Merino, X. Rubires and J.M. Tomas, 1997. Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37°C. *Infection and Immunity*, 65: 1245-1250.
- Aguilera-Arreola Ma.G., C. Hernandez-Rodriguez, G. Zuniga, M.J. Figueras and G. Castro-Escarpulli, 2003. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiology Letters*, 242: 231-240.
- Akinbowale, O.L., H. Peng and M.D. Barton, 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1103-1113.
- Akinbowale, O.L., H. Peng and M.D. Barton, 2007. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2016-2025.
- Alcaide, A., M.D. Blasco and C. Esteve, 2005. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3348-3350.
- Alekshun, M.N. and S.B. Levy, 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128:1037-1050.
- Allen, H.K., J. Donato, H.H. Wang, K.A. Cloud-Hansen, J. Davies and J. Handelsman, 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews Microbiology*, 8: 251-259.
- Aminov, R.I., 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2:158.
- Aoki T., S. Egata, Y. Ogata and T. Watanabe, 1971b. Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. *Journal of General Microbiology*, 65: 343-349.
- Aoki, T and A. Takahashi, 1987. Class D tetracycline resistance determinants of R-plasmids from fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pasteurella piscicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31: 1278-1280.
- Aoki, T. and Kitao, 1981. Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish ponds. *Fish Pathology*, 15: 277-281.

- Aoki, T., 1988. Drug-resistance plasmids from fish pathogens. *Microbiology of Sciences*, 5: 219-223.
- Aoki, T., S. Egusa, T. Kimura and Watanabe, 1971a. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 22: 716-717.
- Aoki, T., T. Satoh and T. Kitao, 1987. New Tetracycline Resistance Determinant on R Plasmids from *Vibrio anguillarum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31: 1446-1449.
- Arabi H., I. Pakzad, A. Nasrollahi, H. Hosainzadegan, F.A. Jalilian, M. Taherikalani, N. Samadi and A.M. Sefidan, 2015. Sulfonamide Resistance Genes (sul) M in Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) and Non-ESBL Producing *Escherichia coli* Isolated From Iranian Hospitals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8: e19961.
- Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato and M. Ohta, 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene bla<sub>IMP</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1612-1615.
- Areechon N. and J.A. Plumb, 1983. Pathogenesis of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture of Society*, 14: 249-260.
- Ashiru, A.W., P.O. Uaboi-Egbeni, J.E. Oguntowo and C.N. Idika, 2011. Isolation and Antibiotic Profile of *Aeromonas* Species from Tilapia Fish (*Tilapia nilotica*) and Catfish (*Clarias betrachus*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 982-986.
- Austin B. and D.A. Austin, 2007. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, 4th edn. Springer Praxis, Godalming, UK.
- Azad, I.S., K.V. Rajendran, J.J.S. Rajan, K.K. Vijayan and T.C. Santiago, 2001. Virulence and histopathology of *Aeromonas hydrophila* (Sah 93) in experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (L.). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 16: 265-275.
- Baba E., U. Acar, C. Ontas, O.S. Kesbic and S. Yilmaz, 2016. The use of Avena sativa extract against *Aeromonas hydrophila* and its effect on growth performance, hematological and immunological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Italian Journal of Animal Science*, 15: 325-333.
- Bagré T.S., B. Sambe-Ba, H.B. Ibrahim, G.B. Tchamba, R. Dembélé, A.A. Wane, E. Bako, A.S. Traoré, N. Barro1 and A. Gassama-Sow, 2017. Isolation and characterization of enteropathogenic and enterotoxinogenic *Escherichia coli* from dairy products consumed in Burkina Faso. *African Journal of Microbiology Research*, 11: 537-545.
- Bakaletz L.O., 2004. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 552-568.
- Balassiano, I.T., M.C.F. Bastos, D.J. Madureira, I.G. Silva, A.C. Freitas-Almeida and S.S. Oliveira, 2007. The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 861-866.
- Baldwin T.J. and J.C. Newton, 1993. Pathogenesis of enteric septicaemia of channel catfish, caused by *Edwardsiella ictaluri*: bacteriologic and light and electron microscopic findings. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5: 189-198.
- Barlow, R.S., J.M. Pemberton, P.M. Desmarchelier and K.S. Gobius, 2004. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 838-842.
- Barraud O., M. Casellas, C. Dagot and M.C. Ploy, 2013. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, 19: E306-E308.
- Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham, 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria (3<sup>rd</sup> edn). Cambridge University Press, Cambridge. 351 pp.
- Bartie K.L., F.W. Austin, A. Diab, C. Dickson, T.T. Dung, M. Giacomini and M. Crumlish, 2012. Intraspecific diversity of *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 35: 671-682.



- Bauer, A.L., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45: 493-496.
- Baxa, D.V., J.M. Groff, A. Wishkovsky and R.P. Hedrick, 1990. Susceptibility of nonictalurid fishes to experimental infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 8: 113-117.
- Bbosa G.S., N. Mwebaza, J. Odda, D.B. Kyegombe and M. Ntale, 2014. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, 6: 410-425.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Martínez-Murcia and M.J. Figueras, 2013. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al., 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Systematic and Applied Microbiology*, 36: 171-176.
- Bello-López J.M., N.J. Vázquez-Ocampo, E. Fernández-Rendón and E. Curiel-Quesada, 2012. Inability of Some *Aeromonas hydrophila* Strains to Act as Recipients of Plasmid pRAS1 in Conjugal Transfer Experiments. *Current Microbiology*, 64: 332-337.
- Biscardi, D., A. Castaldo, O. Gualillo and R. de Fusco, 2002. The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. *The Science of the Total Environment*, 292: 255-263.
- Blair J.M.A., M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu and L.J. V. Piddock, 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13: 42-51.
- Blickwede, M. and S. Schwarz, 2004. Molecular analysis of florfenicol resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 58-64.
- Boerlin, P., R. Travis, C. L. Gyles, R. Reid Smith, N. Janecko, H. Lim, V. Nicholson, S. A. McEwen, R. Friendship, and M. Archambault, 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6753-6761.
- Bolton, L.F., L.C. Kelley, M.D. Lee, P.J. Fedorka-Cray and J.J. Maurer, 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1348-1351.
- Bondad-Reantaso, M.G., R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, Z. Tan and M. Shariff, 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132: 249-272.
- Booth N.J., A. ElKamel and R.L. Thune, 2006. Intracellular replication of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18: 101-108.
- Borrego, J.J., M.A. Morinigo, E. Martinez-manzanares, M. Bosca, Dolores Castro, J.L. Barja and E.A. Toranzo, 1991. Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Medical Microbiology*, 35: 264-269.
- Bowser, P.R., J.H. Schachte, Jr., GA Wooster and J.G. Babish, 1990. Experimental treatment of *Aeromonas salmonicida* infections with enrofloxacin and oxolinic acid: Field trials. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2: 198-203.
- Briggs C.E. and P.M. Fratamico, 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 846-849.
- Brown, M.G., E.H. Mitchell, and D.L. Balkwill, 2008. *Tet42*, a novel tetracycline resistance determinant isolated from deep terrestrial subsurface bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 4518-4521.
- Bùi Thị Bích Hằng, Phạm Văn Thi, Nguyễn Minh Tân, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thanh Phương, 2015. Ảnh hưởng của vitamin C lên một số yếu tố miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 39: 85-91.

- Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animal: A Practical Identification Manual, CABI Publishing. 390 pp.
- Burka, J.F., K.L. Hammell, G.R. Johnson, D.J. Rainnie, and D.J. Speare, 1997. Drugs in salmonid culture. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20: 333-349.
- Burridge, L., J.S. Weis, F. Cabello, J. Pizarro and K. Bostick, 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306: 7-23.
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for environment. *Environment of Microbiology*, 8: 1137-1144.
- Cabello, F.C., H.P. Godfrey, A.T., L.I., H. Dölz, A. Millanao and A.H. Buschmann, 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15: 1917-1942.
- Cambray, G., A.M. Guerout and D. Mazel, 2010. Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44: 141-166.
- Camus A.C., R.M. Durborow, W.G. Hemstreet, R.L. Thune and J.P. Hawke, 1998. Aeromonas Bacterial Infections: Motile Aeromonad Septicemia (No. 478). Southern Regional Aquaculture Center (Southern Regional Aquaculture Center collectively covers Alabama, Arkansas, Florida, Georgia, Kentucky, Louisiana, Mississippi, North Carolina, Oklahoma, Puerto Rico, South Carolina, Tennessee, Texas, U.S. Virgin Islands, and Virginia).
- Canal N., K.L. Meneghetti, C.P. de Almeida, M. da Rosa Bastos, L.M. Otton and G. Corcão, 2016. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 337-344.
- Carattoli, A., 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32: 243-259.
- Carattoli, A., 2003. Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica*. *Current Issues in Molecular Biology*, 5: 113-122.
- Carraschi, S.P., 2012. Histopathological biomarkers in Pacu (*Piaractus esopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 83: 115-120.
- Citarasu, T., K. Alfred Dhas, S. Velmurugan, V. Thanga Viji, T. Kumaran, M. M Babu and T. Selvaraj, 2011. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from infected ornamental fish hatchery during massive disease outbreak. *International Journal of Current Research*, 2: 037-041.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second information supplement, M100-S22, Vol. 32 No. 3, Replaces M100-S21, Vol. 31 No. 1. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087, 2012.
- Cloekaert, A., S. Baucheron and E. Chaslus-Dancla, 2001. Nonenzymatic chloramphenicol resistance mediated by IncC plasmid R55 is encoded by a floR gene variant. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45: 2381-2382.
- Cloekaert, A., S. Baucheron, S. Flaujac, S. Schwarz, C. Kehrenberg, J. Martel, 2000. Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the floR gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 2858-2860.
- Collis, C.M. and R.M. Hall, 1992. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron ADN integrase. *Journal of Bacteriology*, 174: 1574-1585.
- Collis, C.M. and R.M. Hall, 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 155-162.
- Collis, C.M., G. Grammaticopoulos, J. Briton, H.W. Stokes and R.M. Hall. 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Molecular Microbiology*, 9: 41-52.
- Correia M., F. Boavida, F. Grosso, M.J. Salgado, L.M. Lito, J.M. Cristino and A.M. Duarte, 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2838-2843.

- Costa, D., P. Poeta, Y. Saenz, L. Vinué, A.C. Coelho, M. Matos, B.R. Bezares, J. Rodrigues and C. Torres, 2008. Mechanisms of Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microbial Drug Resistance*, 14: 71-77.
- Cowan and Steel's, 1993. Manual for identification of medical bacteria, Cambridge University Press. 125 pp
- Crespo, O., M. Catalano, S. Piñeiro, M. Matteo, A. Leanza and D. Centrón, 2005. Tn7 distribution in *Helicobacter pylori*: a selective paradox. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 341-344.
- Crumlish, M. and T.T. Dung, 2002. Strategies to reduce risk and livelihood impact associated with outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasius* spp. (BNP) farmed in the Mekong Delta, Vietnam (<http://www.dfid.stir.ac.uk/afgrp/>).
- Crumlish, M. Thanh, P.C., Koesling, J., Tung, V., T. and Gravingen, K., 2007. Antibiotic sensitivity profiles for bacteria from natural outbreaks Edwardsiellosis and motile *Aeromonas septicaemia* in Vietnamese *Pangasianodon hypophthalmus* ([www.pharmaq.no/Posters/DAAVI\\_2008-poster](http://www.pharmaq.no/Posters/DAAVI_2008-poster)).
- Crumlish, M. Thanh, P.C., Koesling, J., Tung, V., T. and Gravingen, K., 2010. Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 33: 717-722.
- Crumlish, M., T.T. Dung, J.F. Turnbull, N.T.N Ngoc and H.W. Ferguson, 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage) cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 25: 733-736.
- Chacon, M.R., M.J. Figueras, G. Castro-Escarpulli, L. Soler and J. Guarro, 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Anton Van Leeuwenhoek*, 84: 269-278.
- Chakravarty M.S., P.R.C. Ganesh, D. Amaranth, B.S. Sudha and M. Subhashini, 2015. *Escherichia coli*-occurrence in the meat of shrimp, fish, chicken and mutton and its antibiotic resistance. *European Journal of Experimental Biology*, 5: 41-48.
- Chang C.Y., P.L. Lu, C.C. Lin, T.M. Lee, M.Y. Tsai and L.L. Chang, 2011. Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*, 60: 197-204.
- Chee-Sanford J.C., R.I. Aminov, I.J. Krapac, N. Garrigues-Jeanjean and R.I. Mackie, 2001. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1494-1502.
- Chelossi, E., L. Vezzulli, A. Milano, M. Branzoni, M. Fabiano, G Ricarrdi, and I.M. Banat, 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish farm and control sediments of Western Mediterranean. *Aquaculture*, 219: 83-97.
- Chenia H.Y. and C. Vietze, 2012. Tetracycline resistance determinants of heterotrophic bacteria isolated from a South African tilapia aquaculture system. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 6761-6768.
- Chinabut, S., C. Limsuwan and P. Kitsawat, 1991. Histology of the walking catfish, *Clarias batrachus*. Aquatic Animal Health Research Institute. National Inland Fisheries Institute. 96 pp.
- Chopra I., P.M. Hawkey and M. Hinton, 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29: 245-277.
- Chopra, I. and M. Roberts, 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 232-260.
- Dallaire-Dufresne S., K.H. Tanaka, M.V. Trudel, A. Lafaille and S.J. Charette, 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, 169: 1-7.

- Dang H., J. Zhao, L. Song, M. Chen and Y. Chang, 2009. Molecular characterizations of chloramphenicol and oxytetracycline-resistant bacteria and resistance genes in mariculture waters of China. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 987-994.
- Dang, H., X. Zhang, L. Song, Y. Chang, and G. Yang, 2007. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2580-2592.
- Das A., D. Saha and J. Pal, 2009. Antimicrobial resistance and in vitro gene transfer in bacteria isolated from the ulcers of EUS-affected fish in India. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 497-502.
- Daskalov, H., 2006. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17: 474-483.
- Davies, J. and D. Davies, 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74: 417-433.
- Davies, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264: 375-382.
- de la Cruz, F., and J. Davies. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, 8: 128-133.
- De Silva, S.S. and N.T. Phuong, 2011. Striped catfish farming in the Mekong Delta, Vietnam: a tumultuous path to a global success. *Reviews in Aquaculture*, 3: 45-73.
- Defoirdt, T., P. Sorgeloos and P. Bossier, 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 251-258.
- DePaola, A., J.T. Peeler and G.E. Rodrick, 1995. Effect of Oxytetracycline-Medicated Feed on Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria in Catfish Ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2335-2340.
- DePaola, A., P.E. Flynn, R.M. McPhearson and S.B. Levy, 1988. Phenotypic and Genotypic Characterization of Tetracycline-and Oxytetracycline-Resistant *Aeromonas hydrophila* from Cultured Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) and Their Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1861-1863.
- Dong, H.T., V.V. Nguyen, K. Phiwsaiya, W. Gangnonngiw, B. Withyachumnarnkul, C. Rodkhum and S. Senapin, 2015. Concurrent infections of *Flavobacterium columnare* and *Edwardsiella ictaluri* in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in Thailand. *Aquaculture*, 448: 142-150.
- Doublet B., S. Schwarz, C. Kehrenberg and A. Cloeckert, 2005. Florfenicol resistance gene *floR* is part of a novel transposon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2106-2108.
- Dowling, P.M., 2006. Chloramfenicol, Thiamfenicol and florfenicol. In: Giguere, S., J. Prescott, D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 241-248.
- Dröge, M., A. Puhler and W. Selbitschka, 1999. Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 221-245.
- Duc P.M., D.T.M. Thy, K. Hatai and Y. Muraosa, 2015. Infection of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Viet Nam caused by the fungus *Fusarium incarnatum-equiseti*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 35: 208-216.
- Duc P.M., T.N. Tuan and K. Hata, 2013. *Aeromonas hydrophila* Infection in Fingerlings of Snakehead *Channa striata* in Viet Nam. *Fish Pathology*, 48: 48-51.
- Duc, P.M., D.T.M. Thy, N.T.M. Trinh, T.N. Tuan and K. Hatai, 2016. Water Molds Isolated from Eggs and Fry of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in the Mekong Delta of Viet Nam. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 10: 031-036.
- Dung T.T., K. Chiers, N.A. Tuan, P. Sorgeloos, F. Haesebrouck and A. Decostere, 2012. Early interactions of *Edwardsiella ictaluri*, with *Pangasianodon* catfish and its invasive ability in cell lines. *Veterinary Research Communication*, 36: 119-227.

- Dung, T.T., F. Haesebrouck, P. Sorgeloos, N.A Tuan and F. Pasmans, 2009. IncK plasmid-mediated tetracyclin resistance in *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish in Vietnam. *Aquaculture*, 295: 157-159.
- Dung, T.T., N.T.N. Ngoc, N.Q. Thinh, D.T.M. Thy, N.A. Tuan, A. Shinn and M. Crumlish, 2008. Common diseases of *Pangasius* Catfish farmed in Vietnam. *Global Aquaculture Advocate*, 11: 76-77.
- Džidic, S.S., J. Suskovic and B. Kos, 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46: 11-21.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy, 2009. Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên thân cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Công nghệ sinh học phục vụ nông - lâm nghiệp, thủy sản, công nghiệp, y - dược và bảo vệ môi trường. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2009, 26-27/11/2009, Thái Nguyên. Nhà xuất bản Đại học Thái Nguyên.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Đức Hiền, 2012. Phân lập và xác định khả năng gây bệnh xuất huyết trên lươn đồng (*Monopterus albus*) của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 22c: 173-182.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2009. Độc lực của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bị bệnh mù gan. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 12: 64-70.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra bằng phương pháp PCR. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 13: 151-159.
- Đặng Thị Hoàng Oanh, 2006. Đặc điểm sinh hóa và kiểu ARN ribosome của vi khuẩn *Aeromonas* phân lập từ bệnh phẩm thủy sản nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 85-94.
- Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Nghiên cứu ứng dụng qui trình mPCR (Multiplex Polymerase Chain Reaction) phát hiện một số mầm bệnh vi khuẩn nhiễm trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi tại Vĩnh Long. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp tỉnh.
- Đặng Thị Hoàng Oanh, Nguyễn Thanh Phương, Temdoung Somsiri, S. Chinabut, F. Yussoff, M. Shariff, K. Bartie, G. Huys, M. Giacomini, S. Berton, J. Swings and A. Teale, 2005. Xác định tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn phân lập từ các hệ thống nuôi thủy sản ở Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 4: 136-144.
- Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010. Đặc điểm mô bệnh học và huyết học ở cá tra *Pangasianodon hypophthalmus* nhiễm khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trong điều kiện thực nghiệm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 14b: 232-245.
- Đặng Thụy Mai Thy, 2010. Nghiên cứu đặc tính gây bệnh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* ở cá tra. Luận văn cao học ngành Nuôi trồng Thủy sản. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Đặng Thụy Mai Thy, Phạm Minh Đức và Trần Thị Tuyết Hoa, 2016. Thành phần vi nấm kí sinh trên cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 44b: 48-57.
- Đặng Thụy Mai Thy, Từ Thanh Dung và Phạm Thị Kim Phương, 2014. Đặc điểm mô bệnh học cá thát lát còm *Chitala chitala* nhiễm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số chuyên đề: Thủy sản, 2: 29-36.
- Đặng Thụy Mai Thy, Trần Thị Thủy Cúc, Nguyễn Châu Phương Lam, Nguyễn Đức Hiền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Đặc điểm mô bệnh học cá rô (*Anabas testudineus*) nhiễm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Streptococcus* sp. trong điều kiện thực nghiệm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 22c: 183-193.
- Đỗ Thị Thanh Hương, Tobias Wang và Mark Bayley, 2015. Một số vấn đề mới về sinh lý học cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Trong: Nguyễn Thanh Phương và Nguyễn Anh Tuấn (chủ biên). Nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long: Thành công và thách thức trong phát triển bền vững. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. Trang: 93-107.

- Enne, V.I., A. King, D.M. Livermore and L.M. Hall, 2002. Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal folP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1934-1939.
- Esteve, C., C. Amaro, E. Garay, Y. Santos and A.E. Toranzo, 1995. Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 555-562.
- Ewing, W.H., A.C. Mcwhorter, M.R. Escobar and A.H. Lubin, 1965. *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 15: 33-38.
- Ferguson, H.W., 1989. Systemic pathology of fish. 247 pp.
- Ferguson, H.W., 2006. Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease. Scotian press. 367 pp.
- Ferguson, H.W., J.F. Turnbull, A. Shin, K. Thompson, T.T. Dung and M. Crumlish, 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), from the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 24: 509-513.
- Fernandez D.H., L. Pittman-Cooley and R.L. Thune, 2001. Sequencing and analysis of the *Edwardsiella ictaluri* plasmids. *Plasmid*, 45: 52-6.
- Fernández-Alarcón, C., C.D. Miranda, R.S. Singer, Y. López, R. Rojas, H. Bello, M. Domínguez and G. González-Rocha, 2010. Detection of the *floR* Gene in a Diversity of Florfenicol Resistant Gram-Negative Bacilli from Freshwater Salmon Farms in Chile. *Zoonoses Public Health*, 57: 181-188.
- Figueiredo, J. and J.A. Plumb, 1977. Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*, 349-354.
- Fluit, A.C. and F.J. Schmitz, 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 272-288.
- Fluit, A.C., and F.J. Schmitz, 1999. Class 1 integrons, gen cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18: 761-770.
- Frank T., V. Gautier, A. Talarmin, R. Bercion and G. Arlet, 2007. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in *Enterobacteriaceae*, Central African Republic (CAR). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 742-745.
- Frank T., V. Gautier, A. Talarmin, R. Bercion and G. Arlet, 2007. Characterization of sulfonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in *Enterobacteriaceae*, Central African Republic (CAR). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 742-745.
- Freich, N.G. and S.D. Millar, 1993. Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens. Pisces Press. UK 55 pp.
- Fricke W.F., T.J. Welch, P.F. McDermott, M.K. Mammel, J.E. LeClerc, D.G. White, T.A. Cebula and J. Ravel, 2009. Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *Journal of Bacteriology*, 191: 4750-4757.
- Frost, L.S., R. Leplae, A.O. Summers and A. Toussaint, 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 722-732.
- Furushita, M., T. Shiba, T. Maeda, M. Yahata, A. Kaneoka, Y. Takahashi, K. Torii, and T. Hasegawa, 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5336-5342.
- Furuya, E.Y. and F. Lowy, 2006. Antimicrobial resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 36-45.
- Geng, Y., K.Y. Wang, C.W. Li, S.Y. Ren, Z.Y. Zhou, X.X. Liu, X.F. Liu, X.L. Huan and D.F. Chen, 2013. Isolation and characterisation of *Edwardsiella ictaluri* from southern catfish, *Silurus soldatovi meridionalis*, (Chen) cultured in China. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44: 273-281.
- Goldstein, C., M.D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A.O. Summers, D.G. White, and J.J. Maurer, 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in

- clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 723-726.
- Gorbach, S.L., 2001. Antimicrobial use in animal feed-Time to stop. *New England Journal of Medicine*, 345: 1202-1203.
- Gordon L., A. Cloeckert, B. Doublet, S. Schwarz, A. Agnès Bouju-Albert, J.P. Ganière, H. Le Bris, A. Le Flèche-Matéos and E. Giraud, 2008. Complete sequence of the *floR*-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 65-71.
- Grape M., L. Sundström and G. Kronvall, 2003. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 1022-1024.
- Griffith, F., 1928. The significance of *Pneumococcal* types. *Journal of Hygiene*, 27: 113-159.
- Grimont, P.A.D., F. Grimont, C. Richard and R. Sakazaki, 1980. *Edwardsiella hoshinae*, a new species of Enterobacteriaceae. *Current Microbiology*, 4: 347-351.
- Guerra B., E. Junker and R. Helmuth, 2004. Incidence of the Recently Described Sulfonamide Resistance Gene *sul3* among German *Salmonella enterica* Strains Isolated from Livestock and Food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 2712-2715.
- Guz, L. and A. Kozinska, 2004. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sorbia* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48: 391-395.
- Giedraitienė, A., A. Vitkauskienė, R. Naginienė and A. Pavilonis, 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 47: 137-146.
- Hà Ký và Bùi Quang Tê, 2007. KST nước ngọt Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật Hà Nội. 360 trang.
- Hammerum A.M., D. Sandvang, S.R. Andersen, A.M. Seyfarth, L.J. Porsbo, N. Frimodt-Møller and O.E. Heuer, 2008. Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 235-237.
- Hancock, R.E., 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27: S93-99.
- Hanes, D.E. and D.K.F. Chandler, 1993. The role of a 40-megadalton plasmid in the adherence and hemolytic properties of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 15: 313-317.
- Hanson L., M.R. Liles, M.J. Hossain, M. Griffin and W. Hemstreet, 2014. Motile aeromonas septicemia, in Fish Health Section Blue Book 2014 Edition. Bethesda, MD: American Fisheries Society - Fish Health Section; Available online at: <http://www.afs-fhs.org/perch/resources/citation-guidelines-2014.pdf>
- Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier and P.H. Roy, 2002. *IntI2* integron integrase in Tn7. *The Journal of Bacteriology*, 184: 1712-1721.
- Harikrishnan R., R.M. Nisha and C. Balasundaram, 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*, 221: 41-50.
- Hassan, E.S., M.M. Mahmoud, Y. Kawato, T. Nagai, O. Kawaguchi, Y. Iida, K. Yuasa and I.T. Naka, 2012. Subclinical *Edwardsiella ictaluri* infection of Wild Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 47: 64-73.
- Hatha, M., A.A. Vivekanandam, G.J. Joice, and G.J. Christol, 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised freshwater fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 131-134.
- Hawke J.P., M. Kent, M. Rogge, W. Baumgartner, J. Wiles, J. Shelley, L.C. Savolainen, R. Wagner, K. Murray and T.S. Peterson, 2013. Edwardsiellosis Caused by *Edwardsiella ictaluri* in Laboratory Populations of Zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 25: 171-183.
- Hawke J.P., R.J. Durborow, R.L. Thune and A.C. Camus, 1998. ESC-enteric septicemia of catfish. Southern Regional Aquaculture Center, 477.



- Hawke, J.P., 1979. A bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish (*Italurus punctatus*). *Journal of fishes Research Board of Canada*, 36: 1058-1512.
- Hawke, J.P., A.C. McWhorter, A.G. Steigerwalt and D.J. Brenner, 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *International journal of Systematic bacteriology*, 31: 396-400.
- Hawke, J.P., M. Kent, M. Rogge, W. Baumgartner, J. Wiles, J. Shelley, L.C. Savolainen, R. Wagner, K. Murray and T.S. Peterson, 2013. Edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in laboratory populations of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 25: 171-183.
- Heuer, O.E., H. Kruse, K. Grave, P. Collignon, I. Karunasagar, and F.J. Angulo, 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49: 1248-1253.
- Hjerde E., C. Karlsen, H. Sørum, J. Parkhill, N.P. Willassen and N.R. Thomson, 2015. Co-cultivation and transcriptome sequencing of two co-existing fish pathogens *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*. *BMC Genomics*, 16: 447.
- Ho, S.P., T.Y. Hsu, M.H. Chen and W.S. Wang, 2000. Antibacterial effects of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62: 479-485.
- Hoa P.TH.P., L. Nonaka, P.H. Viet and S. Suzuki, 2008. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Science of the total Environment*, 405: 377-384.
- Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S.M. Faruque, R. Woodgate, and M.K. Waldor, 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2991-3000.
- Hodgkinson J.L., D. Bucke and B. Austin B, 1987. Uptake of the fish pathogen, *Aeromonas salmonicida*, by rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.). *FEMS Microbiology Letters*, 40: 207-210.
- Hybiya, T., 1982. An atlas of histology (Normal and Pathological features). College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon Univ. Tokyo, Japan. 146 pp.
- Infante B., M. Grape, M. Larsson, C. Kristiansson, L. Pallecchic, G.M. Rossolinic and G. Kronvalla, 2005. Acquired sulfonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 308-312.
- Inglis, V., R.J. Roberts and N.R. Bromage, 1993. Bacterial disease of fish. Blackwell Science.
- Iversen, J., D. Sandvang, A. Srijan, P.D. Cam and A. Dalsgaard, 2003. Characterization of Antimicrobial Resistance, Plasmids, and Gen cassettes in *Shigella* spp. from Patients in Vietnam. *Microbial Drug Resistance*, 1: 17-23.
- Iwanowicz L.R., A.R. Griffin, D.D. Cartwright and V.S. Blazer, 2006. Mortality and pathology in brown bullheads *Amieurus nebulosus* associated with a spontaneous *Edwardsiella ictaluri* outbreak under tank culture conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, 70: 219-25.
- Jacobs, L. and H.Y. Chenia, 2007. Characterization on integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 295-306.
- Jacrboe H.H., P.R. Bowser and H.R. Robinette, 1984. Pathology associated with natural *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Journal of Wildlife Diseases*, 20: 352-354.
- Janda, J.M. and S.L. Abbott, 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Review*, 23: 35-73.
- Jun, L.J., J.B. Jeong, M.D. Huh, J.K. Chung, D.L. Choi, C.H. Lee, and H.D. Jeong, 2004. Detection of tetracycline resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture*, 240: 89-100.

- Kadlec K., E. Von Czapiewski, H. Kaspar, J. Wallmann, G.B. Michael and U. Steinacker, 2011. Molecular basis of sulfonamide and trimethoprim resistance in fish-pathogenic *Aeromonas* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7147-7150.
- Kadlec, K. and S. Schwarz. 2008. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gen cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BFT-GermVet monitoring study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 469-473.
- Kang, H.Y., Y.S. Jeong, J.Y. Oh, S.H. Tae, C.H. Choi, D.C. Moon, W.K. Lee, Y.C. Lee, S.Y. Seol, D.T. Cho and J.C. Lee, 2005. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 639-644.
- Karczmarczyk M., Y. Abbott, C. Walsh, N. Leonard and S. Fanning, 2011. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a University Veterinary Hospital. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7104-7112.
- Kargar M., Z. Mohammadalipour, A. Doosti, S. Lorzadeh and A. Japoni-Nejad, 2014. High Frequency of Class 2 and 3 Integrons Related to Drug-Resistance in Clinical Isolates of Diarrheagenic *E. coli* in Iran. *Osong Public Health and Research Perspective*, 5: 193e198
- Karlsen C., C. Vanberg, H. Mikkelsen and H. Sørsum, 2014. Co-infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*), by *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*, development of disease and host colonization. *Veterinary Microbiology*, 171: 112-121.
- Karunasagar, I., G.M. Rosalind, I. Karunasagar and K.G. Rao, 1989. *Aeromonas hydrophila* septicaemia of Indian major carps in some commercial fish farms of West Godavari District, Andhra Pradesh. *Current Science*, 58: 1044-1045.
- Kashif J., R. Buriro, J. Memon, M. Yaqoob, J. Soomro, D. Dongxue, H. Jinhu and W. Liping, 2013. Detection of class 1 and 2 integrons,  $\beta$ -lactamase genes and molecular characterization of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from poultry in China. *Pakistan Veterinary Journal*, 33: 321-324.
- Kaskhedilar, M. and D. Chhabra, 2010. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Veterinary World*, 3: 76-77.
- Kasornchandra, J., W.A. Rogers and J.A. Plumb, 1987. *Edwardsiella ictaluri* from walking catfish, *Clarias batrachus* L., in Thailand. *Journal of Fish Disease*, 10: 137-138.
- Kehrenberg, C. and S. Schwarz, 2004. *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 615-618.
- Kerry, J., M. Hiney, R. Coyne, S. Nicgabhainn, D. Gilroy, D. Cazabon, P. and Smith, 1995. Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture*, 131: 101-113.
- Keskin, O., S. Secer, M. Izgur, S. Turkyilmaz and R. S. Mkakosya, 2004. *Edwardsiella ictaluri* infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 649-653.
- Keyes, K., C. Hudson and J.J. Maurer, 2000. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 421-424.
- Kim E. and T. Aoki, 1996. Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology and Immunology*, 40: 665-669.
- Kim Y.S., J.W. Yoon, H.J. Han, R. Suebsing and J.H. Kim, 2011b. Prevalence and Characterization of Typical *Aeromonas salmonicida* Chum Salmon Isolates in Korea. *Fisheries and Aquatic Science*, 14: 347-354.
- Kim, J.H., S.Y. Hwang, J.S. Son, J.E. Han, J.W. Jun and S.P. Shin, 2011a. Molecular characterization of tetracycline and quinolone resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 12: 41-48.

- Kim, S., S.H. Kim, J. Kim, J.H. Shin, B.K. Lee, and M.S. Park, 2010. Occurrence and distribution of various genetic structures of class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from foodborne disease patients in Korea for 16 years. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8: 319-324.
- Kim, S.R., L. Nonaka and S. Suzuki, 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *Tet(M)* and *Tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 147-156.
- Kim, Y.H., L.J. Jun, S.H. Park, S.H. Yoon, J.K. Chung, J.C. Kim, and H.D. Jeong, 2007. Prevalence of *tet(B)* and *tet(M)* genes among tetracycline-resistant *Vibrio* spp. in the aquatic environments of Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75: 209-216.
- Klesius, P., 1994. Transmission of *Edwardsiella ictaluri* from infected, dead to noninfected channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 180-182.
- Klesius, P., J. Lovy, J. Evans, E. Washuta and C. Arias, 2003. Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from tadpole madtom in a southwestern New Jersey river. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15: 295-301.
- Klesius, P.H. and W.M. Sealey, 1995. Characterization of serum antibody in enteric septicemia of catfish. *Journal of Aquatic animal Health*, 7: 205-210.
- Koczura R., A. Semkowska and J. Mokracka, 2014. Integron-bearing Gram-negative bacteria in lake waters. *Letters in Applied Microbiology*, 59: 514-519.
- Koeleman, J.G.M., J. Stoof, M.W. Van Der Bijl, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls and P.H.M. Savelkoul, 2001. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 8-13.
- Korbsrisate, S., S. Dumnin, R. Chawengkirttikul, V. Gherunpong, B. Eampokalap, C. Gongviseisoog, K. Janyapoon, K. Lertpocasombat and T. Shimada, 2002. Distribution of *Aeromonas hydrophila* serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination. *Microbiology and Immunology*, 46: 875-879.
- Kotlarska E., A. Łuczkiwicz, M. Pisowacka and A. Burzyński, 2015. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 2018-2030.
- Kotob M.H., S. Menanteau-Ledouble, G. Kumar, M. Abdelzaher and M. El-Matbouli, 2016. The impact of co-infections on ish: a review. *Veterinary Research*, 47: 98.
- Krumperman, P. H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 165-170.
- Kruse H. and H. Sørum, 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4015-4021.
- Kunz, A.N. and I. Brook, 2010. Emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli in hospital-acquired infections. *Chemotherapy*, 56: 492-500.
- Kuo, H.C., H.W. Wei, C.D. Chang, C.C. Chou, C. Tu, J.W. Liao and S.K. Chang, 2009. Molecular detection of florfenicol and chloramphenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from healthy pigs during 2003 to 2007. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17: 217-224.
- Khoa, L.V. and K. Hatai, 2005. First case of *Fusarium oxysporum* infection in culture Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathology*, 40: 195-196.
- Khoa, L.V. and K. Hatai, 2005. First case of *Fusarium oxysporum* infection in culture Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathology*, 40: 195-196.
- L'abée-Lund, T.M., and Sørum, H., 2001. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microbial Drug Resistance*, 7: 263-272.

- Labbate, M., R.J. Case and H.W. Stokes, 2009. The integron/gen cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods in Molecular Biology*, 532: 103-125.
- Lai C.C., C.C. Shiao, G.D. Lu, L.W. Ding, 2007. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in a burn patient. *Burns*, 33: 255-257.
- Laith A.R. and M. Najiah, 2013. *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial Susceptibility and Histopathology of Isolates from Diseased Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5: 215.
- Lawrence M.L., M.M. Banes and M.L. Williams, 2001. Phenotype and virulence of a transposon-derived lipopolysaccharide O side-chain mutant strain of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 291-299.
- Lawrence M.L., M.M. Banes, P. Azadi and B.Y. Reeks, 2003. The *Edwardsiella ictaluri* O polysaccharide biosynthesis gene cluster and the role of O polysaccharide in resistance to normal catfish serum and catfish neutrophils, *Microbiology*, 149: 1409-1421.
- Le, T.C. and F. Cheong, 2010. Perceptions of risk and risk management in Vietnamese catfish farming: An empirical study. *Aquaculture Economics and Management*, 14: 282-314.
- Lee M.F., C.F. Peng, Y.H. Lin, S.R. Lin and Y.H. Chen, 2008. Molecular diversity of class 1 integrons in human isolates of *Aeromonas* spp. from southern Taiwan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61: 343-349.
- Lee, C., J.C. Cho, S.H. Lee, D.G. Lee and S.J. Kim, 2002. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 976-985.
- Leplae, R., A. Hebrant, S.J. Wodak and A. Toussaint, 2004. A classification of mobile genetic elements. *Nucleic acids Research*, 32: D45-D49.
- Levesque, C., L. Piche, C. Larose and P.H. Roy, 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 185-191.
- Levy, S.B. and B. Marshall, 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10: S122-S129.
- Lê Hữu Thôi, Trương Quỳnh Như, Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh. 2010. Nghiên cứu ứng dụng qui trình mPCR chẩn đoán đồng thời vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 16a: 129-135.
- Lê Minh Long, Hans Bix và Ngô Thụy Diễm Trang, 2014. Sử dụng thuốc và hóa chất trong ao nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) thâm canh ở Đồng Tháp, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số chuyên đề: Môi trường và Biến đổi khí hậu, 18-25.
- Li J., X.D. Ni, Y.J. Liu and C.P. Lu, 2011. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 823-830.
- Li, C., B. Beck, B. Su, J. Terhune and E. Peatman, 2013. Early mucosal responses in blue catfish (*Ictalurus furcatus*) skin to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 34: 920-928.
- Lillehaug, A., B.T. Lunestad and K. Grave, 2003. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture—a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53: 115-125.
- Lin M., X. Wu, Q. Yan, Y. Ma, L. Huang, Y. Qin and X. Xu, 2016. Incidence of antimicrobial-resistance genes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from eels and aquaculture ponds. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120: 115-123.
- Lina, T.T., S.R. Rahman and D.J. Gomes, 2007. Multiple antibiotic resistance mediated by plasmids and integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. *Bangladesh Journal of Microbiol*, 24: 19-23.
- Lio-Po, G.D., L.J. Albright, C. Michel and E.M. Leano, 1998. Experimental induction of lesions in snakeheads (*Ophicephalus striatus*) and catfish (*Clarias batrachus*) with *Aeromonas*

- hydrophila*, *Aquaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp. and *Streptococcus* sp. *Journal of Applied Ichthyology*, 14: 75-79.
- Liu, J.Y., A.H. Li, D.R. Zhou, Z.R. Wen and X. P. Ye, 2010. Isolation and characterization of *Edwardsiella ictaluri* strains as pathogens from diseased yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson) cultured in China. *Aquaculture Research*, 41: 1835-1844.
- Livermore, D.M., 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34: 634-640.
- Livermore, D.M., 2005. Minimising antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 5: 450-459.
- Lobb, C.J. and M. Rhoades, 1987. Rapid plasmid analysis for identification of *Edwardsiella ictaluri* from infected channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1267-1272.
- Lobb, C.J., S.H. Ghaffari, J.R. Hayman and D.T. Thompson, 1993. Plasmid and serological differences between *Edwardsiella ictaluri* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2830-2836.
- Loch T.P., K. Scribner, R. Tempelman, G. Whelan and M. Faisal, 2012. Bacterial infections of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), returning to gamete collecting weirs in Michigan. *Journal of Fish Diseases*, 35: 39-50.
- Lukkana, M., J. Wongtavatchai, and R. Chuanchuen, 2011. Class 1 Integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile Tilapia (*Oreochromis nilotica*). *The Journal of Veterinary Medical Science*, 4: 435-440.
- Lund, V. and H. Mikkelsen, 2004. Genetic diversity among A-proteins of atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61: 257-262.
- Lunder T., Ø. Eversen, G. Holstad and T. Hastein, 1995. "Winter ulcer" in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 39-49.
- Luu Thi Thanh Truc, Investigation into jaundice in farmed catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage) in the Mekong Delta, 2013. PhD thesis, University of Stirling, Scotland.
- Ly, T.T.L., N.N. Du, V.H. Phuong and D.V. Cuong, 2009. Hemorrhage Disease of Cultured Tra Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Mekong Delta (Vietnam). *The Israeli Journal of Aquaculture*, 61: 215-224.
- Machado, E., R. Cantón, F. Baquero, J.C. Galán, A. Rollán, L. Peixe and T.M. Coque, 2005. Integron content of extended-spectrum- $\beta$ -Lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1823-1829.
- Madhavan, H.N. and S. Murali, 2011. Mechanisms of Development of Antibiotic Resistance in Bacteria Among Clinical Specimens. *Journal of Clinical and Biomedical Sciences*, 1: 42-48.
- Majumdar T., S. Datta, D. Ghosh, S. Dutta, A. Chakraborty, R. Goswami and S. Mazumder, 2007. Role of virulence plasmid of *Aeromonas hydrophila* in the pathogenesis of ulcerative disease syndrome in *Clarias batrachus*. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 44: 401-406.
- Majumdar T., S. Ghosh, J. Pal and S. Mazumder, 2006. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 256: 95-104.
- Mandomando I., D. Jaintilal, M.J. Pons, X. Valles, M. Espasa, L. Mensa, B. Sigauque, S. Sanz, J. Sacarlal, E. Macete, F. Abacassamo, P.L. Alonso and J. Ruiz, 2009. Antimicrobial Susceptibility and Mechanisms of Resistance in *Shigella* and *Salmonella* Isolates from Children under Five Years of Age with Diarrhea in Rural Mozambique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 2450-2454.
- Marshall, B.M. and S.B. Levy. 2011. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24: 718-733.

- Martinez, J.L., M.B. Sánchez, L. Martínez-Solano, A. Hernandez, L. Garmendia, A. Fajardo and C. Alvarez-Ortega, 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 33:430-449.
- Mashima, K.C. and G.A. Lewbart, 2000. Pet fish formulary. *Veterinary clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 3: 117-29.
- Mastan, S.A. and T.A. Qureshi, 2001. Role of bacteria in the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fishes. *Journal of Environmental Biology*, 22: 187-192.
- Mastan, S.A., 2015. Use of Immunostimulants in aquaculture disease management. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2: 277-280.
- Matyar, F., A. Kaya and S. Dinçer, 2008. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of The Total Environment*, 407: 279-285.
- Matyar, F., T. Akkan, Y. Uçak and B. Eraslan, 2010. Aeromonas and Pseudomonas: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environmental Monitoring and Assessment*, 167: 309-320.
- Maynard, C., J.M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrín, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière and J. Harel, 2003. Antimicrobial resistance genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 3214-3221.
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 608-620.
- Mazel, D., and J. Davies, 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56:742-754.
- Mazel, D., B. Dychinco, V.A. Webb and J. Davies, 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1568-1574.
- McPhearson, R.M., A. DePaola, S.R. Zywno, Jr. M.L. Motes and A.M. Guarino. 1991, Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99: 203-211.
- Memariani M., S.N. Peerayeh, S.K..S. Mostafavi and T.Z. Salehi, 2014. Detection of Class 1 and 2 Integrons Among Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 2: e16372.
- Michel, C., B. Kerouault, and C. Martin, 2003. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 1008-1015.
- Miko A., K. Pries, A. Schroeter and R. Helmuth, 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 1025-1033.
- Mirand, C.D. and R. Zemelman, 2002. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Science of the Total Environment*, 293: 207-218.
- Miranda C.D. and R. Zemelman, 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepcion Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 1096-1102.
- Miranda, C.D., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz and M.C. Roberts, 2003. Diversity of tetracyclineresistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 883-888.
- Miyazaki, T and J.A. Plumb, 1985. Histopathology of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 8: 389-392.
- Mohanty, B.R., J. Mishra, S. Das, J.K. Jena and P.K. Sahoo, 2008. An outbreak of aeromoniasis in an organized composite carp culture farm in India: Experimental pathogenicity and antibiogram study. *Journal of Aquaculture*, 16: 27-37.

- Mohomad S. and H. Abasali, 2010. Effect of plant extracts supplemented diets on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*). *Agricultural Journal*, 5: 119-127.
- Mokracka J., R. Koczura and A. Kaznowski, 2012. Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 46: 3353-3363.
- Morrison E.E. and J.A. Plumb, 1994. Olfactory organ of channel catfish as a site of experimental *Edwardsiella ictaluri* infection. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 101-109.
- Murray, I.A., and W.V. Shaw, 1997. O-acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 1-6.
- Muyembe, T., J. Vandepitte and J. Desmyter, 1973. Natural Colistin Resistance in *Edwardsiella tarda*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4: 521-524.
- Navia M.M., J. Gascon and J. Vila, 2005. Analysis of the mechanisms of resistance to several antimicrobial agents in *Shigella* spp. causing travellers' diarrhoea. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11: 1035-1047.
- Nawaz M., K. Sung, S.A. Khan, A.A. Khan and R. Steele, 2006. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6461-6466.
- Nawaz M., S.A. Khan, A.A. Khan, K. Sung, Q. Tran, K. Kerdahi and R. Steele, 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiology*, 27: 327-331.
- Nawaz, M., A.A. Khan, S. Khan, K. Sung and R. Steele, 2008. Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish. *Food Microbiology*, 25: 85-91.
- Nawaz, M., A.A. Khan, S. Khan, K. Sung, K. Kerdahi and R. Steele, 2009. Molecular characterization of tetracycline resistant genes and integrons from avirulent strains of *Escherichia coli* isolated from catfish. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5: 553-559.
- Nawaz, M., S.A. Khan, Q. Tran, K. Sung, A.A. Khan, I. Adumu and R.S. Steele. 2012, Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella* spp. isolated from shrimp imported from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 155: 179-184.
- Ndi, L.O. and M.D. Barton, 2012. Resistance Determinants of *Pseudomonas* species from Aquaculture in Australia. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 3:1-6.
- Ndi, O.L. and M.D. Barton, 2011. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 34: 589-599.
- Neumann B., A. Pospiech and H.U. Schairrer, 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. *Trends in Genetics*, 8: 332-333.
- Newman, S.G., 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3: 145-185.
- Newton J.C., L.G. Wolfe, J.M. Grizzle and J.A. Plumb, 1989. Pathology of experimental enteric septicaemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following immersion-exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases*, 12: 335-347.
- Newton, J.C., R.C. Bird, W.T. Blevins, G.R. Wilt and L.G. Wolfe, 1988. Isolation, characterization, and molecular cloning of cryptic plasmids isolated from *Edwardsiella ictaluri*. *American Journal of Veterinary Research*, 19: 1856-1860.
- Nikaido, H., 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 119-146.
- Noga, E.J., 2010. Fish disease: Diagnosis and Treatment. Second Edition. Wiley - Blackwell Publishing. USA. 519 pp.
- Nomura T., H. Honma, H. Kasai and M. Yoshimizu, 2002. Isolation of *Aeromonas salmonicida*, causative agent of furunculosis, from chum salmon caught in the river or coast. *Bulletin of Fisheries Sciences Hokkaido University*, 53: 45-50.
- Noor El Deen A.E., M. Sohad, Dorgham, Azza H.M. Hassan and A.S. Hakim, 2014. Studies on *Aeromonas hydrophila* in Cultured *Oreochromis niloticus* at Kafr El Sheikh Governorate,

- Egypt with Reference to Histopathological Alterations in Some Vital Organs. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 6: 233-240.
- Norman, A., L.H. Hansen and S.J. Sørensen, 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364: 2275-2289.
- Nusbaum K.E. and E.E. Morrison, 1996. Entry of <sup>35</sup>S-labeled *Edwardsiella ictaluri* into channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8: 146-149.
- Nusbaum, K.E. and E.E. Morrison, 2002. *Edwardsiella ictaluri* bacteraemia elicits shedding of *Aeromonas hydrophila* complex in latently infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 25: 343-350.
- Nya E. and B. Austin, 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Diseases*, 32: 971-977.
- Nya E.J. and B. Austin, 2009. Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 108: 686-694.
- Ngoci N.S., K. Silas, L. Moses, M.M. Jessica, E.N.M. Njagi, P.O. Okemo and L. Nathan, 2012. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Aeromonas hydrophila* isolated from River Njoro, Kenya. *African Journal of Biotechnology*, 11: 16284-16290.
- Ngô Thị Ngọc Trân, Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Xác định tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) bệnh phù mắt và xuất huyết. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 42: 48-55.
- Nguyen H.N.K., V.T.T. Hao, N.H. Thinh, P.M. Smooker, J. Shimeta and P.J. Coloe, 2014. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam. *Veterinary Microbiology*, 171: 397-405.
- Nguyễn Chính, 2005. Đánh giá tình hình sử dụng thuốc, hóa chất trong nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) thâm canh ở An Giang và Cần Thơ. Luận văn tốt nghiệp cao học. Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Hà Giang, Trương Quỳnh Như, Lê Hữu Thời và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010. Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 16a: 136-140.
- 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 mù trên cá tra, *Pangasius hypophthalmus*, nuôi thâm canh. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp*, Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
- Nguyễn Quốc Thịnh, Từ Thanh Dung và H.W. Ferguson, 2004. Nghiên cứu mô bệnh học cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bị bệnh trắng gan. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 120-125.
- Nguyễn Quốc Thịnh, Trần Minh Phú, Huỳnh Sô Ni, S. Quennery, Đỗ Thị Thanh Hương, Nguyễn Thanh Phương, P. Kestemont và M.L. Scippo, 2014. Tình hình sử dụng thuốc hóa chất trong mô hình lúa-cá kết hợp, cá tra ao đất và cá điều hồng trong lồng bè ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Số chuyên đề Thủy sản, 278-283.
- Nguyễn Thanh Phương, Nguyễn Anh Tuấn và Dương Nhựt Long, 2015. Hình thành và phát triển của nghề nuôi cá tra thương mại ở Đồng bằng sông Cửu Long. Trong: Nguyễn Thanh Phương và Nguyễn Anh Tuấn (chủ biên). Nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long: Thành công và thách thức trong phát triển bền vững. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. Trang 1-12.
- Nguyễn Thành Tâm, Dương Thị Bé Ba, Lê Văn Toàn và Nguyễn Văn Bá, 2014. Tuyển chọn vi khuẩn lactic để sản xuất và sử dụng trong ương cá tra. *Tạp chí Sinh học*, số 36: 126-129.



- Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Đặc điểm mô bệnh học của cá lóc (*Channa striata*) bệnh xuất huyết và bệnh gan thận mù. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 42: 93-100.
- Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Đặc điểm mô bệnh học của cá lóc (*Channa striata*) bệnh xuất huyết và bệnh gan thận mù. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 42b: 93-100.
- Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Xác định nhóm ký sinh trùng tạo bào nang trên cá tra *Pangasianodon hypophthalmus*. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, số 22c: 155-164.
- Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Xác định mầm bệnh vi bào tử trùng (*Microsporidia*) nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, số 42: 101-110.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, Đặng Thụy Mai Thy, Nguyễn Thanh Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2008. Khảo sát sự nhiễm ký sinh trùng trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh ở tỉnh An Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 1: 204-212.
- Nguyễn Thiện Nam, Phạm Thanh Hương, Trần Duy Phương và Từ Thanh Dung, 2010. Nghiên cứu sự đa kháng thuốc của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 14b: 200-210.
- Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai, 2012. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh gan thận mù và đốm đỏ trên cá tra. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 23a: 224-234.
- Odumosu, T.B., B.A. Adeniyi and R. Chandra, 2013. Analysis of integrons and associated gen cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12:29.
- Oliveira S.T.L., G. Veneroni-Gouveia and M.M. Costa, 2012. Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32: 701-706
- Palumbo, S.A., D.R. Morgan and R.L Buchanan, 1985. Influence of the temperature, NaCl and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Science*, 50: 1417-1421.
- Pan, J.C., R. Ye, D.M. Meng, W. Zhang, H.Q. Wang and K.Z. Liu, 2006. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 288-296.
- Panangala, V.S., C.A. Shoemaker, V.L. van Santen, K. Dybvig and P.H. Klesius, 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of aquatic organisms*, 74: 199-208.
- Parker J.L. and J.G. Shaw, 2011. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, 62: 109-118.
- Partridge, S.R., G. Tsafnat, E. Coiera and J.R. Iredell, 2009. Gen cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiological Reviews*, 33: 757-84.
- Pathiratne, A., G.S. Widanapathirana and W.H.S. Chandrakanthi, 1994. Association of *Aeromonas hydrophila* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) of freshwater fish in Sri Lanka. *Journal of Applied Ichthyology*, 10: 204-208.
- Peirano G., Y. Agersø, F.M. Aarestrup, E.M.F. dos Reis and D. dos Prazeres Rodrigues, 2006. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 305-309.
- Perreten, V. and P. Boerlin, 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1169-1172.

- Petersen, A. and A. Dalsgaard, 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environmental Microbiology*, 5: 395-402.
- Petersen, A., L. Guardabassi, A. Dalsgaard and J.E. Olsen, 2000. Class 1 integrons containing a dhfrI trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 73-76.
- Petrie-Hanson, L., C.L. Romano, R.B. Mackey, P. Khosravi, C.M. Hohn and C.R. Boyle, 2007. Evaluation of zebrafish *Danio rerio* as a model for enteric septicemia of catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19: 151-158.
- Piddock L.J.V., 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 382-402.
- Pirarat N., E.L. Ooi, K.D. Thompson, N.H. Thinh, M. Maita and T. Katagiri, 2016. Examination of entry portal and pathogenesis of *Edwardsiella ictaluri* infection in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture*, 464: 279-285.
- Ploy M.C., D. Chainier, N.H. Tran Thi, I. Poilane, P. Cruaud, F. Denis, A. Collignon and T. Lambert, 2003. Integron-associated antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar typhi from Asia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1427-1429.
- Plumb, J.A. and D.J. Sanchez, 1983. Susceptibility of five species of fish to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Disease*, 6: 261-266.
- Plumb, J.A. and S. Vinitnantharat, 1989. Biochemical, Biophysical, and Serological Homogeneity of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1: 51-56.
- Plumb, J.A. and V. Hilge, 1987. Susceptibility of European catfish (*Silurus glanis*) to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Applied Ichthyology*, 3: 45-48.
- Pollard, D.R., W.M. Johnson, H. Lior, S.D. Tyler and K.R. Rozee, 1990. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2477-2481.
- Prescott, J.F., J.D. Baggot and R.D. Walker, 2000. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Iowa State University Press/Ames. 795 pp.
- Pridgeon J.W. and P.H. Klesius, 2011. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94: 249-253.
- Pridgeon J.W., P.H. Klesius, G.A. Lewbart, H.V. Daniels and M. Jacob, 2014. *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) are virulent to channel catfish and Nile tilapia. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2: 337-343.
- Pridgeon W.J., P.H. Klesius, L. Song, D. Zhang, K. Kojima and J.A. Mobley, 2013. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. *Veterinary Microbiology*, 164: 336-343.
- Phạm Minh Đức, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên và Đặng Thụy Mai Thy, 2013. Nghiên cứu vi nấm bậc cao *Fusarium* sp. nhiễm trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thương phẩm. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 15: 74-79.
- Phạm Thanh Hương, 2010. Nghiên cứu sự kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng Sông Cửu Long. Luận văn tốt nghiệp cao học ngành Nuôi trồng Thủy sản. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Phạm Thanh Hương, Nguyễn Thiện Nam, Từ Thanh Dung và Nguyễn Anh Tuấn, 2010. Sự kháng kháng sinh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. Kỷ yếu Hội nghị khoa học Thủy sản, trường Đại học cần Thơ, lần 4: 250-261.
- Phan, L.T., B.M. Tam, N.T.T. Thuy, G.J. Gooley, B.A. Ingram, N.V. Hao, N.T. Phuong and S.S. De Silva, 2009. Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture*, 296: 227-236.

- Phu T.M., N.T. Phuong, T.T. Dung, D.M. Hai, V.N. Son, A. Rico, J.H. Clausen, H. Madsen, F. Murray and A. Dalsgaard, 2015. An evaluation of fish health-management practices and occupational health hazards associated with *Pangasius catfish* (*Pangasianodon hypophthalmus*) aquaculture in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture Research*, 47: 2778–2794.
- Phuong, N.T. and D.T.H. Oanh, 2010. Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) aquaculture in Viet Nam: an unprecedented development within a decade. In: De Silva S.S. and F.B. Davy (eds). *Success Stories in Asian Aquaculture*, Springer-IDRC-NACA, Amsterdam, pp. 133–150.
- Rådström, P., O. Sköld, G. Swedberg, J. Flensburg, P.H. Roy and L. Sundström, 1994. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *Journal of Bacteriology*, 176: 3257-3268.
- Rahman, M.H., S. Suzuki and K. Kawai, 2001. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. *Journal Applied Ichthyology*, 17: 282-285.
- Rajpara N., B.M.R.N.S. Kutar, R. Sinha, D. Nag, H. Koley, T. Ramamurthy and A.K. Bhardwaj, 2015. Role of integrons, plasmids and SXT elements in multidrug resistance of *Vibrio cholerae* and *Providencia vermicola* obtained from a clinical isolate of diarrhea. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-11.
- Ran, C., A. Carrias, M.A. Williams, N. Capps, B.C.T. Dan, J.C. Newton, W. Kloepper, E.L. Ooi, C.L. Browdy, J.S. Terhune and M.R. Lile, 2012. Identification of *Bacillus* Strains for Biological Control of Catfish Pathogens. *PLoS ONE*, 7: e45793.
- Recchia, G.D. and R.M. Hall, 1995. Gen cassettes: A new class of mobile element. *Microbiology*, 141: 3015-3027.
- Reed, L.J. and H. Muench, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoint. *American Journal of Hygiene*, 27: 493-497.
- Reger, P.J., D.F. Mockler and M.A. Miller, 1993. Comparison of antimicrobial susceptibility beta-lactamase production, plasmid analysis and serum bactericidal activity in *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella hoshinae*. *Journal of Medical Microbiology*, 39: 273-281.
- Reid, W.S. and J.A. Boyle, 1989. Plasmid homologies in *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 3253-3255.
- Rigos G., I. Nengasa, M. Alexis and G.M. Troisi, 2004. Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology*, 69: 281-288.
- Robert, R.J., 1989. Fish pathology. Institute of Aquaculture, University of Stirling. Bailliere Tindall, London. 318 pp.
- Roberts M.C., S. Schwarz and H.J.M. Aarts, 2012. Erratum: acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 3: 384.
- Roberts R.J., 1993. Motile aeromonad septicaemia. In: V. Inglis, R.J. Roberts and N.R. Bromage (Editors). *Bacterial Diseases of Fish*. John Wiley and Sons, New York, 143-156.
- Roberts, M.C., 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. *FEMS Microbial Reviews*, 19: 1-24.
- Roberts, M.C., 2003. Tetracycline therapy: update. *Clinical Infectious Diseases*, 36: 462-467.
- Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance gene. *FEMS Microbial Letters*, 245: 195-203.
- Rodriguez I., M.R. Rodicio, M.C. Mendoza and M.C. Martin, 2006. Large conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 1603-1607.
- Ross, J.I., E.A. Eady, J.H. Cove and W.J. Cunliffe, 1998. 16S rRNA Mutation Associated with Tetracycline Resistance in a Gram-positive Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 1702-1705.

- Rowe-Magnus, D.A. and D. Mazel, 1999. Resistance gene capture. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 483-488.
- Rowe-Magnus, D.A., A.M. Guerout and D. Mazel, 2002. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gen cassettes. *Molecular Microbiology*, 43: 1657-1679.
- Ryu S.H., S.G. Park, S.M. Choi, Y.O. Hwang, H.J. Ham, S.U. Kim, Y.K. Lee, M.S. Kim, G.Y. Park, K.S. Kim and Y.Z. Chae, 2012. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 152:14-18.
- Saenz Y., L. Brinas, E. Dominguez, J. Ruiz, M. Zarazaga, J. Vila and C. Torres, 2004. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 48: 3996-4001.
- Saenz Y., L. Vinue, E. Ruiz, S. Somalo, S. Martinez, B. Rojo-Bezares, M. Zarazaga and C. Torres, 2010. Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary Microbiology*, 144: 493-497.
- Saitanu, K., A. Chongthaleong, M. Endo, T. Umeda, K. Takami, T. Aoki and T. Kitao, 1994. Antimicrobial susceptibilities and detection of transferable R-Plasmids from *Aeromonas hydrophila* in Thailand. *Asian Fisheries Science*, 7: 41-46.
- Sakai, T., K. Yuasa, M. Sano and T. Iida, 2009. Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by Species-Specific Polymerase Chain Reaction Targeted to the Upstream Region of the Fimbrial Gene. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 124-132.
- Sakai, T., T. Kamaishi, M. Sano, K. Tencha, T. Arima, Y. Iida, T. Nagai, T. Nakai and T. Iida, 2008. Outbreaks of *Edwardsiella ictaluri* infection in ayu *Plecoglossus altivelis* in Japanese Rivers. *Fish Pathology*, 43: 152-157.
- Sakazaki, R., 2001. Genus *Edwardsiella*. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G.M. Garrity (editors). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, volume 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Samuel, L., M.M. Marian, K. Apun, M.B. Lesley and R. Son, 2011. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cultured catfish by antibiotic resistance and RAPD analysis. *International Food Research Journal*, 18: 971-976.
- Sarkar M.J.A. and M.M. Rashid, 2012. Pathogenicity of the bacterial isolate *Aeromonas hydrophila* to catfishes, carps and perch. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 10: 157-161.
- Sarria-Guzmán, Y., M.P. López-Ramírez, Y. Chávez-Romero, E. Ruiz-Romero, L. Dendooven and J.M. Bello-López, 2014. Identification of antibiotic resistance cassettes in class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.). *Current Microbiology*, 5: 581-586.
- Sarter, S., H.N.K. Nguyen, L.T. Hung, J. Lazard and D. Montet, 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18: 1391-1396.
- Sautour, M., P. Mary, N.E. Chihib and J.P. Hornez, 2003. The effects of temperature, water activity and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila* and on its subsequent survival in microcosm water. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 807-813.
- Schmidt A.S., M.S. Bruuna, J.L. Larsena and I. Dalsgaard, 2001b. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 735-743.
- Schmidt, A.S., M.S. Bruun, I. Dalsgaard and J.L. Larsen., 2001a. Incidence, distribution and spread of tetracycline resistance determinants and integron associated antibiotic resistance genes motile *Aeromonads* from a fish farming environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5675-5682.
- Schmidt, A.S., M.S. Bruun, I. Dalsgaard, K. Pedersone and J.L. Larsen, 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4908-4915.

- Schwarz, S., C. Kehrenberg and T.R. Walsh, 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17: 431-437.
- Schwarz, S., C. Kehrenberg, B. Doublet and A. Cloeckaert, 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 519-542.
- Schwarz, S., C. Werckenthin and C. Kehrenberg, 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 2530-2533.
- Serrano, P.H., 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Food and Agriculture. Organization of the United Nations.
- Sha J., E.V. Kozlova and A.K. Chopra, 2002. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infection and Immunity*, 70: 1924-1935.
- Shah S.Q.A., F.C. Cabello, T.M. L'Abée-Lund, A. Tomova, H.P. Godfrey, A.H. Buschmann and H. Sørum, 2014. Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology*, 16: 1310-1320.
- Shaheen B.W., O.A. Oyarzabal and D.M. Boothe, 2010. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US. *Veterinary Microbiology*, 144: 363-370.
- Sharma I. and A. Kumar, 2012. Distribution of Virulence Genes in *A. hydrophila* and *A. sobria* in *L. rohita* (Rohu Fish) in N.E. India. *Research Journal of Biotechnology*, 7: 205-207.
- Shetty, M., B. Maiti, M.N. Venugopal, I. Karunasagar and I. Karunasagar, 2014. First isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from diseased striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage). *Journal of Fish Diseases*, 37: 265-271.
- Shin H.W., J. Lim, S. Kim, J. Kim, G.C. Kwon and S.H. Koo, 2015. Characterization of Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance Genes and Their Relatedness to Class 1 Integron and Insertion Sequence Common Region in Gram-Negative Bacilli. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 137-142.
- Shoemaker, C.A., P.H. Klesius, C.R. Arias and J.J. Evans, 2009. Uses of modified live vaccines in the aquaculture. *Journal of the World Aquaculture of Society*, 40: 573-585.
- Shome R., B.R. Shome, K.K. Gaur and S. Senani, 2001. Plasmids of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fishes. *Indian Journal of Fish*, 48: 109-110.
- Shotts, E.B. and W.D. Waltman, 1990. A medium for the selective isolation of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Wildlife Diseases*, 26: 214-218.
- Shotts, E.B., V.S. Blazer and W.D. Waltman, 1986. Pathogenesis of experimental infections in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43: 36-42.
- Singer, R.S., S.K. Patterson, A.E. Meier, J.K. Gibson, H.L. Lee, and C.W. Maddox, 2004. Relationship between phenotypic and genotypic florfenicol resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4047-4049.
- Singh V., G. Rathore, D. Kapoor, B.N. Mishra and W.S. Lakra, 2008. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. *Indian Journal of Microbiology*, 48: 453-458.
- Sirirat, P., J. Chanphong, K. Thompson, S. Chinabut and A. Adams, 1999. Characterisation of *Aeromonas hydrophila* Extracellular Products with Reference to Toxicity, Virulence, Protein Profiles and Antigenicity. *Asian Fisheries Science*, 12: 371-379.
- Smith, P., 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 27: 243-264.
- Smith, P., M. Hiney and O. Samuelson, 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*, 4: 273-313.

- Snary, E.L., L.A. Kelly, H.C. Davison, C.J. Teale and M. Wooldridge, 2004. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 906-917.
- Soliman, M.K., R.H. Khalil, T.T. Saad, M.H.L. El-Gamal and A.E. Gebriil, 2010. Isolation and Identification of *E. coli* from Cultured Freshwater Fish. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 5: 19-34.
- Son R., G. Rusul , A.M. Sahilah, A. Zainuri, A.R. Raha and I. Salmah, 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, Tilapia (*Telapia mossambica*). *Letters in Applied Microbiology*, 24: 479-482.
- Sorum H. and M. Sunde, 2001. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32: 227-241.
- Sørum H. and T.M. L'Abée-Lund, 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria-a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 43-56.
- Sorum, H., M.C. Roberts and J.H. Crosa, 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 611-615.
- Sørum, H., T.M. L'Abée-Lund, A. Solberg and A. Wold, 2003. Integron-Containing IncU R Plasmids pRAS1 and pAr-32 from the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1285-1290.
- Soto, E., M. Griffin, M. Arauz, A. Riofrio, A. Martinez and M.E. Cabrejos, 2012. *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 24: 81-90.
- Soufi, L., Y. Sáenz, L. Vinué, M.S. Abbassi, E. Ruiz, M. Zarazaga, A. Ben Hassen, S. Hammami and C. Torres, 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 497-502.
- Speer, B.S., N.B. Shoemaker and A.A. Salyers, 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5: 387-399.
- Speyerer, P.D. and J.A. Boyle, 1987. The plasmid profile of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases*, 10: 461-469.
- Stanley L.A., J.S. Hudson, T.E. Schwedler and S.S. Hayasaka, 1994. Extracellular products associated with virulent and avirulent strains of *Edwardsiella ictaluri* from channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 36-43.
- Stanton, T.B. and S.B. Humphrey, 2003. Isolation of tetracycline-resistant *Megaspaera elsdonii* strains with novel mosaic gene combination of *Tet(O)* and *Tet(W)*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3874-3882.
- Starliper, C.E., R.K. Cooper, E.B. Shotts and P.W. Taylor, 1993. Plasmid-mediated romet resistance of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5: 1-8.
- Stavev, D., I. Vashin and H. Daskalov, 2013. Antibiotic resistance of  $\beta$ -Haemolytic *Aeromonas hydrophila* strains isolated from Rainbow Trouts (*Oncorhynchus Mykiss*). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 4: 289-296.
- Stock, I. and B. Wiedemann, 2001. Natural antibiotic susceptibilities of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* and *E. Hoshinae*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 45: 2245-2255.
- Stokes, H.W. and M.R. Gillings, 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35: 790-819.
- Stokes, H.W. and R.M. Hall, 1989. A novel family of potentially mobile ADN elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 3: 1669-1683.
- Stuart, B.L., 2005. Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1446-1450.

- Stratev, D., I. Vashin and H. Daskalov, 2013. Antimicrobial resistance of B-haemolytic *Aeromonas hydrophila* strains isolated from rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 16: 289-296.
- Su, H.C., G.G. Ying, R. Tao, R.Q. Zhang, L.R. Fogarty and D.W. Kolpin, 2011. Occurrence of antibiotic resistance and characterization of resistance genes and integrons in Enterobacteriaceae isolated from integrated fish farms in south China. *Journal of Environmental Monitoring*, 13: 3229-3236.
- Suanyuk N., M. Rogge, R. Thune, M. Watthanaphiromsakul, N. Champhat and W. Wiangkum, 2014. Mortality and pathology of hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther) x *Clarias gariepinus* (Burchell), associated with *Edwardsiella ictaluri* infection in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 37: 385-395.
- Sun J., M. Zhou, Q. Wu and Y. Ni, 2010. Characterization of two novel gene cassettes, *dfrA27* and *aadA16*, in a non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolate from China. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 1125-1129.
- Sun, K., H.L. Wang, M. Zhang, Z.Z. Xiao and L. Sun, 2009. Genetic mechanisms of multi-antimicrobial 255 resistance in a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain. *Aquaculture*, 289: 134-139.
- Sunde M., 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 1019-1024.
- Svendsen Y.S., R.A. Dalmo and J. Bogwald, 1999. Tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following experimental challenge. *Journal of Fish Diseases*, 22: 125-131.
- Sykes R., 2010. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 1842-1852.
- Tajbakhsh E., F. Khamesipour, R. Ranjbar and I.C. Ugwu, 2015. Prevalence of class 1 and 2 integrons in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from aquaculture water in Chaharmahal Va Bakhtiari province, Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14: 37.
- Tchuinte S.P.L., T. Stalder, S. Venditti, A. Ngandjio, C. Dagot, M.C. Ploy and O. Barraud, 2016. Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48:431-434
- Tendencia, E.A. and L.D. de la Peña, 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 195: 193-204.
- Tenover, F.C, 2006. Mechanism of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119: S3-S10.
- Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 493-499.
- Tipmongkolsilp N., C.S. del Castillo, J. Hikima, T. Jung, H. Kondo, I. Hirono and T. Aoki, 2012. Multiple drug-resistant strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from Tilapia farms in Thailand. *Fish Pathology*, 47: 56-63.
- Türe M. and H. Alp, 2016. Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, 60: 141-146.
- Từ Thanh Dung, 2011. Vaccine ALPHAJECT® *Panga 1* phòng bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) trong ao nuôi thương phẩm. Báo cáo thực nghiệm (CAT 002.09 FT (PHARMAQ AS).
- Từ Thanh Dung, Đặng Thị Hoàng Oanh và Phạm Minh Đức, 2015. Bệnh và quản lý dịch bệnh trong nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Trong: Nguyễn Thanh Phương và Nguyễn Anh Tuấn (chủ biên). Nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long: Thành công và thách thức trong phát triển bền vững. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. Trang 156-189.

- Từ Thanh Dung, F. Haesebrouck, Nguyễn Anh Tuấn, P. Sorgeloos, M. Baele và A. Decostere, 2010. Hiện tượng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 15a: 162-171.
- Từ Thanh Dung, M. Crumlish, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Quốc Thịnh và Đặng Thụy Mai Thy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 137-142.
- Từ Thanh Dung, Nguyễn Thị Tiên và Nguyễn Anh Tuấn, 2012. Nghiên cứu tác nhân gây bệnh trắng đuôi trên cá tra và giải pháp điều trị. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 22c: 136-145.
- Thune R.L., D.H. Fernandez, J.L. Benoit, M. Kelly-Smith, M.L. Rogge, N.J. Booth, C.A. Landry and R.A. Bologna, 2007. Signature-tagged mutagenesis of *Edwardsiella ictaluri* identifies virulence-related genes, including a salmonella pathogenicity island 2 class of type III secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7934-46.
- Trần Nguyễn Diễm Tú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Chuẩn hóa quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* và *Flavobacterium columnare* từ máu cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 21b: 179-187.
- Trần Thị Mỹ Hân, 2013. Xác định một số mầm bệnh vi khuẩn gây bệnh trên cá thát lát còm (*Chitala Chitala* Hamilton, 1822). Luận văn tốt nghiệp cao học ngành Nuôi trồng Thủy sản. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Trần Thị Ngọc Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic từ ruột một số loài cá da trơn có tiềm năng sử dụng làm probiotic. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 44: 76-85.
- Trần Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Trung và Trương Nam Hải, 2011. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá tra Việt Nam bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, số 9: 61-65.
- Tremblay C.L., A. Letellier, S. Quessy, M. Boulianne, D. Daignault and M. Archambault, 2011. Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of *tetO* and *ermB* Genes. *Journal of Food Protection*, 74: 1639-1648.
- Treves-Brown, K.M., 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic publishers. 309 pp.
- Trương Quốc Phú và Trần Kim Tính, 2012. Thành phần hóa học bùn đáy ao nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) thâm canh. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22a: 290-299.
- Umesha D., R.P. Srinivasa, K.P. Prasad, A.K. Reddy and K.N. Srinivas, 2011. Aerolysin and Hemolysin Virulence Genes of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Diseased Ornamental Freshwater Oscarfish and Goldfish by Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Advances in Science and Technology*, 3: 82-89.
- Vadivelu, J., S.D. Puthuchery, M. Phipps and Y.W. Chee. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Medical Microbiology*, 42: 171-174.
- van Elsas J.D. and M.J. Bailey, 2002. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, 42: 187-197.
- van Essen-Zandbergen A., H. Smith, K. Veldman and D. Mevius, 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 746-750.
- van Hoek, A.H.A.M., D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A.P. Roberts and H.J.M. Aarts, 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 2: 203.
- Van Meervenne E., E.V. Coillie, F.M. Kerckhof, F.D., L. Herman, L.S.P. De Gelder, E.M. Top and N. Boon, 2012. Strain-Specific Transfer of Antibiotic Resistance from an



- Environmental Plasmid to Foodborne Pathogens. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 834598.
- Van P.T., 2005. Current status of aquatic veterinary drugs usage for usage in aquaculture in Vietnam. In: Antibiotic resistance in Asian aquaculture environments. *Proceedings of the international workshop*. Chiang Mai, Thailand.
- Van, T.T.H., G. Moutafis, L.T. Tran and P.J. Coloe, 2007. Antibiotic resistance in food-borne bacterial contaminants in Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7906-7911.
- Van, T.T.H., J. Chin, T. Chapman, L.T. Tran and P.J. Coloe, 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal Food Microbiology*, 124: 217-223.
- Vasilakopoulou, A., M. Psychogiou, L. Tzouveleki, P.T. Tassios, C. Kosmidis, G. Petrikos, E.S. Roma, E. Charvalos, M. Passiotou, A. Avlami and G.L. Daikos, 2009. Prevalence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* of poultry and human origin. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 1211-1218.
- Vega-Sanchez V., F. Latif-Eugenin, E. Soriano-Vargas, R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras, Ma.G. Aguilera-Arreola and G. Castro-Escarpulli, 2014. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and b-lactamase genes. *Veterinary Microbiology*, 172: 528-533.
- Vinué, L., Y. Sáenz, S. Somalo, E. Escudero, M.A. Moreno, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres, 2008. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 934-937.
- Vinué L., Y. Sáenz, B. Rojo-Bezares, I. Olarte, E. Undabeitia, S. Somaloa, M. Zarazaga and C. Torres, 2010. Genetic environment of sul genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35: 492-496.
- Vivas, J., B. Carracedo, J. Riano, B.E. Razquin, P. Lopez-Fierro, F. Acosta, G. Naharro, and A.J. Villena, 2004. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2702-2708.
- Vivekanandhan, G., K. Savithamani, A.A.M. Hatha and P. Lakshmanaperumalsamy, 2002. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 165-168.
- Vũ Đăng Hạ Quyên, Đặng Thúy Bình, Đào Thị Hàn Ly và Phạm Thị Diệu Anh, 2014. Nghiên cứu thành phần ký sinh trùng trên cá tra *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878 bằng phương pháp hình thái và di truyền. *Tạp chí Sinh học*, số 36: 138-144.
- Wagner, B.A., D.J. Wise, L.H. Khoo and J. Terhune, 2002. The epidemiology of bacterial disease in food-size channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14: 263-272.
- Walsh, C., 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press.
- Waltman W.D., E.B. Shotts and V.S. Blazer, 1985. Recovery of *Edwardsiella ictaluri* from Danio, *Danio devario*. *Aquaculture*, 46: 63-66.
- Waltman, W.D. and E.B. Shotts, 1986. Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Wildlife Diseases*, 22: 173-177.
- Waltman, W.D., E.B. Shotts and T.C. Hsu, 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 101-104.
- Waters, V.L., 1999. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers in Bioscience*, 4: 416-439.
- Wegener, H.C., 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 439-445.
- Wei Q., X. Jiang, Z. Yang, N. Chen, X. Chen, G. Li and Y. Lu, 2009. *dfra27*, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 405-419.

- Wei, S.L., N. Musa, C.T. Seng, N.A.M. Shazili, W. Wee, N. Musa and M.E.A. Wahid, 2011. Antibiogram and plasmid profiling from *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fish in East cost Malaysia. *Journal of sustainability science and management*, 6: 19-27.
- Welch, T.J., J. Evenhuis, D.G. White, P.E. McDermott, H. Harbottle, R.A. Miller, M. Griffin and D. Wise, 2009. IncA/C-plasmid-mediated florfenicol resistance in the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 845-846.
- Wen-Chen, K., W. Hsiu-Mei, C. Tsung-Chain, Y. Jing-Jou and W. Jiunn-Jong, 1998. Inducible beta-lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: Therapeutic Challenge for Antimicrobial Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 3188-3192.
- White P.A., Christopher J. McIver, Yi-Mo Deng, William D. Rawlinson, 2000. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 265-269.
- White, D.G., C. Hudson, J.J. Maurer, S. Ayers, S. Zhao, M.D. Lee, L. Bolton, T. Foley and J. Sherwood, 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 4593-4598.
- White, P.A., C.J. McIver and W.D. Rawlinson, 2001. Integrons and gen cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2658-2661.
- Williams M.L. and M.L. Lawrence, 2005. Identification and characterization of a two-component hemolysin from *Edwardsiella ictaluri*. *Veterinary Microbiology*, 108: 281-289.
- Williams, M.L., and M.L. Lawrence, 2010. Verification of an *Edwardsiella ictaluri*-specific diagnostic PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 153-157.
- Wise, D.J., T.E. Schwedler and D.L. Otis, 1993. Effects of stress on susceptibility of naive channel catfish in immersion challenge with *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5: 92-97.
- Xu H., K. Broersma, V. Miao and J. Davies, 2011. Class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant gram-negative bacteria isolated from the Salmon River, British Columbia. *Canadian Journal of Microbiology*, 57: 460-467.
- Yamada, Y. and H. Wakabayashi, 1999. Identification of fish-pathogenic strains belonging to the genus *Edwardsiella* by sequence analysis of *sodB*. *Fish Pathology*, 34: 145-150.
- Yan H., L. Li, M. Zong, M.J. Alam, S. Shinoda and L. Shi, 2010. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in clinical bacteria isolates from patients in South China. *Journal of Health Science*, 56: 442-450.
- Yanong, R.P.E., 2003. Fungal diseases of fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practic*, 6: 377-400.
- Yang, H., O.A. Byelashov, I. Geornaras, L.D. Goodridge, K.K. Nightingale, K.E. Belk, G.C. Smith, and J.N. Sofos, 2010. Characterization and transferability of class 1 integrons in commensal bacteria isolated from farm and nonfarm environments. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12: 1441-1451.
- Yang, W., I.F. Moore, K.P. Koteva, D.C. Bareich, D.W. Hughes and G.D. Wright, 2004. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 52346-52352.
- Ye, S., H. Li, G. Qiao and Z. Li, 2009. First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 292: 6-10.
- Yi, G., W. Kaiyu, C. Defang, F. Fanling and H. Yidan, 2010. Isolation and Characterization of *Edwardsiella ictaluri* from Cultured Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 62: 105-115.
- Yoo M.H., M.D. Huh, E. Kim, H.H. Lee and H.D. Jeong, 2003. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments. *Aquaculture*, 217: 11-21.
- Younes A.M., A.Y. Gaafar and E.S. Awad, 2015. Virulence Determinants and Plasmid Profile of *Aeromonas hydrophila* Strains Isolated from *Oreochromis niloticus*. *Global Veterinaria*, 15: 613-617.

- Yuasa, K., E.B. Kholidin, N. Panigoro and K. Haiti, 2003. First isolation of *Edwardsiella ictaluri* from cultured striped catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathology*, 38: 181-183.
- Yucel, N., B. Erdem and D. Kaya, 2005. Some virulence properties and characterization of motile *Aeromonas* species from milk and white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 58: 106-110.
- Yuting Deng, Yali Wu, Lan Jiang, Aiping Tan, Ruiquan Zhang and Li Luo, 2016. Multi-Drug Resistance Mediated by Class 1 Integrons in *Aeromonas* Isolated from Farmed Freshwater Animals. *Frontiers in Microbiology*, 7: 935.
- Zakeri, B. and G.D. Wright, 2008. Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochemistry and Cell Biology*, 86: 124-136.
- Zaky M.M.M., F.A. Mansour and K.M.Persson, 2010. Factors influencing multi-drug resistant and plasmid DNA harbouring *Aeromonas hydrophila* isolated from Lake Manzala, Egypt. *Journal of Bacteriology Research*, 2: 30-40.
- Zhang D., D.H. Xu and C. Shoemaker, 2016. Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports*, 3: 18-23.
- Zheng W., H. Cao and X. Yang, 2012. Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) infected with multiple strains of *Aeromonas hydrophila*. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 4512-4520.
- Zhu D.L., A.H. Li, J.G. Wang, M. Li, T.Z. Cai and J. Hu, 2006. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 45: 82-85.
- Zhu J.Y. G.C. Duan, H.Y. Yang, Q.T. Fan and Y.L. Xi, 2011. Atypical Class 1 Integron Coexists with Class 1 and Class 2 Integrons in Multi-Drug Resistant *Shigella flexneri* Isolates from China. *Current Microbiology*, 62: 802-806.
- Zinnah, M.A, M.R. Bari, M.T. Islam, M.T. Hossain, M.T. Rahman, M.H. Haque, S.A.M. Babu, R.P. Ruma and M.A. Islam, 2007. Characterization of *Escherichia coli* isolated from samples of different biological and environmental sources. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 5: 25-32.

#### **Các trang web**

- <http://faculty.washington.edu.marilynr/> (accessed on 10/5/2013).
- [www.antibiotics-info.org/tetracycline.html](http://www.antibiotics-info.org/tetracycline.html) (accessed on 15/6/2013).
- <http://www.bacterio.net> (accessed on 25/8/2016).
- [www.vietfish.org](http://www.vietfish.org) (truy cập ngày 28/5/2013).

## PHỤ LỤC

### PHỤ LỤC A: THÀNH PHẦN VÀ CÁCH CHUẨN BỊ CÁC DUNG DỊCH THÍ NGHIỆM

#### A1. Thành phần và cách chuẩn bị dung dịch nhuộm Gram

##### \* Dung dịch 1:

- |                    |       |
|--------------------|-------|
| - Crystal violet   | 2 g   |
| - Ethanol (95%)    | 20 mL |
| - Ammonium oxalate | 0,8 g |
| - Nước cất         | 80 mL |
- Hoà tan crystal violet trong ethanol, ammonium oxalate trong nước cất.
  - Trộn 2 dung dịch lại, để yên sau 24 giờ, sau đó tiến hành lọc.

##### \* Dung dịch 2:

- |                    |        |
|--------------------|--------|
| - Iodine           | 1 g    |
| - Potassium iodide | 2 g    |
| - Nước cất         | 300 mL |
- Hoà tan potassium iodide trong 20 mL nước cất. Cho thêm iodine vào để yên qua đêm. Sau đó cho thêm thể tích nước còn lại.

##### \* Dung dịch 3:

- Pha dung dịch theo tỷ lệ 95% ethanol : 5% acetone.

##### \* Dung dịch 4:

- |                 |        |
|-----------------|--------|
| - Safranin      | 0,25 g |
| - Ethanol (95%) | 10 mL  |
| - Nước cất      | 90 mL  |
- Hoà tan safranin trong ethanol, sau đó cho lượng nước cất vào.

#### A2. Thành phần và cách chuẩn bị dung dịch nhuộm Wright-Giemsa

- Dung dịch Wright: hòa tan 1g Wright trong 600 mL methanol, khuấy liên tục trong đêm.

- Dung dịch Giemsa: hòa tan 3,8 g Giemsa trong 25 mL glycerol và ủ ở 60° trong 2 giờ. Sau đó cho thêm vào 75 mL methanol. Dung dịch nhuộm sẽ được pha loãng từ dung dịch gốc 10 lần bằng nước cất.

- Dung dịch pH 6,5: hòa tan 27,6 g monobasic sodium phosphate trong 1000 mL nước cất. Hòa tan 53,6 g dibasic sodium phosphate trong 1000 mL nước cất. Tiến hành pha loãng 68 mL dung dịch 6 g monobasic sodium phosphate với 32 mL dung dịch dibasic sodium phosphate.

- Dung dịch pH 6,2: hòa tan 19,212 g acid citric trong 1000 mL nước cất. Hòa tan 53,628 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  trong 100 mL nước cất. Trộn 6,78 mL dung dịch đầu với 13,22 mL của dung dịch sau.

#### A3. Thành phần và cách chuẩn bị dung dịch cố định và nhuộm mẫu mô

##### \* Dung dịch formol trung tính NBF:

- |                             |        |
|-----------------------------|--------|
| - Formol                    | 100 mL |
| - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ | 4 g    |
| - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ | 6,5 g  |
| - Nước cất                  | 900 mL |

##### \* Dung dịch cố định Bouin's

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| - Acid picric quá bão hòa | 750 mL |
| - Formol                  | 125 mL |
| - Glacial acetic acid     | 50 mL  |

##### \* Harris's haematoxyline

- |                 |     |
|-----------------|-----|
| - Haematoxyline | 5 g |
|-----------------|-----|

- 100% alcohol 50 mL
- Potassium alum 50 g
- Nước cất 1 L
- Mercuric oxide 2,5 g
- Glacial acetic acid 40 mL

**\* Eosin/ Phloxine**

- Stock Eosin (1% Eosin Y trong nước) 100 mL
- Stock Phloxine (1% Phloxine B trong nước) 10 mL
- 95% ethanol 780 mL
- Glacial acetic acid 4 mL

**\* Acid/Alcohol**

- Alcohol 70% 990 mL
- Hydrochloric acid 10 mL

**\* 2% Potassium acetate**

- Potassium acetate 20 g
- Nước cất 1 L

**PHỤ LỤC B: THÔNG TIN MẪU CÁ TRA BỆNH THU THẬP Ở 1 SỐ TỈNH ĐBSCL DÙNG ĐỂ PHÂN LẬP VI KHUẨN *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

TT	Địa điểm thu mẫu	Thời gian	Số ao	Số mẫu cá tra nhiễm bệnh (con)		
				GTM	XH	GTM+XH
1	Đồng Tháp*	2013-2014	10	17	13	7
2	An Giang	2013-2014	6	10	10	4
3	Tp. Cần Thơ	2013-2014	5	12	14	2
5	Vĩnh Long	2013-2014	7	11	15	3
5	Tiền Giang	2013-2014	7	12	15	10
6	Trà Vinh	2013-2014	7	14	15	6
7	Bến Tre	2013-2014	8	14	13	3
<b>Tổng cộng:</b>			<b>50</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>35</b>

\* Tỉnh thu mẫu cá và nước ao nuôi cá tra để phân lập vi khuẩn *E. coli* trong thí nghiệm tiếp hợp.

**PHỤ LỤC C: CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CÁC ĐẶC ĐIỂM SINH LÝ VÀ SINH HÓA CỦA VI KHUẨN**

**C1. Phương pháp nhuộm Gram vi khuẩn**

Chuẩn bị tiêu bản: Nhỏ một giọt nước cất lên lam kính, dùng que cấy nhặt một ít vi khuẩn trải đều lên giọt nước cất. Để khô ở nhiệt độ phòng sau đó hơi lướt lam trên ngọn lửa đèn cồn để cố định vi khuẩn trên lam.

**Các bước thực hiện:**

1. Nhỏ dung dịch Crystal violet (dung dịch I) lên lam. Để 1 phút.
2. Rửa bằng nước cho hết màu tím trên lam (khoảng 2 giây), để khô.
3. Nhỏ dung dịch Iodine (dung dịch II) lên lam, để khoảng 1 phút.
3. Lật nghiêng lam kính cho hết dung dịch Iodine trên lam.
4. Dùng dung dịch cồn: aceton (dung dịch III) để tẩy màu bằng cách nghiêng lam kính rồi nhỏ từ từ dung dịch III cho đến khi giọt nước cuối trên lam không còn màu tím. Rửa và để khô.
5. Nhỏ dung dịch Safranin (dung dịch IV) lên lam, để khoảng 2 phút. Rửa và để khô ở nhiệt độ phòng. Quan sát ở vật kính 100X.

**Đọc kết quả:**

Vi khuẩn Gram dương (G<sup>+</sup>) có màu tím xanh.

Vi khuẩn Gram âm (G<sup>-</sup>) có màu hồng đỏ.

## C2. Phương pháp kiểm tra tính di động của vi khuẩn

Sự di động của vi khuẩn có thể quan sát bằng phương pháp giọt treo ở vật kính 40X.

Các bước thực hiện như sau:

1. Cho vaseline lên 4 góc của lamelle và đặt ngửa lamelle trên bàn.
2. Cho một giọt nước lên lame.
3. Tiệt trùng que cấy, lấy một ít vi khuẩn cho lên lame hòa vào nước.
4. Dùng lame đặt nhẹ nhàng lên lamelle sao cho lame không chạm vào giọt nước chứa vi khuẩn.
5. Cẩn thận lật thật nhanh lame để giọt nước được treo ngược trên lamelle
6. Đặt lam lên kính hiển vi quan sát tính di động của vi khuẩn ở vật kính 40X.

## C3. Phương pháp kiểm tra các hoạt tính oxidase, catalase và phản ứng O/F

### \* Phản ứng Oxidase

- Chạm nhẹ que thử vào một khuẩn lạc trên đĩa agar.
- Quan sát que thử trong 30 giây và ghi nhận sự thay đổi màu sắc.
- Đọc kết quả: que thử chuyển màu xanh đậm cho phản ứng oxidase dương tính (+) và không chuyển màu âm tính (-).

### \* Phản ứng Catalase

- Nhỏ một giọt dung dịch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lên lame.
- Dùng que cấy tiệt trùng lấy một ít vi khuẩn cho vào dung dịch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Đọc kết quả: vi khuẩn cho phản ứng catalase dương tính (+) sẽ gây hiện tượng sủi bọt trong dung dịch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ngược lại, âm tính (-).

### \* Khả năng lên men và oxy hóa đường glucose (O-F test)

- Chuẩn bị 2 ống nghiệm chứa môi trường O-F đã tiệt trùng.
- Lấy một ít vi khuẩn trên đĩa agar và cấy thẳng vào 2 ống nghiệm.
- Phủ lên một trong 2 ống nghiệm dầu paraffin và để vào tủ ấm ở 28-30°C.
- Kiểm tra hằng ngày đến 7 ngày. So sánh màu của 2 ống nghiệm và ghi nhận kết quả như bảng dưới đây.
- Đọc kết quả:

Ống tiếp xúc với không khí	Ống phủ dầu paraffin	Kết quả
Xanh lá cây	Xanh lá cây	Không phản ứng với glucose
Xanh lơ ở phần trên	Xanh lá cây	Phản ứng kiềm tính
Vàng	Xanh lá cây	Phản ứng oxy hóa
Vàng	Vàng	Phản ứng lên men

## C4. Khả năng tan huyết (hemolytic activity) của vi khuẩn

- Cấy vi khuẩn lên môi trường BA (có bổ sung máu cừu), sau đó ủ trong thời gian từ 24-48 giờ tùy theo loài vi khuẩn ở 28-30°C. Tiến hành đọc kết quả như sau:
  - Tan huyết dạng  $\alpha$  (tan huyết không hoàn toàn): vi khuẩn làm thay đổi màu sắc môi trường nhưng tán huyết không đầy đủ hoặc tán huyết một phần.
  - Tan huyết dạng  $\beta$  (tan huyết hoàn toàn/đầy đủ): vi khuẩn làm xuất hiện 1 khu vực sáng trên môi trường.
  - Tan huyết dạng  $\gamma$ : vi khuẩn không gây ra hiện tượng tán huyết, môi trường hơi chuyển màu.

## C5. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E

- Cho một ít nước vào khay nhựa của bộ kit để giữ ẩm trong quá trình ủ vi khuẩn trong tủ ấm.
- Dùng que cấy lấy một ít khuẩn lạc cho vào 5 mL nước muối sinh lý (0,85% NaCl) hoặc nước cất đã tiệt trùng, lắc đều.
- Dùng pipet tiệt trùng hút vi khuẩn cho vào các giếng của bộ kit.
- Cho đầu khoáng vô trùng vào các giếng LDH, ODC, ADC, H<sub>2</sub>S và URE.

- Ủ trong tủ ấm trong 18-24 giờ ở 28 -30°C tùy theo loài vi khuẩn.
- Đọc kết quả: cho thuốc thử thích hợp vào các giếng và quan sát hiện tượng để xác định phản ứng dương tính hay âm tính theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- + Cho một giọt FeCl<sub>3</sub> vào giếng TDA.
- + Cho một giọt thuốc thử VP1, sau đó cho tiếp một giọt VP2 vào giếng VP.
- + Cho một giọt thuốc thử JAME vào giếng IND.

#### **CÁCH ĐỌC KẾT QUẢ KÍT API 20E**

Chỉ tiêu	Chất nền	Âm tính	Dương tính
ONPG	Ortho-nitrophenyl galactosidase	Không màu	Vàng
ADH	Arginine	Vàng	Đỏ/cam
LDC	Lysine	Vàng	Cam
ODC	Ornithine	Vàng	Đỏ
CIT	Sodium citrate	Vàng	Xanh/xanh lá
H <sub>2</sub> S	Sodium thiosulphate	Không màu	Đen
URE	Urea	Vàng	Đỏ/cam
TDA	Tryptophane	Vàng	Nâu sẫm
IND	Tryptophane	Vàng	Đỏ (2 phút)
VP	Sodium pyruvate	Không màu	Hồng/Đỏ (10 giây)
GEL	Gelatin	Kết tủa đen	Màu đen hòa tan
GLU	Glucose	Xanh/Xanh lá	Vàng
MAN	Mannitol	Xanh/ Xanh lá	Vàng
INO	Inositol	Xanh/Xanh lá	Vàng
SOR	Sorbitol	Xanh/Xanh lá	Vàng
RHA	Rhamnose	Xanh/Xanh lá	Vàng
SAC	Sucrose	Xanh/Xanh lá	Vàng
MEL	Melibiose	Xanh/Xanh lá	Vàng
AMY	Amygdalin	Xanh/Xanh lá	Vàng
ARA	Arabinose	Xanh/Xanh lá	Vàng

#### **PHỤ LỤC D: PHƯƠNG PHÁP TRÍCH ADN VI KHUẨN**

- Hút 2 mL dịch nuôi vi khuẩn từ ống nghiệm nuôi cấy cho vào ống eppendorf 2 mL.
- Ly tâm các ống eppendorf trên ở 13.000 vòng trong 5 phút. Sau đó loại bỏ phần nước.
- Hút 250 µL dung dịch TE pH = 8,0 cho vào các ống tuýp trên.
- Thêm tiếp vào 50 µL dung dịch SDS 10% để hòa tan ADN.
- Tiếp theo thêm 5 µL proteinase K (10 mg/mL) để tách protein khỏi ADN.
- Đem ủ ở 65°C trong 20 phút, 5 phút đảo ngược các ống tuýp 1 lần.
- Thêm vào 400 µL CTAB 10% 0,7M NaCl.
- Đem ủ ở 65°C trong 20 phút.
- Thêm vào 600 µL chloroform: isoamylalcohol để tủa protein và tạo màng ngăn giữa ADN và protein.
- Đem ly tâm ở 12.000 vòng trong 10 phút.
- Chuyển phần dịch trong phía trên sang các ống eppendorf 2 mL mới.
- Thêm vào 1 mL isopropanol để tủa ADN, trộn đều. Giữ ống eppendorf ở -20°C, ít nhất 30 phút.
- Sau đó ly tâm ở 13.000 vòng trong 10 phút và loại bỏ phần nước.
- ADN được rửa với 1 ml ethanol 70% (2 lần). Mỗi lần rửa sẽ đem ly tâm ở 12.000 vòng trong 5 phút.
- Đem ly tâm chân không trong 15 - 20 phút ở 4°C để loại bỏ hết ethanol.

- Hòa tan trong 100  $\mu$ L dung dịch đệm TE và trữ ADN ở  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

#### **PHỤ LỤC E: PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA KÝ SINH TRÙNG**

Đối với ngoại KST thì được thực hiện bằng cách dùng lame cao lấy nhót ở nhiều vị trí khác nhau trên cơ thể cá: da, vây,... Sau đó gạt nhẹ nhót cao được lên một lame khác, nhỏ lên đó 1 hoặc 2 giọt nước sạch rồi dàn mỏng lớp nhót trên lame, đặt lamelle lên và quan sát dưới kính hiển vi. Đối với nội KST bằng cách cao dịch nhầy trong ruột cá, ép tiêu bản tươi rồi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại thích hợp.

#### **PHỤ LỤC F: QUI TRÌNH TRÍCH ADN MẪU MÔ BẰNG BỘ KÍT DNEASY MINI SPIN COLUMN KIT**

Quy trình trích ADN từ mẫu mô cá bằng bộ kit DNeasy Mini spin column gồm các bước sau:

1. Cắt nhỏ khoảng 25 mg mẫu mô (10 mg mẫu thận), cho vào trong tube 1,5 mL. Cho vào tube 180  $\mu$ L dung dịch đệm ATL.

2. Thêm 20  $\mu$ L proteinase K. Trộn đều bằng vortex và ủ ở  $56^{\circ}\text{C}$  cho đến khi mẫu mô được phân giải hoàn toàn (chú ý vortex thường xuyên để mẫu được phân tán đều).

3. Thêm tiếp 200  $\mu$ L Buffer AL, trộn đều. Sau đó, thêm 200  $\mu$ L ethanol (96–100%) và trộn đều.

4. Chuyển hỗn hợp ở bước 3 vào DNeasy Mini spin column được đặt trên cột thu 2 ml (collection tube). Ly tâm  $\geq 6.000 \times g$  (8.000 rpm) khoảng 1 phút. Loại bỏ phần nước và tube thu.

5. Đặt DNeasy Mini spin column trên tube thu mới, thêm 500  $\mu$ L buffer AW1 và ly tâm khoảng 1 phút ở  $\geq 6.000 \times g$  (8.000 rpm). Loại bỏ phần nước và tube thu.

6. Đặt DNeasy Mini spin column trên tube thu mới, thêm 500  $\mu$ L buffer AW2 và ly tâm khoảng 1 phút ở  $20.000 \times g$  (14.000 rpm).

7. Đặt DNeasy Mini spin column trên tube 1,5 hay 2,0 mL và cho 200  $\mu$ L Buffer AE trực tiếp vào trong cột. Để ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, sau đó ly tâm khoảng 1 phút ở  $\geq 6.000 \times g$  (8.000 rpm).

#### **PHỤ LỤC G: PHƯƠNG PHÁP NHUỘM HEMATOXYLINE-EOSIN**

- Cố định mẫu trong dung dịch formol trung tính 10% trong 24 giờ, tiến hành rửa dưới vòi nước 2 giờ. Sau đó chuyển sang cồn 70% để bảo quản và xử lý mẫu.

- Cắt tĩa và định hướng mẫu cho mẫu đạt kích cỡ phù hợp. Sau đó, đưa mẫu vào catsset và tiến hành xử lý.

- Qui trình xử lý: qui trình xử lý mẫu được thực hiện trên máy Tissue processing Microm STP 120 gồm các giai đoạn: loại nước, làm trong mẫu và tẩm paraffin. Quá trình loại nước được thực hiện bằng cách cho mẫu qua nhiều dung dịch cồn với nồng độ gia tăng từ 70% đến 100%. Thời gian khử nước phụ thuộc vào độ dày của mẫu mô. Làm ngấm vào trong mẫu mô trong dung môi trung gian (xylen) có thể hòa tan được cồn và paraffin. Sau khi làm trong, mẫu mô sẽ được ngấm paraffin nóng chảy ( $57-60^{\circ}\text{C}$ ).

- Đúc khối: mục đích của việc đúc khuôn là làm cho mẫu mô nằm trong khối rắn để cắt lát mỏng.

- Cắt và dán mẫu lên lame: sử dụng máy microtome để cắt mẫu, lát cắt có độ dày từ 4-6  $\mu\text{m}$ .

- Nhuộm mẫu (Harris's Haematoxylin&Eosin).

- Dán lamelle vào lame: để đảm bảo mẫu được giữ lâu và tăng tính chiết quang của mẫu, dùng keo Enterlan phủ lên mẫu và dán lamelle lên mẫu. Nhỏ một giọt keo lên mẫu, đặt lamelle nghiêng  $45^{\circ}$  và tiếp xúc với giọt keo, hạ lamelle xuống từ từ để tránh bọt khí.

- Đọc kết quả: tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10X để quan sát tổng quát tiêu bản nếu tiêu bản đẹp đạt yêu cầu có nhân bắt màu tím xanh của Hematoxylin, phần còn lại bắt màu hồng Eosin. Các tiêu bản đẹp sẽ được quan sát lần lượt ở độ phóng đại 40X và 100X (nhỏ giọt dầu) và chụp hình tiêu bản đặc trưng.



**PHỤ LỤC H: TIÊU CHUẨN SO SÁNH KẾT QUẢ ĐƯỜNG KÍNH VÔ KHUẨN VỚI CLSI, 2012**

Tên kháng sinh	Hàm lượng ( $\mu\text{g}$ )	Chuẩn đường kính vô trùng (mm)		
		Kháng (R)	Trung bình (I)	Nhạy (S)
<b>Nhóm <math>\beta</math>- Lactam</b>				
Amoxicillin	10	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$
Ampicillin	10	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$
Cefotaxime	30	$\leq 22$	23-25	$\geq 26$
Cefalexin	30	$\leq 16$	17-19	$\geq 20$
<b>Nhóm fenicol</b>				
Chloramphenicol	30	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$
Florfenicol	30	$\leq 16$	17-19	$\geq 20$
<b>Nhóm quinolone</b>				
Ciprofloxacin	5	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$
Enrofloxacin	5	$\leq 16$	17-22	$\geq 23$
Norfloxacin	5	$\leq 12$	13-16	$\geq 17$
<b>Nhóm tetracycline</b>				
Doxycycline	30	$\leq 12$	13-15	$\geq 16$
Tetracycline	30	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$
<b>Nhóm aminoglycoside</b>				
Gentamycin	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
Streptomycin	10	$\leq 11$	12-14	$\geq 15$
Neomycin	30	$\leq 12$	13-16	$\geq 17$
<b>Nhóm khác</b>				
Trimethorim+sulfamethoxazole	1,25/23,75	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$

*Clinical and Laboratory Standards Institute (2012)*

**PHỤ LỤC I: PHƯƠNG PHÁP TRÍCH ADN PLASMID VI KHUẨN**

Các bước thực hiện trích AND plasmid vi khuẩn bằng bộ kit ISOLATE II Plasmid Mini Kit:

1. Nuôi vi khuẩn trong 2-5 mL môi trường BHIB có chứa kháng sinh thích hợp.
2. Ly tâm thu sinh khối tế bào ở 13.000 vòng/phút trong thời gian 1 phút.
3. Thêm 250  $\mu\text{L}$  dung dịch Resuspension Buffer P1.
4. Thêm 250  $\mu\text{L}$  dung dịch Lysis Buffer P2, đảo nhẹ tuýp từ 6-8 lần. Ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 5 phút.
5. Thêm 250  $\mu\text{L}$  dung dịch Neutralization Buffer B3, trộn đều bằng cách đảo nhẹ tuýp từ 6-8 lần.
6. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong thời gian 5 phút.
7. Hút 750  $\mu\text{L}$  dịch nổi cho qua cột Isolate II Plasmid Mini Spin column được đặt trên Collection Tube.
8. Thêm 500  $\mu\text{L}$  dung dịch Wash Buffer PW1 được làm nóng 50°C và ly tâm 13.000 vòng/phút trong thời gian 1 phút.
9. Thêm 600  $\mu\text{L}$  dung dịch Wash Buffer PW2, ly tâm 13.000 vòng/phút trong thời gian 1 phút. Bỏ dịch qua cột.
10. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong thời gian 2 phút để loại hết ethanol.
11. Thêm 500  $\mu\text{L}$  dung dịch Elution Buffer P, ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 1 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong thời gian 1 phút. Thu lấy dịch qua cột.
12. Plasmid được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

**PHỤ LỤC J: NGUỒN GỐC CÁC CHŨNG VI KHUẨN *E. ictaluri* VÀ *A. hydrophila* PHÂN LẬP TỪ CÁ TRA BỆNH GAN THẬN MỦ VÀ XUẤT HUYẾT Ở ĐBSCL**

**J1. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. ictaluri***

TT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu	Thời gian	Trọng lượng cá (g/con)	Dấu hiệu cá bệnh	Cơ quan phân lập
1	1ED3	Thới Thuận, Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	2013	95	Gan thận mủ	Gan
2	2ED3	Thạnh An, Ô Môn, Tp. Cần Thơ	2013	110	Gan thận mủ	Gan
3	3ED3	Phú Cần, Tiểu Cần, Trà Vinh	2013	116	Gan thận mủ, xuất huyết	Thận sau
4	4ED3	An Nhơn, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	84	Gan thận mủ	Gan
5	5ED3	An Nhơn, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	92	Gan thận mủ	Thận sau
6	6ED3	Mỹ Thuận, Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2013	68	Gan thận mủ	Tỳ tạng
7	7ED3	Phú Bình, Vĩnh Bình, Chợ Lách, Bến Tre	2013	145	Gan thận mủ	Gan
8	8ED3	An Hiệp, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	145	Gan thận mủ, xuất huyết	Tỳ tạng
9	9ED3	Hòa Khánh, Cái Bè, Tiền Giang	2013	230	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
10	10ED3	Mỹ An, Mang Thít, Vĩnh Long	2013	154	Gan thận mủ	Thận sau
11	11ED3	Thị trấn Cái Bè, Cái Bè, Tiền Giang	2013	139	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
12	12ED3	Tp. Cao Lãnh, Đồng Tháp	2013	49	Gan thận mủ	Tỳ tạng
13	13ED3	Hòa Hưng, Cái Bè, Tiền Giang	2013	87	Gan thận mủ	Gan
14	14ED3	Hưng Mỹ, Châu Thành, Trà Vinh	2013	65	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
15	15ED3	Vĩnh Bình, Chợ Lách, Bến Tre	2013	276	Gan thận mủ	Tỳ tạng
16	16ED3	Chợ Mới, An Giang	2013	55	Gan thận mủ	Thận sau
17	17ED3	Thị trấn Cái Bè, Cái Bè, Tiền Giang	2013	197	Gan thận mủ	Thận trước
18	18ED3	Quới An, Vũng Liêm, Vĩnh Long	2013	67	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
19	19ED3	Thanh Bình, Vũng Liêm, Vĩnh Long	2013	86	Gan thận mủ	Tỳ tạng
20	20ED3	Thanh Bình, Vũng Liêm, Vĩnh Long	2013	311	Gan thận mủ	Gan
21	21ED3	Phú Túc, Châu Thành, Bến Tre	2013	98	Gan thận mủ	Thận trước
22	22ED3	Chợ Mới, An Giang	2013	103	Gan thận mủ	Gan
23	23ED3	An Phước, Châu Thành, Bến Tre	2013	90	Gan thận mủ	Thận sau
24	24ED3	Mỹ Thới, Tp. Long Xuyên, An Giang	2013	109	Gan thận mủ	Thận sau
25	25ED3	Tân Phong, Cai Lậy, Tiền Giang	2013	110	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
26	26ED3	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2013	73	Gan thận mủ	Tỳ tạng
27	27ED3	Châu Thành, Tiền Giang	2013	31	Gan thận mủ	Gan
28	28ED3	Thị trấn Cái Bè, Cái Bè, Tiền Giang	2013	56	Gan thận mủ, xuất huyết	Tỳ tạng

TT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu	Thời gian	Trọng lượng cá (g/con)	Dấu hiệu cá bệnh	Cơ quan phân lập
29	29ED3	An Nhơn, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	132	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
30	30ED3	Hòa Khánh, Cái Bè, Tiền Giang	2013	102	Gan thận mủ, xuất huyết	Thận
31	1ED4	Hòa Ninh, Châu Thành, Trà Vinh	2014	83	Gan thận mủ	Gan
32	2ED4	Phong Thạnh, Cầu Kè, Trà Vinh	2014	79	Gan thận mủ, xuất huyết	Thận sau
33	3ED4	Hung Mỹ, Châu Thành, Trà Vinh	2014	195	Gan thận mủ	Thận
34	4ED4	Hung Mỹ, Châu Thành, Trà Vinh	2014	54	Gan thận mủ	Gan
35	5ED4	Sơn Phú, Giồng Trôm, Bến Tre	2014	221	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
36	6ED4	Phú Phụng, Chợ Lách, Bến Tre	2014	104	Gan thận mủ	Tỳ tạng
37	7ED4	Sa Đéc, Đồng Tháp	2014	43	Gan thận mủ	Gan
38	8ED4	Sa Đéc, Đồng Tháp	2014	52	Gan thận mủ	Thận sau
39	9ED4	Bình Thạnh, Cao Lãnh, Đồng Tháp	2014	79	Gan thận mủ	Tỳ tạng
40	10ED4	Tân Phong, Cai Lậy, Tiền Giang	2014	87	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
41	11ED4	Thị xã Hồng Ngự, Hồng Ngự, Đồng Tháp	2014	83	Gan thận mủ	Thận sau
42	12ED4	Phú Thuận A, Hồng Ngự, Đồng Tháp	2014	69	Gan thận mủ	Tỳ tạng
43	13ED4	Tân Phong, Cai Lậy, Tiền Giang	2014	67	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
44	14ED4	Hòa Khánh, Cái Bè, Tiền Giang	2014	55	Gan thận mủ	Tỳ tạng
45	15ED4	Hòa Khánh, Cái Bè, Tiền Giang	2014	234	Gan thận mủ	Tỳ tạng
46	16ED4	An Hiệp, Châu Thành, Đồng Tháp	2014	121	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
47	17ED4	Thanh Quới, Vĩnh Thạnh, Tp. Cần Thơ	2014	359	Gan thận mủ	Gan
48	18ED4	Thanh Mỹ, Vĩnh Thạnh, Tp. Cần Thơ	2014	178	Gan thận mủ	Thận trước
49	19ED4	Thanh Mỹ, Vĩnh Thạnh, Tp. Cần Thơ	2014	98	Gan thận mủ, xuất huyết	Tỳ tạng
50	20ED4	Thới Thuận, Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	2014	39	Gan thận mủ	Thận trước
51	21ED4	Thuận An, Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	2014	22	Gan thận mủ	Gan
52	22ED4	Thuận An, Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	2014	75	Gan thận mủ	Gan
53	23ED4	An Hiệp, Châu Thành, Đồng Tháp	2014	45	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
54	24ED4	An Bình, Long Hồ, Vĩnh Long	2014	56	Gan thận mủ	Gan
55	25ED4	An Bình, Long Hồ, Vĩnh Long	2014	700	Gan thận mủ	Tỳ tạng
56	26ED4	Tp. Vĩnh Long, Vĩnh Long	2014	137	Gan thận mủ	Tỳ tạng
57	27ED4	Mỹ An, Mang Thít, Vĩnh Long	2014	156	Gan thận mủ	Thận sau
58	28ED4	Tân Thành, Lai Vung, Đồng Tháp	2014	74	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
59	29ED4	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2014	56	Gan thận mủ, xuất huyết	Thận sau

TT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu	Thời gian	Trọng lượng cá (g/con)	Dấu hiệu cá bệnh	Cơ quan phân lập
60	30ED4	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2014	224	Gan thận mù, xuất huyết	Tỳ tạng
61	31ED4	Tân Thiêng, Chợ Lách, Bến Tre	2014	654	Gan thận mù	Thận sau
62	32ED4	Phú Phụng, Chợ Lách, Bến Tre	2014	567	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
63	33ED4	Phú Túc, Châu Thành, Bến Tre	2014	78	Gan thận mù	Gan
64	34ED4	Bình Thạnh, Cao Lãnh, Đồng Tháp	2014	112	Gan thận mù	Tỳ tạng
65	35ED4	Mỹ Xương, Cao Lãnh, Đồng Tháp	2014	135	Gan thận mù	Thận sau
66	36ED4	Thị trấn Tiểu Cần, Tiểu Cần, Trà Vinh	2014	378	Gan thận mù, xuất huyết	Tỳ tạng
67	37ED4	Phú Cần, Tiểu Cần, Trà Vinh	2014	82	Gan thận mù	Gan

## J2. Kết quả phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*

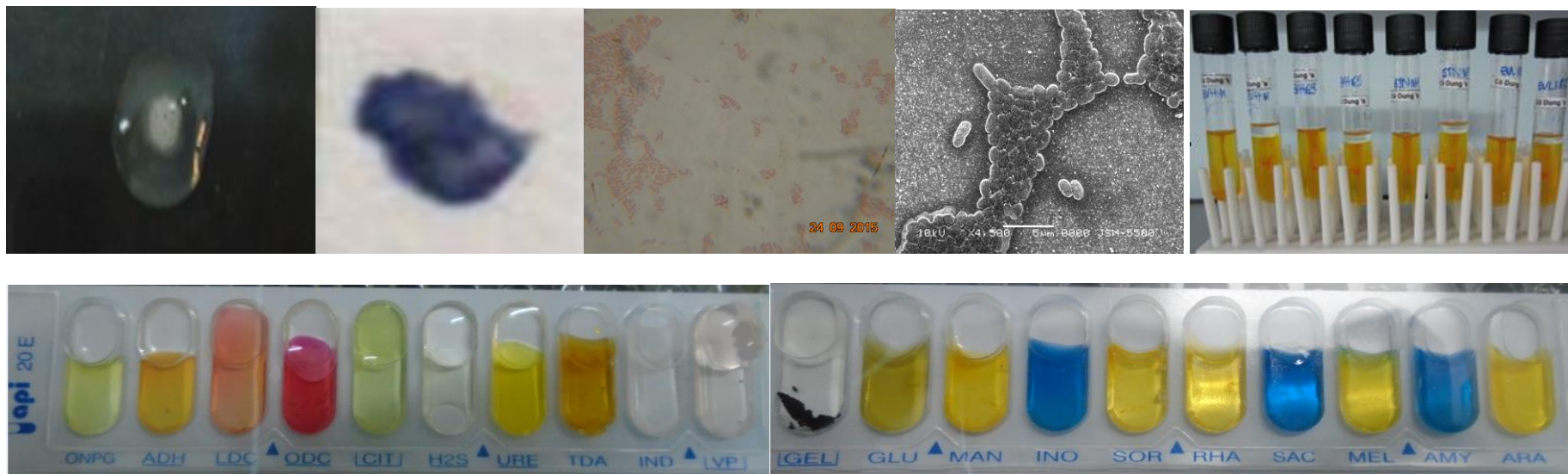
TT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu	Thời gian	Trọng lượng cá (g/con)	Dấu hiệu cá bệnh	Cơ quan phân lập
1	1A3	Phú Cần, Tiểu Cần, Trà Vinh	2013	116	Gan thận mù, xuất huyết	Thận sau
2	2A3	Lục Sĩ Thành, Trà Ôn, Vĩnh Long	2013	110	Xuất huyết	Gan
3	3A3	Thị trấn Tiểu Cần, Tiểu Cần, Trà Vinh	2013	209	Xuất huyết	Gan
4	4A3	Xã An Hiệp, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	145	Gan thận mù, xuất huyết	Tỳ tạng
5	5A3	Thới Thuận, Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	2013	58	Xuất huyết	Thận trước
6	6A3	Hòa Khánh, Cái Bè, Tiền Giang	2013	230	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
7	7A3	Thị trấn Cái Bè, Cái Bè, Tiền Giang	2013	139	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
8	8A3	Hưng Mỹ, Châu Thành, Trà Vinh	2013	65	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
9	9A3	Thạnh An, Ô Môn, Tp. Cần Thơ	2013	230	Xuất huyết	Gan
10	10A3	Quới An, Vũng Liêm, Vĩnh Long	2013	67	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
11	11A3	Thanh Bình, Vũng Liêm, Vĩnh Long	2013	139	Xuất huyết	Tỳ tạng
12	12A3	Tân Phong, Cai Lậy, Tiền Giang	2013	110	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
13	13A3	An Nhơn, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	87	Xuất huyết	Gan
14	14A3	An Nhơn, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	65	Xuất huyết	Gan
15	15A3	Thị trấn Cái Bè, Cái Bè, Tiền Giang	2013	56	Gan thận mù, xuất huyết	Thận
16	16A3	Thạnh Mỹ, Vĩnh Thạnh, Tp. Cần Thơ	2013	155	Xuất huyết	Tỳ tạng
17	17A3	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2013	97	Xuất huyết	Gan
18	18A3	Thạnh An, Ô Môn, Tp. Cần Thơ	2013	67	Xuất huyết	Thận sau
19	19A3	Phú Cần, Tiểu Cần, Trà Vinh	2013	78	Xuất huyết	Thận sau

TT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu	Thời gian	Trọng lượng cá (g/con)	Dấu hiệu cá bệnh	Cơ quan phân lập
20	20A3	Mỹ An, Mang Thít, Vĩnh Long	2013	111	Xuất huyết	Tỳ tạng
21	21A3	Mỹ Thới, Tp. Long Xuyên, An Giang	2013	79	Xuất huyết	Gan
22	22A3	An Hiệp, Châu Thành, Bến Tre	2013	49	Xuất huyết	Thận sau
23	23A3	Phú Túc, Châu Thành, Bến Tre	2013	92	Xuất huyết	Gan
24	24A3	An Bình, Long Hồ, Vĩnh Long	2013	311	Xuất huyết	Thận sau
25	25A3	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2013	65	Xuất huyết	Gan
26	26A3	Hòa Lộc, Tam Bình, Vĩnh Long	2013	56	Xuất huyết	Tỳ tạng
27	27A3	Vĩnh Bình, Chợ Lách, Bến Tre	2013	31	Xuất huyết	Gan
28	28A3	Ngũ Hiệp, Cai Lậy, Tiền Giang	2013	49	Xuất huyết	Tỳ tạng
29	29A3	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2013	109	Xuất huyết	Tỳ tạng
30	30A3	Thới Thuận, Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	2013	107	Xuất huyết	Thận sau
31	31A3	Vĩnh Bình, Chợ Lách, Bến Tre	2013	83	Xuất huyết	Tỳ tạng
32	32A3	Tân Phong, Cai Lậy, Tiền Giang	2013	56	Xuất huyết	Thận sau
33	33A3	Mỹ An, Mang Thít, Vĩnh Long	2013	195	Xuất huyết	Gan
34	34A3	An Phước, Châu Thành, Bến Tre	2013	68	Xuất huyết	Thận trước
35	35A3	An Nhơn, Châu Thành, Đồng Tháp	2013	132	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
36	36A3	An Bình, Long Hồ, Vĩnh Long	2013	109	Xuất huyết	Tỳ tạng
37	37A3	Vĩnh Bình, Chợ Lách, Bến Tre	2013	43	Xuất huyết	Gan
38	38A3	Bình Thạnh, Cao Lãnh, Đồng Tháp	2013	58	Xuất huyết	Thận trước
39	39A3	Vĩnh Bình, Chợ Lách, Bến Tre	2013	79	Xuất huyết	Tỳ tạng
40	40A3	Hòa Khánh, Cái Bè, Tiền Giang	2013	102	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
41	41A3	Chánh An, Mang Thít, Vĩnh Long	2013	46	Xuất huyết	Gan
42	1A4	Phong Thạnh, Cầu Kè, Trà Vinh	2014	79	Gan thận mù, xuất huyết	Gan
43	2A4	Mỹ Thới, Tp. Long Xuyên, An Giang	2014	87	Xuất huyết	Thận sau
44	3A4	Hòa Hưng, Cái Bè, Tiền Giang	2014	58	Xuất huyết	Gan
45	4A4	Sơn Phú, Giồng Trôm, Bến Tre	2014	221	Gan thận mù, xuất huyết	Thận sau
46	5A4	Thuận An, Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	2014	121	Xuất huyết	Gan
47	6A4	Mỹ An, Mang Thít, Vĩnh Long	2014	256	Xuất huyết	Gan
48	7A4	Tân Phong, Cai Lậy, Tiền Giang	2014	87	Gan thận mù, xuất huyết	Thận sau
49	8A4	Tân Thiêng, Chợ Lách, Bến Tre	2014	68	Xuất huyết	Tỳ tạng
50	9A4	Thị trấn Cái Bè, Cái Bè, Tiền Giang	2014	39	Xuất huyết	Thận sau

TT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu	Thời gian	Trọng lượng cá (g/con)	Dấu hiệu cá bệnh	Cơ quan phân lập
51	10A4	Thới An, Ô Môn, Tp. Cần Thơ	2014	37	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
52	11A4	Tân Phong, Cai Lậy, Tiền Giang	2014	67	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
53	12A4	An Bình, Long Hồ, Vĩnh Long	2014	45	Xuất huyết	Tỳ tạng
54	13A4	Châu Hưng, Bình Đại, Bến Tre	2014	94	Xuất huyết	Gan
55	14A4	Ngũ Hiệp, Cai Lậy, Tiền Giang	2014	67	Xuất huyết	Thận sau
56	15A4	Mỹ An, Mang Thít, Vĩnh Long	2014	237	Xuất huyết	Thận sau
57	16A4	Long Hòa, Bình Đại, Bến Tre	2014	567	Xuất huyết	Gan
58	17A4	Lục Sĩ Thành, Trà Ôn, Vĩnh Long	2014	79	Xuất huyết	Tỳ tạng
59	18A4	Đức Mỹ, Càn Long, Trà Vinh	2014	56	Xuất huyết	Gan
60	19A4	Hòa Lộc, Tam Bình, Vĩnh Long	2014	211	Xuất huyết	Gan
61	20A4	Hòa Lộc, Tam Bình, Vĩnh Long	2014	97	Xuất huyết	Thận sau
62	21A4	Phong Thạnh, Cầu Kè, Trà Vinh	2014	67	Xuất huyết	Gan
63	22A4	An Hiệp, Châu Thành, Đồng Tháp	2014	121	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
64	23A4	Phú Phụng, Chợ Lách, Bến Tre	2014	212	Xuất huyết	Tỳ tạng
65	24A4	An Hiệp, Châu Thành, Đồng Tháp	2014	580	Xuất huyết	Tỳ tạng
66	25A4	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2014	700	Xuất huyết	Gan
67	26A4	Phú Phụng, Chợ Lách, Bến Tre	2014	567	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
68	27A4	Thanh Mỹ, Vĩnh Thạnh, Tp. Cần Thơ	2014	98	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
69	28A4	Thị trấn Tiểu Cần, Tiểu Cần, Trà Vinh	2014	378	Gan thận mủ, xuất huyết	Thận sau
70	29A4	An Hiệp, Châu Thành, Đồng Tháp	2014	45	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
71	30A4	Tân Thành, Lai Vung, Đồng Tháp	2014	74	Gan thận mủ, xuất huyết	Tỳ tạng
72	31A4	An Nhơn, Châu Thành, Đồng Tháp	2014	96	Xuất huyết	Gan
73	32A4	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2014	56	Gan thận mủ, xuất huyết	Gan
74	33A4	Mỹ Hòa Hưng, Tp. Long Xuyên, An Giang	2014	224	Gan thận mủ, xuất huyết	Thận sau

### J3A. Kết quả kiểm tra 1 số đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và định danh vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit API 20E

Kết quả khảo sát hoạt tính catalase, oxidase, nhuộm Gram, chụp ảnh SEM, phản ứng O/F và định danh bằng bộ kit API 20E (từ trái sang phải).



### J3B. Kết quả phân lập và thực hiện kháng sinh đồ các chủng vi khuẩn *E. coli*

Vi khuẩn	Nguồn gốc	Địa điểm*	AMO	AMP	CFL	CTX	CHL	FFC	CIP	ENR	NOR	DOX	TET	NEO	STR	GEN	SXT
ECR1	Ruột	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	12 (R)	30 (S)	0 (R)	9 (R)	17 (I)	25 (S)	0 (R)	25 (S)	0 (R)	10 (R)	16 (S)	16 (S)	8 (R)
ECR2	Nước	Cao Lãnh	S (30)	S (22)	24 (S)	30 (S)	24 (S)	30 (S)	18 (I)	26 (S)	30 (S)	18 (S)	28 (S)	17 (S)	15 (S)	19 (S)	30 (S)
ECR3	Ruột	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	17 (I)	16 (R)	9 (R)	13 (R)	28 (S)	30 (S)	21 (I)	11 (R)	18 (I)	17 (S)	0 (R)	10 (R)	14 (I)
ECR4	Ruột	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	0 (R)	23 (I)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	12 (R)	0 (R)	10 (R)	0 (R)	9 (R)	0 (R)	12 (R)	12 (I)
ECR5	Nước	Châu Thành	S (30)	S (22)	24 (S)	31 (S)	33 (S)	36 (S)	32 (S)	30 (S)	28 (S)	27 (S)	0 (R)	17 (S)	20 (S)	23 (S)	20 (S)
ECR6	Ruột	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	0 (R)	33 (S)	13 (I)	11 (R)	21 (S)	10 (R)	0 (R)	23 (S)	0 (R)	20 (S)	20 (S)	21 (S)	14 (I)
ECR7	Nước	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	0 (R)	17 (R)	10 (R)	12 (R)	22 (S)	14 (R)	0 (R)	12 (R)	0 (R)	0 (R)	20 (S)	20 (S)	0 (R)
ECR8	Ruột	Cao Lãnh	S (28)	S (25)	24 (S)	30 (S)	31 (S)	35 (S)	26 (S)	29 (S)	26 (S)	27 (S)	30 (S)	18 (S)	18 (S)	18 (S)	20 (S)

Vi khuẩn	Nguồn gốc	Địa điểm*	AMO	AMP	CFL	CTX	CHL	FFC	CIP	ENR	NOR	DOX	TET	NEO	STR	GEN	SXT
ECR9	Nước	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	0 (R)	16 (R)	13 (I)	11 (R)	22 (S)	22 (I)	21 (I)	10 (R)	0 (R)	17 (S)	0 (R)	12 (R)	15 (I)
ECR10	Ruột	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	0 (R)	35 (S)	31 (S)	35 (S)	30 (S)	28 (S)	27 (S)	27 (S)	0 (R)	18 (S)	19 (S)	21 (S)	0 (R)
ECR11	Ruột	Châu Thành	S (30)	S (22)	26 (S)	20 (R)	11 (R)	11 (R)	18 (I)	13 (R)	12 (R)	0 (R)	0 (R)	9 (R)	12 (I)	19 (S)	0 (R)
ECR12	Nước	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	0 (R)	33 (S)	0 (R)	33 (S)	32 (S)	29 (S)	27 (S)	26 (S)	0 (R)	10 (R)	0 (R)	19 (S)	0 (R)
ECR13	Ruột	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	24 (S)	21 (R)	30 (S)	32 (S)	27 (S)	26 (S)	26 (S)	27 (S)	0 (R)	9 (R)	10 (R)	10 (R)	0 (R)
ECR14	Ruột	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	17 (I)	25 (I)	12 (R)	11 (R)	30 (S)	14 (R)	0 (R)	10 (R)	0 (R)	20 (S)	7 (R)	19 (S)	0 (R)
ECR15	Ruột	Châu Thành	S (28)	S (25)	12 (R)	24 (I)	31 (S)	12 (R)	30 (S)	14 (R)	28 (S)	27 (S)	15 (I)	19 (S)	14 (I)	20 (S)	0 (R)
ECR16	Nước	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	24 (S)	32 (S)	14 (I)	12 (R)	27 (S)	26 (S)	25 (S)	0 (R)	0 (R)	18 (S)	16 (S)	18 (S)	0 (R)
ECR17	Nước	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	13 (R)	32 (S)	32 (S)	32 (S)	24 (S)	24 (S)	12 (R)	30 (S)	30 (S)	19 (S)	10 (R)	19 (S)	0 (R)
ECR18	Nước	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	10 (R)	20 (R)	20 (S)	16 (R)	0 (R)	30 (S)	10 (R)	24 (S)	0 (R)	18 (S)	20 (S)	11 (R)	0 (R)
ECR19	Nước	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	24 (S)	10 (R)	12 (R)	10 (R)	17 (I)	14 (R)	12 (R)	0 (R)	0 (R)	10 (R)	11 (R)	12 (R)	0 (R)
ECR20	Ruột	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	13 (R)	36 (S)	35 (S)	35 (S)	29 (S)	28 (S)	26 (S)	0 (R)	0 (R)	9 (R)	13 (I)	18 (S)	0 (R)
ECR21	Ruột	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	13 (R)	24 (I)	30 (S)	32 (S)	27 (S)	26 (S)	26 (S)	27 (S)	0 (R)	10 (R)	19 (S)	21 (S)	0 (R)
ECR22	Nước	Cao Lãnh	S (30)	S (22)	14 (R)	33 (S)	32 (S)	26 (S)	30 (S)	30 (S)	27 (S)	29 (S)	0 (R)	10 (R)	19 (S)	22 (S)	20 (S)
ECR23	Ruột	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	24 (S)	0 (R)	33 (S)	34 (S)	30 (S)	26 (S)	27 (S)	28 (S)	0 (R)	0 (I)	18 (S)	20 (S)	26 (S)
ECR24	Nước	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	0 (R)	27 (S)	11 (R)	30 (S)	14 (R)	16 (R)	10 (R)	0 (R)	0 (R)	10 (R)	19 (S)	0 (R)	0 (R)
ECR25	Ruột	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	9 (R)	13 (R)	25 (S)	30 (S)	12 (R)	0 (R)	0 (R)	9 (R)	10 (R)	12 (R)	0 (R)
ECR26	Ruột	Cao Lãnh	S (30)	S (22)	26 (S)	30 (S)	12 (R)	10 (R)	27 (S)	21 (I)	23 (S)	21 (S)	0 (R)	18 (S)	20 (S)	11 (R)	25 (S)
ECR27	Ruột	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	14 (R)	22 (R)	14 (I)	12 (R)	19 (I)	13 (R)	12 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	17 (S)	19 (S)	0 (R)
ECR28	Ruột	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	14 (R)	20 (R)	12 (R)	11 (R)	12 (R)	14 (R)	11 (R)	22 (S)	0 (R)	20 (S)	17 (S)	19 (S)	23 (S)
ECR29	Nước	Châu Thành	0 (R)	0 (R)	18 (I)	25 (I)	13 (I)	13 (R)	15 (R)	26 (S)	25 (S)	22 (S)	0 (R)	0 (R)	19 (S)	20 (S)	0 (R)
ECR30	Nước	Cao Lãnh	0 (R)	0 (R)	18 (I)	20 (R)	14 (I)	12 (R)	12 (R)	26 (S)	24 (S)	23 (S)	0 (R)	0 (R)	19 (S)	16 (S)	25 (S)

\* Mẫu nước và cá tra thu ở các vùng nuôi cá tra ở tỉnh Đồng Tháp



**PHỤ LỤC K: KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN *E. ictaluri* VÀ *A. hydrophila***

**K1. Kết quả giải trình tự các chủng *E. ictaluri***

**Chủng 1ED3**

TTTCTTGATAGCATGCGGCACCATCTGCGCTGAGTGAGTGGCTAGATAGGGCGC  
 AAAAGACTAGAAACGCTCTCATTTCCTAAGCGGAATACCTCTTTTCACTTTCC  
 GCAACCATATTCATAGAGCAATTTTCTTGGGTGACAATAATATCATACAAATAA  
 AATAACGATGTAAGATAATGAATTAATTTATTTTTTTGTATTTAATCAACATCCAC  
 CAAATGGAATTATCTTTAAAATTAATCAATTATTTATTTTTTATCACTTTTATTGG  
 TTTTACTGTTTCCCATGGGACAATTATTCTCTGCGCAAGCTTTTACATTAATAAAA  
 AATAAATATCCTTATTATAATATAAGCAAGTAGACATATGTCTTGAAAATATAT  
 TTAATGTTGCGATTTGCATGGCTCTATGAAATGGCGCGTACCTCCTATGGTAGGG  
 GGGCCCCCCTCCCCCCCCGCGCGGTTCGCTTTTGGTGCGTTTCCCAAGAGACAG  
 GTCTAAGCCGAATGCGGTCTGCCCTACTACTTTAAAGTGGTTCGACCTCCATTAG  
 ACA

**K2. Kết quả giải trình tự các chủng *A. hydrophila***

**Chủng 1A3**

CAGAGCGTAAAAGTAATATTGTCAATATGATGGGCCAGTGGCAAATAAGCGGT  
 CTGGCCAACGGCTGGGTAATAATGGGACCGGGTTATAATGGTGAAATAAAACCT  
 GGCTCGGCGTCCAATACCTGGTGTTACCGGGTCAATCCTGTTACCGGTGAAAAC  
 TGCCTTGGGGTCCGTC

**PHỤ LỤC L: KẾT QUẢ CẢM NHIỄM CÁC CHỦNG VI KHUẨN *E. ictaluri* VÀ *A. hydrophila* TRÊN CÁ TRA**

**L1. Kết quả cảm nhiễm các chủng *E. ictaluri***

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 1ED3

Giờ	10 <sup>2</sup>			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup>			10 <sup>5</sup>			10 <sup>6</sup>			ĐC NaCl 0,85%			ĐC		
	CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá								
	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	3	1	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	4	3	3	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	1	0	1	1	0	1	4	2	4	7	7	4	0	0	0	0	0	0
120	1	0	0	2	0	1	1	1	3	5	5	8	9	8	5	0	0	0	0	0	0
144	2	2	0	3	1	1	2	1	4	7	5	10	9	10	6	0	0	0	0	0	0
168	3	2	1	3	2	3	4	3	6	7	6	10	10	10	7	0	0	0	0	0	0
192	3	2	1	3	2	3	4	3	6	7	6	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0
216	3	2	1	4	2	3	4	3	6	7	6	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0
240	3	2	1	4	3	3	4	3	6	7	6	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0
264	3	2	1	4	4	3	4	3	6	7	6	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0
288	3	2	1	4	4	3	4	3	6	7	6	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0
312	3	2	1	4	4	3	4	3	6	7	6	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0
336	3	2	1	4	4	3	4	3	6	7	6	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 3ED3

Giờ	10 <sup>2</sup> CFU/cá			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup> CFU/cá			10 <sup>5</sup> CFU/cá			10 <sup>6</sup> CFU/cá			ĐC NaCl 0,85%			ĐC			
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	2	4	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	1	1	0	0	1	1	0	3	1	0	5	3	9	0	0	0	0	0	0	0
120	1	0	1	2	1	0	2	3	1	4	2	3	6	6	9	0	0	0	0	0	0	0
144	2	1	2	2	1	0	4	4	1	4	2	4	6	6	10	0	0	0	0	0	0	0
168	2	3	2	4	2	1	4	4	2	6	2	4	7	6	10	0	0	0	0	0	0	0
192	2	3	2	4	3	1	4	4	2	6	3	4	7	6	10	0	0	0	0	0	0	0
216	2	3	2	6	3	1	5	4	3	7	3	4	8	7	10	0	0	0	0	0	0	0
240	2	3	2	6	3	1	5	4	3	7	3	4	8	7	10	0	0	0	0	0	0	0
264	2	3	2	6	3	1	5	4	3	7	3	4	8	7	10	0	0	0	0	0	0	0
288	2	3	2	6	3	1	5	4	3	7	3	4	8	7	10	0	0	0	0	0	0	0
312	2	3	2	6	3	1	5	4	3	7	3	4	8	7	10	0	0	0	0	0	0	0
336	2	3	2	6	3	1	5	4	3	7	3	4	8	7	10	0	0	0	0	0	0	0

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 8ED3

Giờ	10 <sup>2</sup> CFU/cá			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup> CFU/cá			10 <sup>5</sup> CFU/cá			10 <sup>6</sup> CFU/cá			ĐC NaCl 0,85%			ĐC			
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	2	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0
120	0	1	0	0	1	0	3	3	4	3	4	5	6	4	8	0	0	0	0	0	0	0
144	1	0	1	1	2	0	4	3	5	5	6	7	7	5	8	0	0	0	0	0	0	0
168	1	0	1	1	2	1	5	3	5	6	7	9	8	5	8	0	0	0	0	0	0	0
192	1	0	1	2	3	2	5	3	5	6	7	9	8	7	8	0	0	0	0	0	0	0
216	1	0	1	3	3	2	5	3	5	6	7	9	10	7	9	0	0	0	0	0	0	0
240	1	0	1	3	3	2	5	3	5	6	7	9	11	7	9	0	0	0	0	0	0	0
264	1	0	1	3	3	2	5	3	5	6	7	9	11	7	9	0	0	0	0	0	0	0
288	1	0	1	3	3	2	5	3	5	6	7	9	11	7	9	0	0	0	0	0	0	0
312	1	0	1	3	3	2	5	3	5	6	7	9	11	7	9	0	0	0	0	0	0	0
336	1	0	1	3	3	2	5	3	5	6	7	9	11	7	9	0	0	0	0	0	0	0

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 10ED3

Giờ	10 <sup>2</sup>			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup>			10 <sup>5</sup>			10 <sup>6</sup>			ĐC NaCl 0,85%			ĐC		
	CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá		
	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	2	1	4	2	2	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	1	0	0	0	3	0	2	2	1	4	5	5	0	0	0	0	0	0
120	2	0	0	2	2	0	1	3	1	4	4	3	6	6	8	0	0	0	0	0	0
144	2	1	2	3	2	2	2	4	3	5	4	4	7	7	10	0	0	0	0	0	0
168	3	1	2	3	3	2	2	4	4	5	5	4	8	7	11	0	0	0	0	0	0
192	4	2	2	4	3	2	2	4	4	5	5	4	8	7	11	0	0	0	0	0	0
216	4	2	2	4	3	2	2	4	4	5	5	4	8	7	11	0	0	0	0	0	0
240	4	2	2	5	3	2	4	4	4	5	5	4	9	7	11	0	0	0	0	0	0
264	4	2	2	5	3	2	4	4	4	5	5	4	9	7	11	0	0	0	0	0	0
288	4	2	2	5	3	2	4	4	4	5	5	4	9	7	11	0	0	0	0	0	0
312	4	2	2	5	3	2	4	4	4	5	5	4	9	7	11	0	0	0	0	0	0
336	4	2	2	5	3	2	4	4	4	5	5	4	9	7	11	0	0	0	0	0	0

**L2. Kết quả cảm nhiễm các chủng *A. hydrophila***

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 1A3

Giờ	10 <sup>2</sup>			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup>			10 <sup>5</sup>			10 <sup>6</sup>			ĐC NaCl 0,85%			ĐC		
	CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá			CFU/cá		
	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3	L 1	L 2	L 3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	0	0	3	1	2	4	3	2	5	5	7	0	0	0	0	0	0
24	0	0	1	2	2	0	4	3	3	7	5	3	8	7	7	0	0	0	0	0	0
30	0	0	2	2	2	1	6	3	3	7	5	4	9	9	10	0	0	0	0	0	0
36	1	0	2	3	2	2	6	4	3	8	7	6	10	10	10	0	0	0	0	0	0
42	1	0	2	3	3	2	6	4	3	8	9	6	10	10	10	0	0	0	0	0	0
48	1	1	2	4	3	2	6	4	3	9	9	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
54	1	1	2	4	3	2	6	4	3	9	9	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
60	2	1	4	4	3	2	6	4	3	9	9	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
72	2	1	4	4	3	2	6	4	3	9	9	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
96	2	1	4	4	3	2	6	4	3	9	9	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
120	2	1	4	4	3	2	6	4	3	9	9	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
336	2	1	4	4	3	2	6	4	3	9	9	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 2A3

Giờ	10 <sup>2</sup> CFU/cá			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup> CFU/cá			10 <sup>5</sup> CFU/cá			10 <sup>6</sup> CFU/cá			ĐC NaCl 0,85%			ĐC		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	2	0	2	2	1	2	4	2	5	3	1	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	1	2	1	3	3	2	3	4	3	7	5	4	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	2	3	1	4	3	3	5	6	4	7	5	5	0	0	0	0	0	0
36	1	1	0	2	3	2	4	3	4	6	7	5	9	7	7	0	0	0	0	0	0
42	1	1	1	3	3	2	5	4	5	8	8	7	9	9	8	0	0	0	0	0	0
48	2	1	2	4	4	4	7	5	8	9	8	8	10	9	9	0	0	0	0	0	0
54	2	1	2	4	4	4	7	5	8	9	8	8	10	9	9	0	0	0	0	0	0
60	2	2	2	4	4	4	7	5	8	9	8	8	10	9	9	0	0	0	0	0	0
72	3	2	2	4	4	4	7	5	8	9	8	8	10	9	9	0	0	0	0	0	0
96	3	3	3	4	4	4	7	5	8	9	8	8	10	9	9	0	0	0	0	0	0
120	3	3	3	4	4	4	7	5	8	9	8	8	10	9	9	0	0	0	0	0	0
336	3	3	3	4	4	4	7	5	8	9	8	8	10	9	9	0	0	0	0	0	0

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 4A3

Giờ	10 <sup>2</sup> CFU/cá			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup> CFU/cá			10 <sup>5</sup> CFU/cá			10 <sup>6</sup> CFU/cá			ĐC NaCl 0,85%			ĐC		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	3	1	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	3	4	4	2	0	0	0	0	0	0
24	0	0	1	1	1	0	2	2	1	5	3	4	6	5	5	0	0	0	0	0	0
30	0	0	1	1	1	0	3	2	2	6	5	4	7	6	5	0	0	0	0	0	0
36	1	1	2	2	2	1	5	5	4	7	8	6	8	8	7	0	0	0	0	0	0
42	2	1	3	3	2	1	6	5	4	8	8	7	9	8	8	0	0	0	0	0	0
48	3	2	3	5	4	2	7	6	7	9	9	8	10	10	8	0	0	0	0	0	0
54	3	2	3	5	4	3	7	6	8	9	9	8	10	10	9	0	0	0	0	0	0
60	4	3	3	6	5	3	8	7	8	9	10	9	10	10	10	0	0	0	0	0	0
72	4	3	3	6	5	3	8	7	8	9	10	9	10	10	10	0	0	0	0	0	0
96	4	3	3	6	5	3	8	7	8	9	10	9	10	10	10	0	0	0	0	0	0
120	4	3	3	6	5	3	8	7	8	9	10	9	10	10	10	0	0	0	0	0	0
336	4	3	3	6	5	3	8	7	8	9	10	9	10	10	10	0	0	0	0	0	0

Số cá tra chết cảm nhiễm với chủng 5A3

Giờ	10 <sup>2</sup> CFU/cá			10 <sup>3</sup> CFU/cá			10 <sup>4</sup> CFU/cá			10 <sup>5</sup> CFU/cá			10 <sup>6</sup> CFU/cá			ĐC NaCl 0,85%			ĐC		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	2	2	6	4	3	0	0	0	0	0	0
24	1	0	0	0	0	1	2	3	3	5	3	3	8	6	4	0	0	0	0	0	0
30	1	1	0	1	0	2	2	3	4	5	5	3	8	8	4	0	0	0	0	0	0
36	2	1	1	2	1	3	3	4	4	7	6	5	9	8	7	0	0	0	0	0	0
42	2	1	1	2	2	3	4	5	4	8	7	5	10	8	7	0	0	0	0	0	0
48	3	2	2	3	2	3	4	5	4	9	7	6	10	10	8	0	0	0	0	0	0
54	3	2	2	3	2	3	4	5	4	9	7	6	10	10	9	0	0	0	0	0	0
60	4	2	2	3	3	3	4	5	4	9	8	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
72	4	2	2	4	3	3	4	5	4	9	8	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
96	4	2	2	4	3	3	4	5	4	9	8	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
120	4	2	2	4	3	3	4	5	4	9	8	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0
336	4	2	2	4	3	3	4	5	4	9	8	7	10	10	10	0	0	0	0	0	0

**PHỤ LỤC M: KẾT QUẢ PHÂN TÍCH THỐNG KÊ TỈ LỆ CHẾT TÍCH LŨY THÍ NGHIỆM CẢM NHIỄM KÉP BẰNG PHƯƠNG PHÁP NGÂM**

**ANOVA**

Tỉ lệ ca chết tích lũy

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1716,917	3	572,306	858,458	,000
Within Groups	5,333	8	,667		
Total	1722,250	11			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Tỉ lệ ca chết tích lũy

Tukey HSD

(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-6,33(*)	,667	,000	-8,47	-4,20
	3	20,33(*)	,667	,000	18,20	22,47
	4	20,33(*)	,667	,000	18,20	22,47
2	1	6,33(*)	,667	,000	4,20	8,47
	3	26,67(*)	,667	,000	24,53	28,80
	4	26,67(*)	,667	,000	24,53	28,80
3	1	-20,33(*)	,667	,000	-22,47	-18,20
	2	-26,67(*)	,667	,000	-28,80	-24,53
	4	,00	,667	1,000	-2,13	2,13
4	1	-20,33(*)	,667	,000	-22,47	-18,20
	2	-26,67(*)	,667	,000	-28,80	-24,53
	3	,00	,667	1,000	-2,13	2,13

\* The mean difference is significant at the .05 level.

**PHỤ LỤC N: KẾT QUẢ CẢM NHIỄM ĐƠN VÀ CẢM NHIỄM KÉP 2 CHỦNG VI KHUẨN *A. hydrophila* (4A3) VÀ *E. ictaluri* (1ED3) TRÊN CÁ TRA BẰNG PHƯƠNG PHÁP NGÂM**

Thời gian	6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192	216	240	264	288	312	336
<b>NK1</b>																							
L1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	5	7	8	9	9	9	9	9	9	9	9
L2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	4	4	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6
L3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Tổng</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>NK2</b>																							
L1	0	0	0	0	2	3	3	3	4	5	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
L2	0	0	0	1	2	2	3	4	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
L3	0	0	0	1	1	3	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Tổng</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>
<b>NK3</b>																							
L1	0	0	0	1	3	4	4	5	6	6	7	8	8	8	9	10	10	10	10	10	10	10	10
L2	0	1	2	3	4	6	6	6	6	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
L3	0	0	2	3	4	5	6	8	8	9	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Tổng</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>
<b>NK4</b>																							
L1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
L3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Tổng</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>NK5</b>																							
L1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<b>Tổng</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

NK1: Ngâm cá tra với chủng 1ED3 ( $10^6$  CFU/mL) NK2: Ngâm cá tra với chủng 4A3 ( $10^5$  CFU/mL) NK3: Ngâm cá tra với chủng 1ED3 ( $10^6$  CFU/mL) + chủng 4A3 ( $10^5$  CFU/mL). NK4: Đối chứng ngâm nước muối sinh lý NaCl 0,85% và NK5: Đối chứng không ngâm nước muối sinh lý NaCl 0,85%.

**PHỤ LỤC O: KẾT QUẢ PHÂN TÍCH THỐNG KÊ TỈ LỆ CHẾT TÍCH LŨY THÍ NGHIỆM CẢM NHIỄM KÉP BẰNG PHƯƠNG PHÁP TIÊM**

**ANOVA**

Tỉ lệ ca chết tích lũy

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2934,000	6	489,000	789,923	,000
Within Groups	8,667	14	,619		
Total	2942,667	20			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Tỉ lệ ca chết tích lũy

Tukey HSD

(I) NT	(J) NT	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2,00	,642	,085	-4,19	,19
	3	-4,67(*)	,642	,000	-6,86	-2,47
	4	-7,67(*)	,642	,000	-9,86	-5,47
	5	-8,67(*)	,642	,000	-10,86	-6,47
	6	20,67(*)	,642	,000	18,47	22,86
	7	21,00(*)	,642	,000	18,81	23,19
2	1	2,00	,642	,085	-,19	4,19
	3	-2,67(*)	,642	,013	-4,86	-,47
	4	-5,67(*)	,642	,000	-7,86	-3,47
	5	-6,67(*)	,642	,000	-8,86	-4,47
	6	22,67(*)	,642	,000	20,47	24,86
	7	23,00(*)	,642	,000	20,81	25,19
3	1	4,67(*)	,642	,000	2,47	6,86
	2	2,67(*)	,642	,013	,47	4,86
	4	-3,00(*)	,642	,005	-5,19	-,81
	5	-4,00(*)	,642	,000	-6,19	-1,81
	6	25,33(*)	,642	,000	23,14	27,53
	7	25,67(*)	,642	,000	23,47	27,86
4	1	7,67(*)	,642	,000	5,47	9,86
	2	5,67(*)	,642	,000	3,47	7,86
	3	3,00(*)	,642	,005	,81	5,19
	5	-1,00	,642	,709	-3,19	1,19
	6	28,33(*)	,642	,000	26,14	30,53
	7	28,67(*)	,642	,000	26,47	30,86
5	1	8,67(*)	,642	,000	6,47	10,86
	2	6,67(*)	,642	,000	4,47	8,86
	3	4,00(*)	,642	,000	1,81	6,19
	4	1,00	,642	,709	-1,19	3,19
	6	29,33(*)	,642	,000	27,14	31,53
	7	29,67(*)	,642	,000	27,47	31,86
6	1	-20,67(*)	,642	,000	-22,86	-18,47
	2	-22,67(*)	,642	,000	-24,86	-20,47

(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
7	3	-25,33(*)	,642	,000	-27,53	-23,14
	4	-28,33(*)	,642	,000	-30,53	-26,14
	5	-29,33(*)	,642	,000	-31,53	-27,14
	7	,33	,642	,998	-1,86	2,53
	1	-21,00(*)	,642	,000	-23,19	-18,81
	2	-23,00(*)	,642	,000	-25,19	-20,81
	3	-25,67(*)	,642	,000	-27,86	-23,47
	4	-28,67(*)	,642	,000	-30,86	-26,47
	5	-29,67(*)	,642	,000	-31,86	-27,47
	6	-,33	,642	,998	-2,53	1,86

\* The mean difference is significant at the .05 level.



**PHỤ LỤC P: KẾT QUẢ CẢM NHIỄM KÉP 2 CHỦNG *A. hydrophila* VÀ *E. ictaluri* TRÊN CÁ TRA BẰNG PHƯƠNG PHÁP TIÊM**

Thời gian	TK1			TK2			TK3			TK4			TK5			TK6			TK7		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	2	1	2	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	2	2	3	4	5	5	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	4	3	5	7	7	6	3	4	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	5	5	7	8	7	6	5	6	5	4	5	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0
72	8	7	8	8	8	7	8	7	7	7	7	6	1	1	2	0	0	0	0	0	0
84	8	7	8	8	8	7	9	8	7	8	7	7	3	4	4	0	0	0	0	0	0
96	8	8	8	8	8	8	9	9	7	9	8	9	5	5	6	0	0	0	0	0	0
108	8	8	8	8	8	8	9	9	8	9	8	9	8	7	7	0	0	0	0	0	0
120	8	9	8	8	8	8	9	9	8	9	8	9	9	8	9	0	0	0	0	0	0
132	8	9	8	8	8	8	9	9	8	10	8	9	10	8	9	0	0	0	0	0	0
144	8	9	8	8	8	8	9	9	8	10	9	9	10	9	9	0	0	0	0	0	0
156	8	9	8	8	8	8	9	9	8	10	9	9	10	10	9	0	0	0	0	0	0
168	8	9	8	8	8	8	9	9	8	10	9	9	10	10	9	1	0	0	0	0	0
336	8	9	8	8	8	8	9	9	8	10	9	9	10	10	9	1	0	0	0	0	0
<b>Tổng</b>	<b>25</b>			<b>24</b>			<b>26</b>			<b>28</b>			<b>29</b>			<b>1</b>			<b>0</b>		

TK1: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* trước khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 12 giờ.

TK2: Tiêm cùng lúc vi khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri*.

TK3: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 24 giờ.

TK4: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 48 giờ.

TK5: Tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* 72 giờ.

TK6: Đối chứng tiêm nước muối sinh lý NaCl 0,85%.

TK7: Đối chứng không tiêm nước muối sinh lý.

**PHỤ LỤC Q: GIÁ TRỊ pH VÀ NHIỆT ĐỘ TRONG CÁC THÍ NGHIỆM  
CẢM NHIỄM**

**Q1. Giá trị pH và nhiệt độ trong các thí nghiệm cảm nhiễm đơn**

Ngày	pH		Nhiệt độ	
	6 giờ	18 giờ	6 giờ	18 giờ
Ngày 0*	7,28	7,28	27,8	28,2
Ngày 1	7,34	7,56	27,3	27,9
Ngày 2	7,05	7,35	27,5	28,1
Ngày 3	7,45	7,56	27,2	27,6
Ngày 4	7,33	7,62	28,2	28,8
Ngày 5	7,57	7,60	28,4	28,9
Ngày 6	7,44	7,55	27,7	28,4
Ngày 7	7,38	7,53	27,8	28,5
Ngày 8	7,25	7,48	28,3	28,7
Ngày 9	7,35	7,68	27,4	28,1
Ngày 10	7,57	7,69	28,2	28,7
Ngày 11	7,44	7,52	27,8	28,0
Ngày 12	7,23	7,59	26,8	27,3
Ngày 13	7,43	7,67	27,8	28,6
Ngày 14	7,58	7,69	28,3	28,8

\*Giá trị pH và nhiệt độ được đo trước khi tiêm cá.

**Q2. Giá trị pH và nhiệt độ trong các thí nghiệm cảm nhiễm kép**

Ngày	pH		Nhiệt độ	
	6 giờ	18 giờ	6 giờ	18 giờ
Ngày 0*	7,20	7,20	27,9	28,4
Ngày 1	7,34	7,57	27,5	28,5
Ngày 2	7,04	7,65	27,4	28,0
Ngày 3	7,04	7,55	27,2	27,5
Ngày 4	7,65	7,74	28,4	29,8
Ngày 5	7,57	7,60	27,6	28,9
Ngày 6	7,43	7,57	27,5	28,7
Ngày 7	7,39	7,54	27,8	28,2
Ngày 8	7,74	7,87	27,5	28,7
Ngày 9	7,35	7,68	27,3	28,3
Ngày 10	7,57	7,69	27,8	28,6
Ngày 11	7,65	7,67	27,8	28,3
Ngày 12	7,60	7,64	27,7	28,3
Ngày 13	7,63	7,67	27,8	28,6
Ngày 14	7,58	7,44	27,5	28,6

\*Giá trị pH và nhiệt độ được đo trước khi tiêm/ngâm cá.

**PHỤ LỤC R: KẾT QUẢ THỰC HIỆN KHÁNG SINH ĐỒ VI KHUẨN *E. ictaluri* VÀ *A. hydrophila***

**R1. Kết quả thực hiện kháng sinh đồ 67 chủng vi khuẩn *E. ictaluri***

Vi khuẩn	Địa điểm	AMO	AMP	CFL	CTX	CHL	FFC	CIP	ENR	NOR	DOX	TET	NEO	STR	GEN	SXT
1ED3	Tp. Cần Thơ	S (25)	S (22)	R (11)	R (0)	R(8)	R (0)	S (25)	R (0)	S (17)	R (0)	R (10)	R (0)	R (0)	S (19)	R (0)
2ED3	Tp. Cần Thơ	R (12)	S (20)	S (22)	S (30)	R (6)	R (13)	I (20)	R (16)	S (17)	S (18)	R (9)	R (12)	R (8)	R (12)	R (0)
3ED3	Trà Vinh	S (32)	S (22)	I (18)	R (22)	S (32)	R (14)	S (22)	R (14)	S (19)	S (16)	R (9)	S (16)	R (0)	R (12)	R (0)
4ED3	Đồng Tháp	R (12)	R (12)	R (12)	R (13)	R (8)	R (8)	R (0)	R (0)	R (0)	R (10)	R (7)	R (12)	I (12)	R (12)	R (0)
5ED3	Đồng Tháp	S (26)	S (19)	R (10)	R (0)	R (8)	R (0)	I (20)	R (15)	I (13)	R (11)	R (18)	R (12)	R (0)	S (18)	R (0)
6ED3	An Giang	I (16)	R (13)	R (13)	I (24)	R (8)	R (16)	R (12)	R (0)	R (0)	I (13)	R (8)	S (16)	R (0)	R (10)	R (0)
7ED3	Bến Tre	S (24)	I (14)	R (0)	R (0)	R (7)	R (8)	I (16)	R (12)	R (0)	R (11)	R (7)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)
8ED3	Đồng Tháp	S (35)	S (26)	R (13)	S (30)	R (9)	R (10)	S (25)	R (16)	S (20)	S (17)	R (8)	R (12)	R (0)	I (13)	R (0)
9ED3	Tiền Giang	S (23)	S (20)	S (20)	R (21)	R (8)	S (32)	S (30)	S (30)	S (19)	S (16)	S (32)	S (30)	S (20)	S (27)	R (0)
10ED3	Vĩnh Long	I (16)	R (12)	S (21)	I (25)	R (7)	R (8)	R (12)	R (10)	R (11)	R (12)	R (0)	S (16)	R (6)	R (11)	R (0)
11ED3	Tiền Giang	S (25)	S (25)	S (24)	S (26)	S (18)	R (7)	S (29)	S (25)	S (22)	S (20)	S (30)	S (23)	R (0)	S (22)	R (0)
12ED3	Đồng Tháp	S (39)	S (29)	S (20)	I (24)	R (5)	R (14)	S (25)	I (19)	I (16)	S (16)	R (8)	S (16)	R (0)	R (12)	R (0)
13ED3	Tiền Giang	S (35)	S (32)	S (20)	I (25)	R (7)	R (7)	S (27)	S (24)	I (16)	R 912)	R (0)	S (25)	R (0)	I (13)	R (0)
14ED3	Trà Vinh	S (36)	S (30)	I (19)	R (20)	R (7)	R (7)	I (20)	I (19)	I (16)	S (19)	R (7)	S (20)	S (25)	I (14)	R (0)
15ED3	Bến Tre	S (20)	S (30)	S (20)	S (40)	R (10)	R (0)	S (24)	R (15)	I (13)	I (15)	R (9)	R (12)	R (0)	R (11)	R (0)
16ED3	An Giang	R (8)	R (0)	I (18)	R (14)	I (13)	R (9)	R (9)	R (10)	I (16)	R (12)	I (16)	R (0)	R (11)	R (0)	R (0)
17ED3	Tiền Giang	S (28)	S (32)	R (16)	S (40)	R (9)	R (0)	R (13)	R (9)	R (12)	R (10)	R (0)	R (0)	R (10)	R (12)	R (0)
18ED3	Vĩnh Long	S (18)	S (32)	S (22)	R (20)	R (9)	R (8)	R (12)	R 911)	S (32)	S (27)	R (8)	S (30)	S (25)	S (24)	R (0)
19ED3	Vĩnh Long	R (12)	R (12)	R (15)	R (20)	R (9)	R (9)	I (20)	R (15)	R (0)	S (16)	R (0)	R (8)	R (11)	S (20)	R (0)
20ED3	Vĩnh Long	S (20)	R (12)	S (22)	S (30)	R (7)	R (7)	I (20)	R (14)	R (12)	S (24)	R (8)	R (11)	R (0)	I (16)	R (0)
21ED3	Bến Tre	I (16)	R (12)	S (21)	I (25)	R (8)	R (7)	R (12)	R (10)	R (11)	R (12)	R (0)	S (16)	R (6)	R (11)	R (0)
22ED3	An Giang	S (25)	S (24)	S (25)	S (26)	R (10)	R (8)	R (14)	S (24)	I (16)	I (15)	R (5)	S (15)	S (15)	S (20)	R (0)
23ED3	Bến Tre	S (35)	S (18)	R (16)	S (35)	R (8)	R (6)	S (28)	R (16)	R (0)	S (18)	I (15)	R (12)	R (0)	I (12)	R (0)
24ED3	An Giang	R (10)	S (20)	R (15)	I (25)	R (9)	R (8)	I (20)	R (14)	I (13)	I (13)	I (16)	S (15)	R (0)	I (15)	R (0)
25ED3	Tiền Giang	R (8)	R (0)	S (22)	R (22)	R (8)	R (7)	R (15)	R (9)	R (10)	S (16)	R (8)	I (13)	R (7)	R (12)	R (0)
26ED3	An Giang	S (30)	S (20)	R (12)	S (30)	R (10)	R (9)	S (22)	R (16)	R (10)	S (25)	R (10)	S (20)	R (0)	S (20)	R (0)
27ED3	Tiền Giang	R (7)	R (0)	R (12)	S (42)	R (8)	R (8)	I (17)	R (12)	R (12)	S (20)	R (9)	S (17)	R (0)	S (17)	R (0)
28ED3	Tiền Giang	R (10)	R (0)	S (25)	R (22)	R (0)	R (9)	R (15)	R (11)	R (11)	S (18)	R (0)	R (10)	R (0)	R (11)	R (0)

<b>Vị khuẩn</b>	<b>Địa điểm</b>	<b>AMO</b>	<b>AMP</b>	<b>CFL</b>	<b>CTX</b>	<b>CHL</b>	<b>FFC</b>	<b>CIP</b>	<b>ENR</b>	<b>NOR</b>	<b>DOX</b>	<b>TET</b>	<b>NEO</b>	<b>STR</b>	<b>GEN</b>	<b>SXT</b>
29ED3	Đồng Tháp	S (22)	S (31)	S (30)	I (24)	R (0)	R (0)	S (26)	R (14)	I (14)	I (15)	R (0)	I (13)	R (0)	R (12)	R (0)
30ED3	Tiền Giang	S (33)	S (30)	S (20)	R (22)	R (0)	R (0)	I (20)	R (13)	R (11)	I (15)	R (9)	I (13)	R (0)	I (14)	R (0)
1ED4	Trà Vinh	S (35)	S (32)	S (20)	S (40)	R (6)	R (14)	I (16)	R (12)	S (17)	S (18)	R (6)	I (13)	I (14)	R (11)	R (0)
2ED4	Trà Vinh	S (32)	R (0)	I (19)	S (28)	R (4)	R (12)	S (27)	I (18)	S (18)	S (16)	R (12)	I (14)	R (0)	R (0)	R (0)
3ED4	Trà Vinh	S (29)	S (28)	S (30)	S (38)	R (0)	R (10)	I (16)	I (17)	I (14)	I (14)	R (8)	I (14)	R (0)	I (14)	R (0)
4ED4	Trà Vinh	S (28)	S (26)	S (20)	S (28)	R (0)	S (22)	R (0)	R (0)	R (8)	I (14)	R (6)	I (14)	I (12)	I (13)	R (0)
5ED4	Bến Tre	S (38)	S (25)	S (24)	S (42)	R (6)	R (10)	S (23)	R (11)	R (12)	S (18)	R (11)	S (15)	R (0)	R (12)	R (0)
6ED4	Bến Tre	S (37)	S (24)	I (19)	S (30)	R (8)	R (12)	S (28)	I (19)	S (18)	S (17)	R (9)	S (15)	R (0)	I (14)	R (0)
7ED4	Đồng Tháp	S (36)	S (30)	S (22)	S (50)	R (0)	R (0)	S (30)	I (20)	S (18)	S (22)	R (6)	R (12)	R (10)	I (14)	R (0)
8ED4	Đồng Tháp	S (29)	S (26)	I (18)	S (42)	R (0)	R (7)	S (22)	R (16)	I (14)	S (17)	R (9)	R (12)	R (0)	I (13)	R (0)
9ED4	Đồng Tháp	S (28)	S (30)	S (21)	S (40)	R (6)	R (6)	S (28)	I (20)	I (16)	S (17)	R (8)	I (14)	S (20)	I (14)	R (0)
10ED4	Tiền Giang	S (28)	S (29)	S (21)	S (39)	R (9)	R (6)	I (16)	R (0)	I (14)	I (14)	R (0)	S (17)	I (13)	I (15)	R (0)
11ED4	Đồng Tháp	S (40)	S (30)	S (26)	S (44)	R (0)	R (13)	S (28)	I (17)	S (19)	S (20)	R (10)	S (16)	R (0)	I (16)	R (0)
12ED4	Đồng Tháp	S (32)	S (18)	S (23)	S (34)	R (6)	R (9)	S (25)	I (20)	I (13)	S (19)	R (9)	R (12)	R (0)	R (11)	R (0)
13ED4	Tiền Giang	S (30)	S (22)	S (22)	S (41)	R (0)	R (8)	S (24)	I (22)	I (14)	S (19)	R (9)	R (12)	R (0)	S (18)	R (0)
14ED4	Tiền Giang	S (28)	S (20)	S (22)	S (36)	R (6)	R (9)	R (14)	R (0)	R (0)	I (13)	R (0)	I (14)	I (12)	I (13)	R (0)
15ED4	Tiền Giang	S (28)	S (28)	S (22)	S (38)	R (7)	R (12)	S (24)	I (18)	I (14)	S (19)	R (10)	I (14)	R (0)	I (14)	R (0)
16ED4	Đồng Tháp	S (40)	S (26)	S (32)	S (44)	S (30)	R (0)	S (22)	R (0)	R (0)	I (13)	R (8)	S (15)	I (12)	I (15)	R (0)
17ED4	Tp. Cần Thơ	S (44)	R (0)	I (17)	S (28)	R (8)	R (12)	R (10)	R (0)	R (0)	R (12)	R (7)	R (12)	R (0)	I (16)	R (0)
18ED4	Tp. Cần Thơ	S (34)	R (0)	S (20)	S (30)	R (6)	R (0)	R (0)	R (0)	I (14)	I (14)	R (8)	R (10)	I (14)	I (13)	R (0)
19ED4	Tp. Cần Thơ	S (38)	I (16)	R (12)	R (20)	R (6)	R (10)	R (0)	R (0)	R (0)	I (15)	R (6)	S (16)	R (0)	R (12)	R (0)
20ED4	Tp. Cần Thơ	I (15)	I (15)	I (18)	R (18)	R (0)	S (21)	R (0)	R (0)	I (15)	S (30)	R (0)	R (0)	R (11)	R (12)	R (0)
21ED4	Tp. Cần Thơ	S (24)	S (25)	R (16)	R (22)	R (0)	I (17)	R (0)	R (0)	R (11)	I (14)	R (0)	S (15)	I (12)	I (14)	R (0)
22ED4	Tp. Cần Thơ	R (12)	S (28)	R (0)	R (0)	R (9)	R (14)	S (22)	R (12)	I (14)	R (8)	R (0)	R (0)	R (11)	R (9)	R (0)
23ED4	Đồng Tháp	R (0)	S (30)	S (27)	R (16)	R (6)	R (6)	R (0)	R (0)	R (9)	R (0)	R (0)	I (14)	R (8)	I (13)	R (0)
24ED4	Vĩnh Long	S (34)	R (0)	S (34)	S (46)	R (6)	R (0)	I (20)	R (12)	R (0)	S (17)	R (9)	R (11)	R (0)	R (0)	R (0)
25ED4	Vĩnh Long	S (30)	S (24)	S (25)	S (40)	R (0)	R (8)	I (17)	R (8)	R (10)	I (13)	R (6)	I (14)	R (0)	R (12)	R (0)
26ED4	Vĩnh Long	S (40)	S (30)	S (30)	S (44)	R (0)	R (10)	R (0)	R (0)	R (0)	S (20)	R (8)	R (12)	R (0)	I (13)	R (0)
27ED4	Vĩnh Long	S (40)	R (0)	S (24)	R (0)	R (0)	R (10)	R (14)	R (0)	R (0)	I (14)	R (6)	S (15)	I (12)	R (12)	R (0)

<b>Vi khuẩn</b>	<b>Địa điểm</b>	<b>AMO</b>	<b>AMP</b>	<b>CFL</b>	<b>CTX</b>	<b>CHL</b>	<b>FFC</b>	<b>CIP</b>	<b>ENR</b>	<b>NOR</b>	<b>DOX</b>	<b>TET</b>	<b>NEO</b>	<b>STR</b>	<b>GEN</b>	<b>SXT</b>
28ED4	Đồng Tháp	S (37)	S (20)	S (21)	I (24)	R (6)	R (8)	R (14)	R (0)	R (8)	I (14)	R (6)	I (14)	R (10)	R (12)	R (0)
29ED4	An Giang	S (26)	R (10)	I (18)	R (19)	R (8)	R (10)	R (0)	R (0)	R (12)	I (13)	R (0)	R (12)	I (10)	R (12)	R (0)
30ED4	An Giang	R (0)	S (22)	R (10)	S (28)	R (6)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (10)	R (0)	R (10)	R (10)	R (6)	R (0)
31ED4	Bến Tre	S (30)	R (0)	S (32)	R (0)	R (8)	R (6)	S (28)	R (15)	I (14)	S (16)	R (7)	R (12)	R (0)	R (10)	R (0)
32ED4	Bến Tre	S (30)	S (23)	S (24)	S (34)	R (6)	R (11)	R (12)	I (18)	I (16)	S (9)	R (19)	S (15)	R (0)	R (6)	R (0)
33ED4	Bến Tre	S (34)	S (25)	S (24)	S (35)	R (0)	R (8)	I (17)	I (21)	S (24)	I (14)	R (9)	R (12)	R (0)	R (12)	R (0)
34ED4	Đồng Tháp	S (34)	S (30)	S (24)	S (40)	R (0)	R (6)	R (13)	I (21)	S (19)	I (15)	R (10)	I (14)	R (0)	I (14)	R (0)
35ED4	Đồng Tháp	S (34)	S (25)	S (21)	S (32)	R (0)	R (0)	I (20)	R (6)	R (8)	R (11)	R (0)	S (17)	S (15)	S (17)	R (0)
36ED4	Trà Vinh	S (30)	S (23)	I (19)	S (24)	R (6)	R (6)	R (15)	R (0)	R (12)	R (11)	R (0)	I (14)	I (14)	R (12)	R (0)
37ED4	Trà Vinh	S (30)	S (24)	S (26)	S (36)	R (0)	R (6)	R (14)	I (19)	I (15)	S (19)	R (11)	S (15)	R (0)	19 (13)	R (0)

**R2. Kết quả thực hiện kháng sinh đồ 74 chủng vi khuẩn *A. hydrophila***

<b>Vi khuẩn</b>	<b>Địa điểm</b>	<b>AMO</b>	<b>AML</b>	<b>CFL</b>	<b>CTX</b>	<b>CHL</b>	<b>FFC</b>	<b>CIP</b>	<b>ENR</b>	<b>NOR</b>	<b>DOX</b>	<b>TET</b>	<b>NEO</b>	<b>STR</b>	<b>GEN</b>	<b>SXT</b>
1A3	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	R (15)	R (11)	R (9)	S (25)	S (23)	S (20)	S (20)	R (9)	S (17)	I (13)	I (14)	R (0)
2A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (37)	S (30)	S (35)	S (28)	S (27)	S (26)	S (25)	R (12)	R (10)	S (15)	S (19)	R (0)
3A3	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	S (38)	R (11)	R (12)	S (28)	S (27)	I (16)	S (24)	R (9)	R (11)	I (14)	I (14)	R (0)
4A3	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	S (35)	S (32)	S (35)	S (30)	S (28)	S (28)	S (25)	R (13)	R (11)	I (13)	S (19)	R (0)
5A3	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	S (35)	R (11)	R (11)	S (24)	I (21)	S (20)	S (22)	R (8)	R (10)	I (14)	I (13)	R (0)
6A3	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (35)	S (30)	S (35)	S (21)	S (29)	S (26)	S (24)	R (11)	R (8)	I (13)	S (19)	R (0)
7A3	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (12)	R (9)	S (24)	S (23)	S (21)	S (19)	R (9)	S (17)	I (13)	I (14)	R (0)
8A3	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	I (25)	R (11)	S (34)	S (30)	S (28)	S (26)	S (24)	R (8)	R (11)	S (15)	S (18)	R (0)
9A3	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	S (35)	S (31)	S (35)	S (30)	S (30)	S (27)	S (24)	R (13)	R (8)	S (16)	S (17)	R (0)
10A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (11)	R (9)	S (26)	S (25)	S (21)	S (17)	R (9)	R (12)	S (16)	I (13)	R (0)
11A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	I (14)	R (9)	I (17)	S (25)	S (22)	S (25)	R (9)	S (16)	S (16)	I (14)	R (0)
12A3	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (11)	R (9)	R (10)	R (16)	R (10)	R (8)	R (8)	R (8)	R (10)	R (11)	R (0)
13A3	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	R (16)	R (9)	R (13)	S (28)	S (30)	S (21)	R (12)	I (18)	S (17)	I (12)	S (17)	R (0)
14A3	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	I (23)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (12)	I (13)	R (12)	R (0)
15A3	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (31)	S (33)	S (36)	S (32)	S (30)	S (28)	S (27)	R (13)	S (17)	S (20)	S (23)	R (0)
16A3	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	S (31)	I (13)	R (11)	S (21)	I (19)	I (16)	S (23)	R (11)	S (20)	S (20)	S (21)	R (0)
17A3	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (10)	R (12)	S (22)	I (20)	I (15)	S (25)	R (10)	R (12)	S (20)	S (20)	R (0)

<b>Vĩ khuẩn</b>	<b>Địa điểm</b>	<b>AMO</b>	<b>AML</b>	<b>CFL</b>	<b>CTX</b>	<b>CHL</b>	<b>FFC</b>	<b>CIP</b>	<b>ENR</b>	<b>NOR</b>	<b>DOX</b>	<b>TET</b>	<b>NEO</b>	<b>STR</b>	<b>GEN</b>	<b>SXT</b>
18A3	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (11)	R (11)	S (26)	S (25)	S (22)	S (23)	R (9)	S (18)	S (18)	S (18)	R (0)
19A3	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	S (26)	I (13)	R (11)	S (22)	I (22)	S (21)	S (24)	R (10)	S (17)	S (15)	S (17)	R (0)
20A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (11)	S (36)	S (22)	S (30)	S (27)	S (25)	R (10)	S (20)	R (10)	S (20)	R (0)
21A3	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	R (20)	R (11)	R (11)	I (18)	I (17)	I (13)	S (18)	R (9)	S (16)	S (15)	S (19)	R (0)
22A3	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (33)	R (0)	S (33)	S (32)	S (29)	S (27)	S (26)	R (12)	S (16)	R (0)	S (19)	R (0)
23A3	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (33)	R (0)	S (36)	S (22)	S (25)	S (21)	S (25)	R (9)	S (18)	S (18)	I (13)	R (0)
24A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (12)	R (11)	S (30)	S (29)	S (20)	S (21)	R (11)	S (20)	S (18)	S (19)	R (0)
25A3	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (35)	S (31)	R (12)	S (30)	S (29)	S (28)	S (27)	I (15)	S (19)	S (15)	S (20)	R (0)
26A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (32)	I (14)	R (12)	S (27)	S (26)	S (25)	S (21)	R (10)	S (19)	S (15)	S (20)	R (0)
27A3	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (32)	S (32)	S (32)	S (24)	S (24)	S (20)	S (30)	S (30)	S (19)	S (18)	S (19)	R (0)
28A3	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (36)	S (20)	R (16)	S (30)	S (30)	S (20)	S (24)	R (8)	S (18)	S (20)	S (17)	R (0)
29A3	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	R (10)	R (12)	R (10)	I (17)	R (15)	R (11)	S (17)	R (0)	S (17)	R (11)	I (14)	R (0)
30A3	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	S (36)	S (35)	S (35)	S (29)	S (28)	S (26)	R (10)	R (9)	S (16)	S (16)	S (18)	R (0)
31A3	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (31)	S (30)	S (32)	S (27)	S (26)	S (26)	S (26)	R (27)	S (17)	S (16)	S (19)	R (0)
32A3	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (33)	S (32)	S (26)	S (30)	S (30)	S (27)	S (29)	R (13)	S (16)	S (19)	S (22)	R (0)
33A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	S (33)	S (34)	S (30)	S (26)	S (27)	S (28)	R (13)	S (16)	S (18)	S (20)	R (0)
34A3	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (27)	R (11)	S (30)	R (14)	R (14)	R (11)	S (16)	R (0)	R (12)	S (19)	R (10)	R (0)
35A3	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (9)	R (13)	S (25)	S (34)	I (16)	S (20)	R (8)	R (8)	R (10)	R (11)	R (0)
36A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (12)	R (10)	S (27)	S (23)	S (23)	S (21)	R (9)	S (18)	S (20)	S (18)	R (0)
37A3	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (29)	I (14)	R (12)	I (19)	R (12)	S (17)	R (10)	R (9)	S (17)	S (17)	S (19)	R (0)
38A3	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	S (29)	R (12)	R (11)	S (27)	S (25)	R (12)	S (22)	R (9)	S (20)	S (17)	S (19)	R (0)
39A3	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	I (13)	R (13)	S (27)	S (26)	S (25)	S (22)	R (10)	S (17)	S (19)	S (20)	R (0)
40A3	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (29)	I (14)	R (12)	S (25)	S (26)	S (24)	S (23)	R (9)	R (12)	S (19)	I (14)	R (0)
41A3	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (12)	R (11)	S (26)	S (25)	S (25)	S (24)	R (10)	S (19)	S (18)	S (20)	R (0)
1A4	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	S (34)	S (30)	S (33)	S (27)	S (26)	S (25)	S (27)	R (10)	S (17)	S (17)	S (20)	R (0)
2A4	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	R (12)	R (0)	R (0)	S (25)	S (28)	S (18)	I (13)	R (0)	R (0)	R (11)	R (16)	R (0)
3A4	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (34)	S (32)	S (25)	S (30)	S (29)	S (27)	S (25)	R (0)	S (19)	S (20)	S (22)	R (0)
4A4	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (37)	R (12)	R (8)	S (24)	I (21)	S (21)	S (23)	R (8)	S (17)	S (15)	S (17)	R (0)
5A4	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	S (31)	S (30)	S (36)	S (27)	I (17)	S (24)	S (27)	R (13)	R (15)	S (19)	S (21)	R (0)

<b>Vĩ khuẩn</b>	<b>Địa điểm</b>	<b>AMO</b>	<b>AML</b>	<b>CFL</b>	<b>CTX</b>	<b>CHL</b>	<b>FFC</b>	<b>CIP</b>	<b>ENR</b>	<b>NOR</b>	<b>DOX</b>	<b>TET</b>	<b>NEO</b>	<b>STR</b>	<b>GEN</b>	<b>SXT</b>
6A4	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	I (24)	R (7)	R (11)	S (25)	S (28)	S (20)	S (25)	S (20)	R (11)	I (12)	I (15)	R (0)
7A4	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (32)	S (30)	R (0)	S (22)	I (20)	S (17)	S (20)	R (10)	R (10)	I (12)	I (14)	R (0)
8A4	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (28)	I (13)	R (12)	S (22)	I (22)	S (23)	S (20)	R (11)	R (15)	I (12)	I (14)	R (0)
9A4	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (12)	R (13)	S (21)	R (0)	R (0)	S (17)	R (10)	R (15)	I (14)	I (16)	R (0)
10A4	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	I (24)	R (11)	R (10)	S (26)	R (0)	I (15)	S (19)	R (9)	R (15)	I (13)	I (15)	R (0)
11A4	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	I (13)	S (20)	S (22)	R (0)	R (10)	S (16)	R (11)	R (15)	R (11)	S (12)	R (0)
12A4	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (10)	I (19)	I (19)	S (27)	S (20)	S (22)	R (10)	S (16)	I (12)	I (15)	R (0)
13A4	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (27)	S (25)	S (25)	S (24)	I (22)	S (24)	S (22)	R (12)	R (11)	I (14)	I (14)	R (0)
14A4	Tiền Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (12)	R (13)	S (25)	R (0)	S (24)	S (21)	R (12)	R (15)	I (14)	I (15)	R (0)
15A4	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	S (27)	S (42)	I (20)	S (24)	R (3)	S (18)	R (13)	R (12)	S (22)	I (14)	R (0)
16A4	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	R (22)	I (15)	R (9)	S (23)	I (20)	S (24)	S (20)	R (9)	R (15)	S (19)	R (11)	R (0)
17A4	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (27)	R (11)	R (12)	S (24)	I (17)	S (27)	S (17)	R (12)	R (13)	S (21)	I (14)	R (0)
18A4	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	S (26)	S (23)	S (42)	I (19)	I (22)	S (23)	S (21)	S (40)	R (13)	S (21)	I (13)	R (0)
19A4	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	S (25)	S (40)	S (22)	R (0)	S (32)	S (20)	R (14)	R (14)	S (21)	R (12)	R (0)
20A4	Vĩnh Long	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	R (12)	S (30)	S (22)	R (13)	I (13)	S (20)	S (24)	R (14)	S (19)	R (12)	R (0)
21A4	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	S (27)	S (41)	S (21)	I (17)	S (31)	S (21)	R (13)	R (13)	S (22)	R (12)	R (0)
22A4	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	I (24)	R (11)	R (11)	S (25)	S (28)	S (25)	I (14)	R (10)	R (14)	S (21)	I (14)	R (0)
23A4	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (32)	I (15)	R (11)	S (25)	I (17)	S (30)	S (17)	R (10)	S (16)	S (21)	I (14)	R (0)
24A4	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	I (25)	R (11)	R (12)	R (13)	I (22)	S (21)	S (18)	R (11)	R (14)	S (22)	I (14)	R (0)
25A4	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (27)	I (14)	R (11)	S (27)	I (18)	S (17)	S (18)	R (12)	R (12)	S (15)	R (12)	R (0)
26A4	Bến Tre	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	I (15)	R (9)	I (17)	I (17)	S (17)	S (18)	R (10)	S (20)	I (13)	I (15)	R (0)
27A4	Tp. Cần Thơ	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	S (30)	S (30)	S (23)	I (22)	S (22)	S (21)	S (26)	R (12)	R (10)	R (12)	R (0)
28A4	Trà Vinh	R (0)	R (0)	R (0)	S (27)	R (6)	R (8)	S (24)	I (22)	I (15)	I (15)	R (9)	R (14)	R (10)	R (10)	R (0)
29A4	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	S (33)	I (15)	R (9)	S (25)	S (25)	S (18)	R (12)	R (9)	R (15)	I (12)	I (15)	R (0)
30A4	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	S (33)	I (15)	S (30)	R (15)	I (19)	R (2)	S (20)	R (11)	R (12)	R (11)	R (12)	R (0)
31A4	Đồng Tháp	R (0)	R (0)	R (0)	S (30)	S (25)	R (10)	S (24)	I (18)	I (16)	S (22)	R (10)	R (14)	S (16)	R (12)	R (0)
32A4	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	S (28)	R (12)	R (8)	S (25)	S (23)	R (9)	S (19)	R (10)	R (14)	R (11)	R (12)	R (0)
33A4	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	I (24)	S (25)	S (32)	S (27)	I (22)	S (31)	S (22)	R (10)	R (14)	R (11)	R (12)	R (0)
33A4	An Giang	R (0)	R (0)	R (0)	I (24)	S (25)	S (32)	S (27)	I (22)	S (31)	S (22)	R (10)	R (14)	R (11)	R (12)	R (0)

**PHỤ LỤC S: KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ CÁC GEN Ở 2 LOÀI VI KHUẨN *E. ictaluri* VÀ *A. hydrophila***

**S1. Kết quả giải trình tự các *IntI1***

ACTTGGTTAGGCAGTTAGCGTATGGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAAACCTTTG  
ACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGAC  
TGTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGA

**S2. Kết quả giải trình tự các vùng gen cassette**

**S2A. Gen cassette *dfrA1* (0,65 kbp)**

GCTGCATTGGTGATGTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGG  
GCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAACCTCTGAGGAAGAATTGTGAAACTATC  
ACTAATGGTAGCTATATCGAAGAATGGAGTTATCGGGAATGGCCCTGATATT  
CCATGGAGTGCCAAAGGTGAACAGCTCCTGTTTAAAGCTATTACCTATAACC  
AATGGCTGTTGGTTGGACGCAAGACTTTTGAATCAATGGGAGCATTACCCAA  
CCGAAAGTATGCGGTCGTAACACGTTCAAGTTTTACATCTGACAATGAGAAC  
GTATTGATCTTCCATCAATTAAGATGCTTTAACCAACCTAAAGAAAATAA  
CGGATCATGTCATTGTTTCAGGTGGTGGGGAGATATACAAAAGCCTGATCGA  
TCAAGTAGATACTACATATATCTACAATAGACATCGAGCCGGAAGGTGA  
TGTTTACTTTCCTGAAATCCCCAGCAATTTTAGG

**S2B. Gen cassette *Dfr7* (0,8 kbp)**

GTTTCGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCA  
GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGCCATTACGGGGGTTGAATTGAA  
AATTCATTGATTTCTGCAACGTCAGAAAATGGCGTAATCGGTAATGGCCCT  
GATATCCCATGGTCAGCAAAAGGTGAGCAGTTACTCTTTAAAGCGCTCACAT  
ATAATCAGTGGCTCCTTGTGGAAGGAAAACATTTGACTCTATGGGTGTTCT  
TCCAAATCGAAAATATGCAGTAGTGTGCGAGGAAAGGAATTTCAAGCTCAA  
TGAAAATGTATTAGTCTTTCCTTCAATAGAAATCGCTTTGCAAGAACTATCG  
AAAATTACAGATCATTATATGTCTCTGGTGGCGGTCAAATCTACAATAGTC  
TTATTGAAAAAGCAGATATAATTCATTTGTCTACTGTTACGTTGAGGTTGA  
AGGTGATATCAATTTTCCTAAAATTCAGAGAATTTCAATTTGGTTTTTGAGC  
AGTTTTTTTTGTCTAATAAATTACACATATCAGATTTGGAAAAAAGGCTA  
ACAAGTCGTTCCAGCACCAGTCGCTGCGCTCCTTGGACAGTTTTTAAGTCGC  
GGTTTTATGGTTTTGCTGCGCAAAAGTATTCCATAAAAACCACAACCTTAAAAA  
CTGCCGCTGAACTCGGCGTTAGATGC

**S2C. Gen cassette *aadA2* (0,95 kbp)**

GGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGG  
AGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGAC  
ATCATGAGGGTAGCGGTGACCATCGAAATTTTGAACCGACTATCAGAGGTG  
CTAAGCGTCATTGAGCGCCATCTGGAATCAACGTTGCTGGCCGTGCATTTGT  
ACGGCTCCGCAGAGGATGGCGGCCTGAAGCCATACAGCGATATTGATTTGTT  
GGTTACTGTGGCCGTAAAGCTTGATGAAACGACGCGGCGAGCATTGCTCAAT  
GACCTTATGGAGGCTTCGGCTTTCCTGGCGAGAGCGAGACGCTCCGCGCTA  
TAGAAGTCACCCTTGTCGTGCATGACGACATCATCCCGTGGCGTTATCCGGC  
TAAGCGCGAGCTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCGGG  
TATCTTCGAGCCAGCCATGATCGACATTGATCTAGCTATCCTGCTTACAAA  
GCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCGGCAGCGGAGGAATTTCTTT  
GACCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTCGAGGGCGCTGAGGGAAACCTTGAAG  
CTATGGAACCTCGCAGCCCGACTGGGCCGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTT  
ACGTTGTCCCGCATTGTTGTTACAGCGCAATAACCGGCAAAATCGCGCCGAAG



GATGTCGCTGCCGACTGGGCAATAAAACGCCTACCTGCCCAGTATCAGCCCCG  
TCTTACTTGAAGCTAAGCAAGCTTATCTGGGACAAAAAGAAGATCACTTGGC  
CTCACGCGCAGATCACTTGGAAGAACTTATTCGCTTTGTGAAAGGCGAGATC  
ATCAAGTCAGTTGGTAAATGATGTCTAACAAATTCGTTCAAGCCGACCGCGCT  
ACGCGCGGGCGGCTTAACTCCGGCGTTAGATGCACTAAGCACATAATTGCTC  
ACAGCCAAACTATCAGGTCAAGTCTGCTT

**S2D. Gen cassette *aadA1* (1,0 kbp)**

GTGCTGCGCAAAAACCCAGAACCACGGCCAGGAATGCCCGGGCGCGCGG  
ATACTTCCGCTCAAGGGCGTCGGGAAGCGCAACGCCGCTGCGGCCCTCGGC  
CTGGTCCTTCAGCCACCATGCCCGTGCACGCGACAGCTGCTCGCGCAGGCTG  
GGTGCCAAGCTCTCGGGTAACATCAAGGCCCGATCCTTGGAGCCCTTGCCCT  
CCCGCACGATGATCGTGCCGTGATCGAAATCCAGATCCTTGACCCGCGAGTTG  
CAAACCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCATACAGAAGCTGGGCGAACAA  
ACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCCTTCATCCGGGGTTC  
AGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGC  
CAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCC  
AATGCCTGACGATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCCGAGCCAG  
GACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACAC  
CGTGGAACCGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTCCGGTTC  
GTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTT  
GACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTAT  
GACTGTTTTTTTTGGGGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGC  
GTTACGCCGTGGGTTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCA  
GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGAT  
CGCCGAAGTATCG

**S2E. Gen cassette *dfrA27* (1,2 kbp)**

TCCCAACAATTAAGGGTCTTAAAATGGTAAAAGATTGGATTCCCATCTCTCA  
TGATAATTACAAGCAGGTGCAAGGACCGTTCTATCATGGAACCAAAGCCAA  
TTTGGCGATTGGTGACTTGCTAACCACAGGGTTCATCTCTCATTTTCGAGGAC  
GGTCGTATTCTTAAGCACATCTACTTTTCAGCCTTGATGGAGCCAGCAGTTTG  
GGGAGCTGAACTTGCTATGTCACTGTCTGGCCTCGAGGGTTCGCGGCTACATA  
TACATAGTTGAGCCAACAGGACCGTTCGAAGACGATCCGAATCTTACGAAC  
AAAAGATTTCCCGGTAATCCAACACAGTCCTATAGAACCTGCGAACCCCTTGA  
GAATTGTTGGCGTTGTTGAAGACTGGGAGGGGCATCCTGTTGAATTAATAAG  
GGGAATGTTGGATTCGTTGGAGGACTTAAAGCGCCGTGGTTTACACGTCATT  
GAAGACTAGTCCTTTGCATAACAAAGCCATCAAACCGGACGCCAGAGATTC  
CGCGCCTGTTGCGCATGGCTTCGCCATTTTATGCGCAATAGGCGCGCCACCC  
TGTCGCCGTTTATGGCGGCGTTAACCCAAAGGAGTATCGTGAAAATATCACT  
AATGGCTGCAAAAGCAAGAAATGGGGTTATTGGCTGCGGCTCGGATATCCC  
GTGGAACGCTAAAGGTGAGCAGCTGCTTTTTTAAAGCAATAACTTACAATCAA  
TGGCTCTTAGTCGGCCGTAAAACATTTGAGGCAATGGGGGCTCTCCCAAATA  
GAAAGTATGCAGTTGTCAGCCGCTCAGGATCGGTAGCTACTAACGATGATGT  
GGTTGTGTTTCCATCTATAGAAGCAGCAATGAGGGAGCTAAAGACTCTTACG  
AACCATGTTGTTGTTTCTGGTGGTGGAGAGATCTACAAGAGTCTGATCGCCC  
ATGCCGACACGCTACATATCTCGACAATAGATTCCGAGCCAGAGGGCAATG  
TTTTCTTTCCGGAAATCCCCAAAGAGTTCAATGTGGTGTTCGAGCAGGAATT  
TCATTCAAATATAAATTATCGCTATCAAATCTGGCAAAGGGGTTAACCATCC  
AAGCCATCGGACACATTT

**S2F. Gen cassette *dfrA1-aacA4* (1,5 kbp)**

GCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTCGAGTGGTGGGGCG  
GAGAAGAAGCACGCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAA  
GCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCCTCCATACATTGCAATGCTGAATGGAGA  
GCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGATGG  
TGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTCACTGGCG  
AATGCATCACAACCTGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCACTG  
GTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCCGAGGTCACCAAGATCCAAACGGACCCGT  
CGCCGAGCAACTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGGTTTGAGA  
GGCAAGGTACCGTACCCCCCAGATGGTCCATCCGTGTACGTGGTTCAAAC  
ACGCCATGCATTGAGCGAACACGCAGTGATGCCTAACCCCTTCCATCAAGGG  
GGCGGTTCGTGAAACTATCACTAATGGTAGCTATATCGAAGAATGGAGTTATC  
GGGAATGGCCCTGATATCCATGGAGTGCCAAAGGTGAACAGCTCCTGTTTA  
AAGCTATTACCTATAACCAATGGCTGTTGGTGGACGCAAGACTTTTGAATC  
AATGGGAGCATTACCCAACCGAAAGTATGCGGTTCGTAACACGTTTCGAAGTG  
TGTACATCTGACAATGAGGAACGTTAGGGATCTTTCATCAATTAAGATGCT  
TTAACCAACCTAAAGAAAATAACGGATCATGTCATTGTTTCAGGTGGTGGGG  
AGATATACAAAAGCCTGATCGATCAAGTAGATACTACATATATCTACAAT  
AGACATCGAGCCGGAAGGTGATGTTTACTTTTCGTGAAATCCCCAGCAATTTT  
AGGCCAGTTTTTACCCAAGACTTCGCCTCTAACATAAATTATAGTTACCAA  
TCTGGCAAAGGGTTAACAAGTGGCAGCAACGGATTTCGCAAACCTGTCACG  
CCTTTTGTACCAAAGCCGCGCCAGGTTTTCGATCCGCTGTGCCAGGCGTTA  
TGCAAATGGTGAGTACAAAAAATTGACAACCGGCATTCAGTTTTTGGAGAG  
AGGCCAAAAACATGGTCTAGTTGATAACTTAGCCGATCGTGGTTTTAACA  
CTTGAAGGGGTTGTATTTTTATCGCTTTTATGGGTAAAGGTATTCATCAATTA  
TCTTGGGTTTCAGCTTCATACGGTGAAAACCTAACATTTGATATAACATGTATT  
TTTGATGAGATAGATTCACGTTATGTCCGTAATTTTCCCATTAATGTCCCCT  
CCTATGTGGTGGCGGGTTTGGTGATGAATATTTCACTCCAGAGTTATGGGAA  
ATAGCGACATTGGACAATGT

**S2G. Gen cassette *blaVIM-1-aadB-dfrA1* (2,5 kbp)**

TTCCGGTCGGAGAGGTCCGGCTTTACCAGATTGCTGATGGTGTGGTTCGCA  
TATCGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCGGTCTACCCATCCAATGGTCTCATT  
GTCCGTGATGGTGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAA  
ACACAGCGGCCCTTCTCGCGGAGATTGAGAAGCAAATTGGACTTCCCGTAAC  
GCGTGCACTCCACGCACTTTCATGACGACCGCGTCGGCGGCGTTGATGTC  
CTTCGGAAGGCTGGAGTGGCAACGTACGCATCACCGTCGACACGCCGGCTA  
GCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCACTCTCTAGAAGGACTCTCA  
TCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAGCTCTTCTATCCCGGTG  
CTGCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCGTCAGCGAACGTGCT  
ATACGGTGGTGTGCGCTTCTTTCGTTGTCACGCACGTCTGCGGGGAACGTG  
GCCGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAAAC  
ACTACCCGGAAGCAGAGGTCGTCATTCCCGGGCACGGTCTACCGGGCGGTCT  
AGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACGTTGTCACAGCACACAAAAATCGCTC  
AGTCGCCGAGTAGCAGATGCGGCATAACAAATCGTTGGAGAGGGACTTTTG  
CTACGCAGGCTGCGCCTGCTCCGCAAAGCCCCTCAACCCAAGCGTTAGGCC  
GCATGGACACAACGCAGGTCACATTGATACACAAAATTCTAGCTGCGGCAG  
ATGAGCGAAATCTGCCGCTCTGGATCGGTGGGGGCTGGGCGATCGATGCAC  
GGCTAGGGCGTGTAACACGCAAGCACGATGATATTGATCTGACGTTTCCCGG

CGAGAGGGCGGGCGAGCTCGAGGCAATAGTTGAAATGCTCGGGCGGGCGCGT  
CATGGAGGAGTTGGACTATGGATTCTTAGCGGAGATCGGGGATGAGTACTT  
GACTGCGAACCTGCTTGGTGGGCAGACGAAGCGTATGAAATCGCGGAGGCT  
CCGCAGGGCTCGTGCCAGAGGGCGGCTGAGGGCGTCATCGCCGGGCGGCCA  
GTCCGTTGTAACAGCTGGGAGGCGATCATCTGGGATTACTTTTACTATGCCG  
ATGAAGTACCACCAGTGGACTGGCCTACAAAGCACATAGAGTCCTACAGGC  
TCGCATGCACCTCACTCGGGGCGGAAAAGGTTGAGGTCTTGCGTGCCGCTTT  
CAGGTCGCGATATGCGGCCTAACAATTCGTCCAAGCCGACGCCGCTTCGCGG  
CGCGGCTTAACTCAGGTGTTAACCTCTGAGGAAGAATTGTGAAACTATCACT  
AATGGTAGCTATATCGAAGAATGGAGTTATCGGGAATGGCCCTGATATTCCA  
TGGAGTGCCAAAGGTGAACAGCTCCTGTTTAAAGCTATTACCTATAACCAAT  
GGCTGTTGGTTGGACGCAAGACTTTTGAATCAATGGGAGCATTACCCAACCG  
AAAGTATGCGGTCGTAACACGTTCAAGTTTTACATCTGACAATGAGAACGTA  
TTGATCTTTCCATCAATTAAGATGCTTTAACCAACCTAAAGAAAATAACGG  
ATCATGTCATTGTTTCAGGTGGTGGGGAGATATACAAAAGCCTGATCGATCA  
AGTAGATACTACATATATCTACAATAGACATCGAGCCGGAAGGTGATGTT  
TACTTTCCTGAAATCCCCAGCAATTTTAGGCCAGTTTTTACCCAAGACTTCGC  
CTCTAACATAAATTATAGTTACCAAATCTGGCAAAGGGTTAACAAAGTGCCA  
GCAACGGATTTGCAAACCTGTCACGCCTTTTGTACCAAAGCCGCGCCAGGT  
TTGCGATCCCGCTGTGCCAGGCGTTAAGGCTACATGAAAATCGTACATTACG  
AAGCGAATGCACCATGGATAGGAAGAATGAAATGCCCAAACCCAAAGTGTG  
GGAAGGAAACTCCTGCCTGGCAATCGAGCGGCATGAGCGACAGTTGCCCGC  
ATTT

**S3. Kết quả giải trình tự các gen *qacE1***

TCGCACATCCGCATTAATCTAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTGCCCCTTCCG  
CCGTTGTCATAATCGGTTATGGCATCGCATTTTTATTTTCTTCTCTGGTTCTGA  
AATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCAGTCTGGTTCGGGACTCGGCGTCTG  
CATAATTACAGCCATTGCCTGGTTGCTTCATGGGCAAAGCTTGATGCGTGG  
GGCTTTGTAGGTATGGGGCTCAAAA

**S4. Kết quả giải trình tự các gen *Sul1***

GTCGTTTCGAGCGGACTGCCCTCGGCAAGCCTCGGTCAGCCGCTCAACTTCAA  
CGTTAGATGCACTAAGCACATAATTGCTCACAGCCAAACTATCAGGTCAAGT  
CTGCTTTTTATTATTTTAAAGCGTGCATAATAAGCCCTACACAAATTGGGAGA  
TATATCATGAAAGGCTGGCTTTTTCTTGTTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAA  
TCGCAACATCCGCATTAATAATCTAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTGCCCCTTC  
CGCCGTTGTCATAATCGGTTATGGCATCGCATTTTTATTTTCTTCTCTGGTTCT  
GAAATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCAGTCTGGTTCGGGACTCGGCGTC  
GTCATAATTACAGCCATTGCCTGGTTGCTTCATGGGCAAAGCTTGATGCGT  
GGGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATAATTGCTGCCTTTTTGCTCGCCCGATCC  
CCATCGTGGAAGTCGCTGCGGAGGCCGACGCCATGGTGACGGTGTTCGGCA  
TTCTGAATCTCACCGAGGACTCCTTCTTCGATGAGAGCCGGCGGCTAGACCC  
CGCCGGCGCTGTCACCGCGGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGT  
CGTGGATGTCGGACCGGCCAGCCATCCGGACGCGAGGCCTGTATCGCC  
GGCCGATGAGATCAGACGTATTGCGCCGCTCTTAGACGCCCTGTCCGATCAG  
ATGCACCGTGTTTCAA

**S5. Kết quả giải trình tự các gen *Sul2***

GGGCAATGCGGATGGAGCGGTATCTGGCGCCAGACGCAGCCATTGCG  
CAGGCGCGTAAGCTGATGGCCGAGGGGGCAGATGTGATCGACCTCGG

TCCGGCATCCAGCAATCCCGACGCCGCGCCTGTTTCGTCCGACACAGA  
AATCGCGCGTATCGCGCCGGTGTGACGCGCTCAAGGCAGATGGCA  
TTCCCGTCTCGCTCGACAGTTATCAACCCGCGACGCAAGCCTATGCCT  
TGTCGCGTGGTGTGGCCTATCTCAATGATATTCGCGGTTTTCCAGACG  
CTGCGTTCTATCCGCAATTGGCGAAATCATCTGCCAAACTCGTCGTTA  
TGCATTCGGTGCAAGACGGGCAGGCAGATCGGCGCGAGGCACCCGCT  
GGCGACATCATGGATCACATTGCGGGCCTTTTACGCGCGCATCGCG  
GCGCTGACGGGTGCCGGTATCAAACGCAACCGCCTTGTCTTGATCCC  
GGCATGGGGTTTTTTCTGGGGGCTGCTCCCGAAACCTCGCTCTCGGTG  
CTGGCGCGGTTTCGATGAATTGCGGCTGCGCTTCGATTTGCCGGTGCTT  
CTGTCTGTTTCGCGCAAATCCTTTCTGCGCGCGCTCACAGGCCGTGGTC  
CGGGGGATGTCGGGGCCGCGACACTCGCTGCAGAGCTTGCCGCCGCC  
GCAGGTGGAGCTGACTACCCCCCAAACAAAT

**S6. Kết quả giải trình tự các gen *Sul3***

AAACGGCTGCGCTGGTACTGGCGTAACCCTTCCGATCTTTGCCCGTGGCACA  
TGGATGAAACCTACGTGAAGGTCAATGGCCGCTGGGCGTATCTGTACCGGG  
CCGTCGACAGCCGGGGCCGCACTGTCGATTTTTATCTCTCCTCCCGTCGTAAC  
AGCAAAGCTGCATACCGGTTTCTGGGTAATAATCCTCAACAACGTGAAGAAG  
TGGCAGATCCCGCGATTCATCAACACGGATAAAGCGCCCGCCTATGGTCGCG  
CGTTGCTCTGCTCAAACGCGAAGGCCGGTGCCCGTCTGACGTTGAACACCG  
ACAGATTAAGTACCGGAACAACGTGATTGAATGCGATCATGGCAAACCTGAA  
ACGGATAATCGGCGCCACGCTGGGATTTAAATCCATGAAGACGGCTTACGC  
CACCATCAAAGGTATTGAGGTGATGCGTGCCTACGCAAAGGCCAGGCCCTC  
AGCATTTTATTATGGTGTATCCCTGGGCGAAATGCGCCTGGTAAGCAGAGTT  
TTTGAAATGTAAGGCCTTTGAATAAAGACAAAAGGCTGCCTCATCGCTAACTT  
TGCAACAGTGCCCATTTATGAATGTTCTGTTATGGCTTATGTTCAAGAAAG  
CATTGCCCTGAAATGATGGGCAAGGTGTTTTCCCTTTTGATGACCGCCATG  
ACTCTTTCTATGCCGATAGGCTTACTTGTTCAGGTCCGGTTGTTGAGGTTAT  
AGGTGTTAATACATGGTTTTTCTGGTCTGGTGTTCGTTGATAGTAAACGCTG  
TTCTCTGCCGCATTCTGACACGACGCTATGACAAAGTAACAATGAAACCGCA  
AGTGGACTGAAAAAAGGACCGGGTTGATGATAATTTGTAGTGGTGAGCTTCT

**S7. Kết quả giải trình tự các gen kháng tetracycline**

**S7A. *TetA***

NNNNNTNCGGCTGGCTGATTATGCCGGTGTGCGGGCCTCCTGCGCGATCT  
GGTTCACTCGAACGACGTCACCGCCACTATGGCATTCTGCTGGCGCTGTAT  
GCGTTGGTGCAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCGCGCTGTTCGGATCGTT  
TCGGGCGGCGGCCAATCTTGCTCGTCTCGCTGGCCGGCGCCACTGTCGACTA  
CGCCATCATGGCGACAGCGCCTTTCCTTTGGGTTCTCTATATCGGGCGGATC  
GTGGCCGGCATCACCGGGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATATTGCC  
GATATCACTGATGGCGATGAGCGCGCGCGGCACTTCGGCTTCATGAGCGCCT  
GTTTCGGGTTTCGGGATGGTCGCGGGACCTGTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGG  
TTTCTCCCCCACGCTCCGTTCTTCGCCGCGGCAGCCTTGAACGGCCTCAATT  
TCCTGACGGGCTGTTTCCTTTTGCCGGAGTCGCACAAAGGCGAACGCCGGCC  
GTTACGCCGGGAGGCTCTCAACCCGCTCGCTTCGTTCCGGTGGGCCCCGGGGC  
ATGACCGTCGTCGCCGCCCTGATGGCGGTCTTCTTCATCATGCAACTTGTCG  
GACAGGTGCCGGCCGCGCTTTGGGTCATTTTCGGCGAGGATCGCTTTCAGT  
GGACGCGACCACGATCGGCATTTTCGCTTGCCGCATTTGGCATTCTGCATTCA

CTCGCCCAGGCAATGATCACCGGCCCTGTAGCCGCCCGGCTCGGGCGAAAGG  
CGGGCACTCATGCTCGGAATGATTGCCGACGGCACAGGCTACATCCTGCTTG  
CCTTCGCGACACGGGGATGGATGGCGTTCCCGATCATGGTCCTGCTTGCTTC  
GGGTGGCATCGGAATGCCGGCGCTGCAAGCAATGTTGTACCAGGCAGAA

**S7B. TetB**

GAATACCATAGGTGTCACATTTCTAAAATCTGCTGGAGTGCTGGCTGGACTA  
AAAAATTCACCACAGCTAAGAGTGACTTTTACATCTGTAACCTCCCATCCAA  
ATAATCCTTGTTTACTTGTCTTAATAACTGCTTCTTCAATTGCATTTTGAAA  
GATTTTGGCAATGACCCTACTGAAACATTAGAAATATACCTAAGACCTTCGC  
CTCTCCCTGCTGGTTCTATTTCTAAGCCTACTGTCGCCCAAATGGATTTAAG  
TCTTCTGCATATGCATTATTGACGCTCCAAAACCTTTAGGTGTTTCCTTATA  
GATAGTCTCAATATTCGAAAACCTACTTTTATTCCATATAAATCATCTAACA  
TGGAACCTAGTATTTCCATTTGAACTTCACCGAATAAGTTGACATAAATTTCT  
TTATCTATGTCATTCATCTCTAATTCTAGTAGTGGATCTTCTCTGCANGTAA  
TGTTAATGCTTTAAATAGCTCTGGATTTTTTTCTTTATCAATTGCAGAAATTG  
TTGGTTTTAATGCTGGGTTAGCATAGATATATTTTTAATTTTATCATTTGAAA  
TTCCAATAACATCTCCCACTTGGAAACTKGTAAGTCCATATAAAATACCTAT  
ATCCCCGCTTCTATCCTCTGKGCTTCAACAACCTCCCCATTTTCTAACCTAT  
TAAT

**S7C. TetC**

ACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTC  
GCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCG  
TCCTGTGGATCCGGCCATTGGCTGCCTCCCACACTTGGATATGCCTCCTCGG  
AGCCTTATAGAATTGTTTATAAGACTTGCGCATTATTTGACCTCCAATGCGA  
ACAAAGGGAAACCGCTGTGGTCTCCCTTTAGTGAGTTCAATTAATTATCCAC  
GGTCAGAAGTGACCAGTTCGTTCTTCTCCACCAACGCTTAAGGTCGAACGA  
AGGGCAAGCCTTCGGCGCCACCTCATGATGGGCGCGAAGCACAGCGCCTTC  
GTACTTAGCCAGCAGTGTGACAAGCAGTGAGCGAAGGGATTGCATTTGGGC  
TGCGGTAAAGTTAGCGTCGAACTTACCTTTATCGTCGATAACCACCAACAAGG  
CAGACGCCGATAGAGTTGTGGTTGTAACCCTTAGCGTGAGAGCCTACAGCCA  
TCTCATCTCGTCCTGCCTCCACAGTACCGTCTCGCTTGATGATAAAGTGGTAT  
CCCACATCGAGCCAACCCTGCTCTTTGTGCCACTGGCGAATCTCACGGACAC  
CAACATTCTGACTTGGCTTGGTAGCCGAGCAGTGAACAAAGATTGCGTCAGT

**S7D. TetG**

CCATAATGCGGTTCTGTCCGGTCGAGTGCCGGCATGATACGCGCGCCATCGCG  
ATAAGAGAGCAACGCCTTTCTGAAACTCAGGGCGTTTTCTTTCAGGAATACC  
CGCCAATCCTCGTTCTTTCGGGCAACGAGCGCGTATGACGTTCCGTCAACA  
TCGCCTCGGCAAGCGCATCAAGCAGCGCGGTTTTGCTCGGAAAATGCCAGT  
AAAGCGCGGGCTGCTGAACCCTAAGGCGTTCAGCGAGCTTTCGCGTCGTCAG  
GCTGTCCATGCCAACCTCGTTCAGCAGCTCCAGTGCCGCCGCGATCACGGTG  
CCCTTGTCAGTTTTGTTCATTACGTTCCCTTCGCCAGCGCTTGACAATTTATC  
ACTGATAAGTTTAATGTCCACATCCTTATCGTTGATAAAGTCCGCTCGCGTTT  
GAGCGGCGCTGGAGTTTCAGGTGCGCAGCTCTGCCATCATTGCCCTGCTGAT  
CGTCGGTCTCGACGCCATAGGACTCGGCCCTATAATGCCGGTCCCTCCGACG  
CTTCTGCGCGAGCTTGTGCCGGCAGAGCAGGTGCTGGTCACTATGGTGCTT  
TGCTGTGCTCTATGCGTTGATGCAGGTCGTCTGCGCCCCCTACTTGGGCAA  
TTTTCAGATGGTTACGGTCCGGTCCGGTGCTTCTGGCTTCTTTCGGGGGGC  
CGCAGTCGATTACACGATTATGGCATCAGCGCCGGTCTTATGGGTGCTGTAT

ATTGGCCGGCTCATTCTGGCATCACGGGAGCAACCGGAGCTGTAGCTGCCT  
CAACCATTGCCGATTCGACAGGGGAAGGGTCTCGCGCACGCTGGTTCGGCTA  
CATGGGAGCCTGTTATGGGACAGGCATGATTGCCGGGCCAGCACTTGGTGG  
CATGCTCGGTGGTATTTCTGCTCATGCTCCGTTTATCGCCGCTGCCCTTCTAA  
ACGGC

**S7E. TetK**

AGTAGCTGGTTTTATATCAATGGTGCCTTATATGATGAAAACCTATTTATCAT  
GTAAATGTAGCGACAATAGGTAATAGTGTTATTTTTCTGGAACCATGAGTG  
TTATTGTTTTTGGTTATTTTTGGTGGTTTTTTAGTGGATAGAAAAGGATCATT  
TTTGTTTTTATTTTAGGATCATTGTCTATCTCTATAAGTTTTTTAACTATTGCA  
TTTTTTGTTGAGTTTAGTATGTGGTTGACTACTTTTATGTTTATATTTGTTATG  
GGCGAATTATCTTTTACTAAAACAGTTATATCAAAAATAGTATCAAGTAGTC  
TTTCTGAAGAAGAAGTTGCTTCTGGAATGAGTTTGCTAAATTTTACAAGTTTT  
TTATCAGAGGGAACAGGTATAGCAATTGTAGGAGGTTTATTGTCACTACAAT  
TGATTAATCGTAAACTAGTTCTGGAATTTATAAATTATTCTTCTGGAGTGTAT  
AGTAATATTCTGTAGCCATGGCTAACCTTATTATTTAAGTTGTCTTTTGACGA  
TTATTGTATTTAAAACGTTCTGAAAAGCAGTTTGAATAGTTATATTATTTTT  
GGTTTAGAACTATGAGTGGCTAGCATTTTGCCACTCATTTTTTGCGTTAGCAA  
AACAGGTTTAAGCCTCGCAGAGCACACGTATTAACGACTTATTA AAAAATA  
AGTCTAGTGTGTTAGACTTAACTATTA AATACACATAAAAACCTTTGTGCTT  
AGGAGTGATTTTTATATGTCTTATTCCATTGTTAGAGTTTCAAAGTTAAATC  
TGGAACAAATACAACGGGCATACAAAACATGTTCAAAGAGAAAATAATAA  
TTATGAAAATGAAGATATAGACCATAGTAAAACCTTAC

**S7F. TetS**

ATGTTTTTGGAACGCCAGAGAGGTATTACTATTCAGACCGCAATAACATCTT  
TTCAACGGGAAAATGTTAAAGTAAATATTGTAGATACTCCTGGACACATGGA  
TTTTTTGGCAGATGTATAACCGTTCATTATCTGTTTTGGATGGAGCTATTTTGC  
TAATCTCTGCAAAAAGATGGAGTACAGTCACAAACTCGTATACTATTCCATGC  
ACTTAGAAAGATGAACATACCTATAATTTTTTTATTAACAAAATTGATCAA  
AATGGAATAAATTTGCCAGATGTTTATCAAGATATTAAGGACAAAACCTTTCTG  
ACGACATCATAATTAAGCAGACTGTGAATCTAAATTTGAAACCTTATGTAAT  
AGATTATACTGAACCAGAACAATGGGAGACAGTAATTGTGGGAAATGATTA  
TTTATTAGAAAAATATAACCATTGGGAAAACATTGAATATTGCAGAACTTGAA  
AAGGAGGAAAACGAAAGAATTCAAAGTTGCTCCTTATATCCTGTTTATCACG  
GAAGTGCAAAGAATAATATTGGAATTAACAACCTTATAGAGGTAATTACTA  
GCAAATTATTTTACCCACACAACCTCAATTCAGATAAACTTTGTGGAAATGT  
TTTTAAAGTAGAATATTCAGATGATGGTCAACGGCTTGTCTATG

**S8. Kết quả giải trình tự các gen kháng florfenicol**

AAGATTTGCACCGCCCATGTCCGACATGCTGACTATCAGGCTTTGAACGCAGAA  
GTAGAACGCGACCGCTGATCCC GCGATGTCGTCGAACTCTGCCAAAGCGCCGTT  
CGCGGTAACGGACACCGTGAAGACAATACCGACCGCGACAACCCACATCGGTA  
GGATGAAGGTGAAGAATGACGGCGA