

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG DIỆT KHUẨN VÀ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ CỦA AMOXICILLIN VÀ AMOXICILLIN KẾT HỢP CLAVULANIC ACID VỚI VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH TRÊN CÁ RÔ PHI

Trương Đình Hoài*, Trần Thị Diễm Quỳnh, Đặng Thị Hoà, Đỗ Đình Hùng, Võ Văn Việt,
Nguyễn Đức Chính, Nguyễn Thị Hương Giang, Đoàn Thị Ninh, Ngô Phú Thoả, Kim Văn Vạn

Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 25.10.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.01.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá và so sánh khả năng diệt khuẩn và điều trị bệnh của kháng sinh amoxicillin và amoxicillin kết hợp với clavulanic acid cho vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây ra trên cá rô phi. Để thực hiện nghiên cứu, 4 chủng *S. agalactiae* phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh thu ở các trại nuôi miền Bắc năm 2022 và đang lưu giữ trong điều kiện -80°C được lựa chọn để nuôi cấy phục hồi, định danh bằng phương pháp sinh hoá, giám định PCR. Khả năng ức chế vi khuẩn được đánh giá qua kỹ thuật khuếch tán trên thạch và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), hiệu quả điều trị được đánh giá thông qua cảm nhiễm và sử dụng kháng sinh để điều trị và theo dõi tỷ lệ sống sau 14 ngày. Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ cho thấy amoxicillin/clavulanic acid cho kích cỡ vòng vô khuẩn *S. agalactiae* lớn hơn, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 2 µg/ml đối với amoxicillin, giảm xuống 0,25 µg/ml với amoxicillin/clavulanic acid. Kết quả cảm nhiễm và điều trị cho thấy amoxicillin kết hợp với clavulanic acid cho hiệu quả điều trị và tỷ lệ sống cao hơn (91,1%) so với amoxicillin (77,8%). Đây là nghiên cứu đầu tiên so sánh, đánh giá hiệu quả diệt khuẩn và điều trị của amoxicillin khi kết hợp và không kết hợp clavulanic acid trên vi khuẩn gây bệnh ở động vật thủy sản.

Từ khóa: *Streptococcus agalactiae*, amoxicillin, clavulanic acid, diệt khuẩn, hiệu quả điều trị.

Evaluating Bactericidal Effect and Therapeutic Efficacy of Amoxicillin and Amoxicillin Combined with Clavulanic Acid on *Streptococcus agalactiae* Isolated from Diseased Tilapia

ABSTRACT

The study evaluated and compared the bactericidal effect and treatment of the disease of tilapia caused by *Streptococcus agalactiae* with amoxicillin and amoxicillin combined with clavulanic acid. To conduct a study, 4 isolates of *S. agalactiae* isolated from diseased tilapia were selected for identification by biochemical methods and PCR assay. The inhibition ability of antibiotics was evaluated through the diffusion method on agar plate and the minimum inhibitory concentration (MIC). The treatment efficacy was evaluated 14 days post challenge. The results showed that amoxicillin combined with clavulanic acid revealed bigger inhibition zones. The minimum inhibitory concentration of amoxicillin was 2 µg/ml compared to that of only 0.25 µg/ml of amoxicillin and clavulanic acid. The results of treatment experiments showed that amoxicillin combined with clavulanic acid could yielded higher treatment efficacy (91.1%) than those treated with amoxicillin alone (77.8%). This is the first study to compare and evaluate the inhibitory and therapeutic efficacy of amoxicillin with and without clavulanic acid on pathogenic bacteria in aquaculture.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, amoxicillin, clavulanic acid, inhibition, treatment efficacy, tilapia.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, ngành nuôi trồng thủy sản đã không ngừng phát triển và

ngày càng chiếm vị trí quan trọng trong ngành thủy sản nói riêng và kinh tế đất nước nói chung. Trong đó, cá rô phi có nhiều đặc điểm ưu thế, được xem là đối tượng nuôi nước ngọt

chủ lực ở Việt Nam với mục tiêu sản xuất phục vụ xuất khẩu (MARD, 2019). Nghề nuôi cá rô phi phát triển theo hướng thâm canh hóa, nuôi mật độ cao, sử dụng nhiều thức ăn nhằm tăng sản lượng nuôi nhưng luôn đi kèm với gia tăng nhanh lượng chất thải từ hệ thống nuôi dẫn đến ô nhiễm môi trường nước, tích lũy các chất thải hữu cơ. Đây là điều kiện thuận lợi để các loại tác nhân gây bệnh lây lan và bùng phát thành dịch bệnh, gây ảnh hưởng thiệt hại nhiều về kinh tế cho người nuôi. Một trong những bệnh nguy hiểm nhất trên cá rô phi là bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây ra (Trương Đình Hoài & cs., 2014). Bệnh gây tỷ lệ chết cao, trên diện rộng và gây thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế, ảnh hưởng đến sản lượng cá rô phi ở nhiều quốc gia trên toàn thế giới. Tại Việt Nam, bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi nuôi đã được phát hiện từ năm 2009, sau đó được báo cáo ở khắp các vùng trong cả nước (Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương, 2012; Trương Đình Hoài & cs., 2014). Các nghiên cứu về lâm sàng, phân lập và biến đổi mô học cũng đã được nghiên cứu tại Việt Nam (Trương Đình Hoài & cs., 2014).

Để ngăn ngừa và điều trị các bệnh do vi khuẩn trên động vật thủy sản, kháng sinh thường được sử dụng thông qua thức ăn trộn thuốc (Rico & cs., 2013). Một trong các loại kháng sinh được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh thủy sản nói chung và bệnh do *S. agalactiae* nói riêng là amoxicillin (Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài, 2021). Amoxicillin là một kháng sinh thuộc nhóm beta lactam, hoạt phổ kháng khuẩn rộng trên nhiều vi khuẩn, cũng như giá thành hợp lý (Längin & cs., 2009). Tuy nhiên, nhiều loại vi khuẩn, đặc biệt là các loại cầu khuẩn, thường sản sinh enzyme beta-lactamase, làm phân hủy nhanh kháng sinh amoxicillin và giảm tác dụng điều trị. Clavulanic acid là một hoạt chất có liên quan cấu trúc với penicilin và có khả năng bất hoạt nhiều enzyme beta-lactamase do vi khuẩn gây ra (Brown, 1986). Do vậy, kết hợp amoxicillin với clavulanic acid có thể tăng hoạt lực cho kháng sinh, tăng hiệu quả điều trị bệnh vi khuẩn và đã được ứng dụng nhiều trong nhân

y và thú y (Litster & cs., 2012). Tuy nhiên, trong thủy sản các nghiên cứu để đánh giá, so sánh khả năng ức chế và điều trị giữa amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid còn hạn chế. Nghiên cứu này được thực hiện, đánh giá khả năng diệt khuẩn của amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid trên vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh ở các trại nuôi miền Bắc năm 2022; Kháng sinh amoxicillin (AX) và amoxicillin + clavulanic acid (AC, tỷ lệ phối trộn 4:1) được cung cấp bởi VIC Animal Health Ltd, Belarus; cá rô phi khỏe phục vụ thí nghiệm cảm nhiễm, điều trị; Các trang thiết bị, hệ thống bể thí nghiệm, dụng cụ, hóa chất phục vụ nuôi cấy phục hồi, định danh, cảm nhiễm vi khuẩn và điều trị.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy phục hồi và định danh vi khuẩn

Vi khuẩn *S. agalactiae* (04 chủng, ký hiệu ST-RP-HD-3-22; ST-RP-HN-5-22; ST-RP-BN-6-22; ST-RP-BN-7-22) phân lập được từ cá rô phi nhiễm *S. agalactiae* thu ở một số trại nuôi miền Bắc năm 2022 được lưu giữ trong glyceron ở điều kiện -80°C được sử dụng để thực hiện nghiên cứu. Vi khuẩn được nuôi cấy phục hồi và giám định lại bằng phương pháp hình thái, sinh hóa có sử dụng bộ kit thử API 20 Strep và được tách DNA để giám định bằng kỹ thuật PCR, sử dụng đoạn gene đích có kích cỡ 474bp theo phương pháp thực hiện như mô tả của Li & cs. (2010) với DNA chủng đối chứng dương là chủng chuẩn *S. agalactiae* ATCC 51487. Sản phẩm khuếch đại DNA được phân tích trên máy điện di sử dụng bản gel chứa 1,3% agarose được nhuộm bằng dung dịch Redsafe (Intron, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di bản gel được chụp bằng hệ thống Gel imager (Bio-Rad, Mỹ).

2.2.2. Đánh giá khả năng diệt khuẩn của amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid bằng phương pháp kháng sinh đồ

Các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* (n = 4) sau khi được giám định bằng phương pháp PCR, được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế với hai loại kháng sinh AX và AC theo phương pháp kháng sinh đồ (Bauer, 1966).

Vi khuẩn *S. agalactiae* sau khi tăng sinh được pha loãng ở nồng độ 10^6 CFU/ml và cấy đều lên đĩa thạch Mueller Hinton (MHA) sử dụng que rìa bằng bông đã khử trùng. Kháng sinh amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid được nhỏ trực tiếp lên các tấm giấy kháng sinh trắng vô trùng đường kính 6mm ở các nồng độ amoxicillin 10; 15; 20 µg/đĩa lên đĩa môi trường đã cấy vi khuẩn, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C và đo kích thước vòng vô khuẩn sau 36 giờ.

2.2.3. Đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Phương pháp xác định MIC được tiến hành bằng kỹ thuật pha loãng thạch theo mô tả của Wiegand & cs. (2008). Tiến hành pha loãng hai loại kháng sinh AX và AC vào các đĩa môi trường nuôi cấy MHA để đạt dãy các nồng độ 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 µg/ml theo phương pháp và tiêu chuẩn của CLSI M49-A. Vi khuẩn *S. agalactiae* (n = 4) được rìa cấy lần lượt trên môi trường MHA có chứa hai loại kháng sinh ở các nồng độ pha loãng, đĩa đối chứng vi khuẩn được rìa cấy lên môi trường TSA không pha kháng sinh. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh AX và AC được xác định sau 48h nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C theo mô tả của Wiegand & cs. (2008).

2.2.4. Xác định liều gây chết 50% (LD_{50})

Lựa chọn ngẫu nhiên 01 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* (ST-RP-HN-5-22) từ 04 chủng để xác định độc lực liều gây chết 50% trên cá rô phi theo phương pháp tiêm vào xoang bụng. Cá rô phi (n = 315) được đưa vào cảm nhiễm có khối lượng 30-35 g/con, cá được kiểm tra khỏe mạnh và được nuôi thuần dưỡng 1 tuần trong bể nhựa có thể tích 4.000l có sục khí và cho ăn hàng ngày.

Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB ở 28°C, sau đó tiến hành đo mật độ bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 600nm (OD600) và được điều chỉnh về 10^8 CFU/ml kết hợp với nuôi cấy, đếm mật độ trên đĩa thạch. Dịch vi khuẩn sau đó được pha loãng thành các nồng độ (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml) để tiêm cảm nhiễm cho cá kèm theo 1 lô đối chứng (tiêm PBS).

Với mỗi mật độ vi khuẩn, tiến hành tiêm 15 con/bể với lượng 0,1 ml/cá vào xoang bụng và được nuôi theo dõi trong các bể có thể tích 100 lít nước, mỗi mật độ tiêm được bố trí lặp lại 3 lần. Để xác định tỷ lệ chết tích lũy và biểu hiện cá nhiễm bệnh, thí nghiệm được tiến hành theo dõi trong 14 ngày. Duy trì nhiệt độ môi trường nước trong quá trình nuôi sau cảm nhiễm ở mức khoảng 31-33°C, các yếu tố môi trường khác đảm bảo trong giới hạn cho phép và không có sự khác biệt giữa các bể thí nghiệm. Mẫu cá cảm nhiễm sau khi chết được thu để quan sát triệu chứng, bệnh tích, nhuộm Gram, soi tươi quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn trong mô bào và được giám định nhanh bằng PCR để khẳng định lại tác nhân gây bệnh. Liều gây chết 50% cá thí nghiệm (LD_{50} , lethal dose) được xác định theo công thức của Reed & Muench (1938).

2.2.5. Phương pháp cảm nhiễm và điều trị

Chủng vi khuẩn (ST-RP-HN-5-22) sau khi được xác định liều gây chết 50% được sử dụng để cảm nhiễm và tiến hành các phác đồ điều trị. Tổng số 12 bể thí nghiệm chứa 100l nước được sử dụng, mỗi bể chứa 15 cá rô phi. Thí nghiệm được bố trí gồm 4 lô: Lô TN1: đối chứng (-) chỉ tiêm PBS; Lô TN2 đối chứng (+) tiêm vi khuẩn liều LD_{50} , nhưng không điều trị; Lô TN3: tiêm vi khuẩn liều LD_{50} và điều trị bằng amoxicillin và Lô TN4: tiêm vi khuẩn liều LD_{50} và điều trị bằng amoxicillin kết hợp clavulanic acid (Hình 1). Khi phát hiện cá bắt đầu xuất hiện dấu hiệu bất thường của bệnh, tất cả các lô được khử trùng nước bằng BKC với liều 0,5 ml/m³ và tiến hành các phác đồ điều trị ở lô TN3 và TN4. Kháng sinh AX (40 mg/kg cá) và AC (40 mg/kg cá) được trộn vào thức ăn và cho ăn trong 5 ngày. Sau khi kết thúc liệu trình điều trị, các bể

Đánh giá khả năng diệt khuẩn và hiệu quả điều trị của amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi

thí nghiệm sẽ được khử khuẩn lại bằng BKC với liều lượng tương đương liều ban đầu.

Hàng ngày kiểm tra và theo dõi các thông số môi trường nhiệt độ, pH, DO được đo hàng ngày bằng máy đo môi trường đa năng (YSI, Mỹ), $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ đo 3 ngày/lần bằng kit đo nhanh (Sera, Đức). Biểu hiện của cá và số lượng cá chết được theo dõi và kiểm tra hàng ngày. Với các mẫu cá mới chết hoặc sắp chết, tiến hành giải phẫu quan sát triệu chứng bệnh tích, nhuộm gram soi tươi mẫu mô để đánh giá sự xâm nhiễm của vi khuẩn ở các hệ cơ quan và giám định lại bằng kỹ thuật PCR. Sau 14 ngày, hiệu quả điều trị được đánh giá thông qua tỷ lệ sống của cá rô phi ở các lô.

2.2.6. Xử lý số liệu

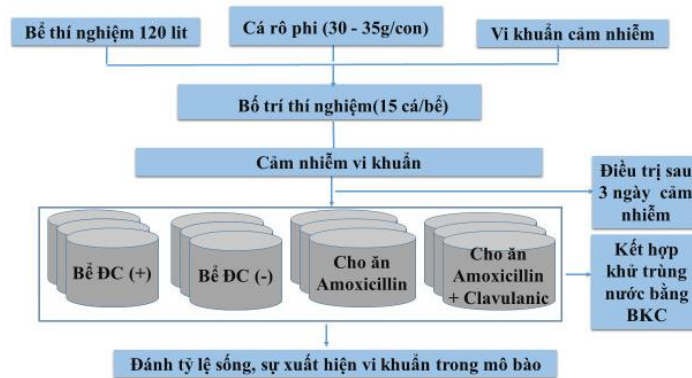
Các số liệu về tỷ lệ cá chết tích lũy trong quá trình cảm nhiễm, mức độ kháng, nhạy của vi khuẩn với từng loại kháng sinh được thống kê mô tả bằng phần mềm Excel 2016, giá trị trung bình của đường kính vòng vô khuẩn giữa hai loại kháng sinh được so sánh bằng kiểm định T-test,

so sánh tỷ lệ sống của cá rô phi ở các lô thí nghiệm được phân tích Chi-square bằng phép thử Fisher's Exact Test trên phần mềm SPSS 20.

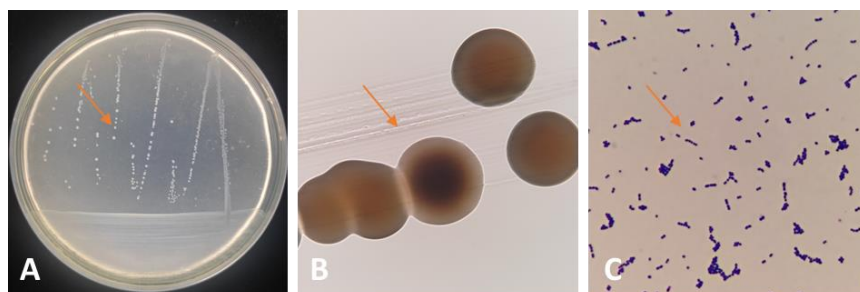
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nuôi cấy phục hồi và định danh vi khuẩn

Tất cả 04 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ mẫu cá rô phi có biểu hiện lồi mắt, xuất huyết đặc trưng thu ở một số trại nuôi miền Bắc năm 2022 và đang lưu giữ trong điều kiện -80°C đã được nuôi cấy phục hồi thành công trên môi trường thạch TSA. Sau 24h nuôi cấy, các chủng vi khuẩn thuần có các đặc điểm hình thái, sinh hoá tương đồng nhau. Khuẩn lạc vi khuẩn có màu trắng, hình tròn, kích cỡ nhỏ, khoảng 0,1-0,5mm, phát triển sau 36h nuôi cấy. Vi khuẩn thuần thuộc nhóm Gram (+), hình cầu với đường kính khoảng 0,5-1 μm , liên kết với nhau thành cặp hoặc dạng chuỗi ngắn, không di động (Hình 2).



Hình 1. Sơ đồ thực hiện thí nghiệm theo dõi hiệu quả điều trị bệnh của kháng sinh



Ghi chú: (A): Khuẩn lạc vi khuẩn trên đĩa TSA; (B): Khuẩn lạc vi khuẩn; (C)-Hình dạng vi khuẩn khi nhuộm Gram.

Hình 2. Vi khuẩn thuần phát triển khi được nuôi cấy phục hồi trên thạch TSA

Bảng 1. Đặc tính hình thái và sinh hoá của vi khuẩn phân lập từ mẫu cá rô phi

Chỉ tiêu hình thái, sinh hoá	Chủng sử dụng trong nghiên cứu (n = 4)	Chủng chuẩn <i>S. agalactiae</i> ATCC 51487
Gram	(+)	(+)
Di động	-	-
Hình dạng	Liên cầu	Liên cầu
VP (Voges Proskauer)	+	+
HIP (HIPpuric acid)	+	+
ESC (ESCulin)	-	-
PYRA (PYRrolidonyl Arylamidase)	-	-
α GAL (α -GALactosidase)	-	-
β GUR (β -GIUcRonidase)	-	-
β GAL (β -GALactosidase)	-	-
PAL (ALKaline Phosphatase)	+	+
LAP (Leucine AminoPeptidase)	+	+
ADH (Arginine DiHydrolase)	+	+
RIB (RIBose)	+	+
ARA (ARABinose)	-	-
MAN (MANnitol)	-	-
SOR (SORbitol)	-	-
LAC (LACtose)	-	-
TRE (TREhalose)	+	+
INU (INUlin)	-	-
RAF (RAFfinose)	-	-
AMD (AmiDon)	-	-
GLYG (GLYcoGen)	-	-

Các đặc tính sinh hóa của 04 chủng *S. agalactiae* khi thử bằng kit API 20 Strep (Bảng 1). Các đặc điểm hình thái, sinh hoá của các chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu đều tương đồng với kết quả ghi nhận được đối với chủng chuẩn *S. agalactiae* ATCC 51487. Kết quả giám định bằng PCR 04 chủng vi khuẩn đều dương tính với *S. agalactiae*, khi điện di cho vạch DNA ở vị trí 474bp, trùng với vạch DNA của chủng đối chứng dương *S. agalactiae* ATCC 51487 (Hình 3). Kết quả giám định PCR khẳng định 4 chủng này là *S. agalactiae*.

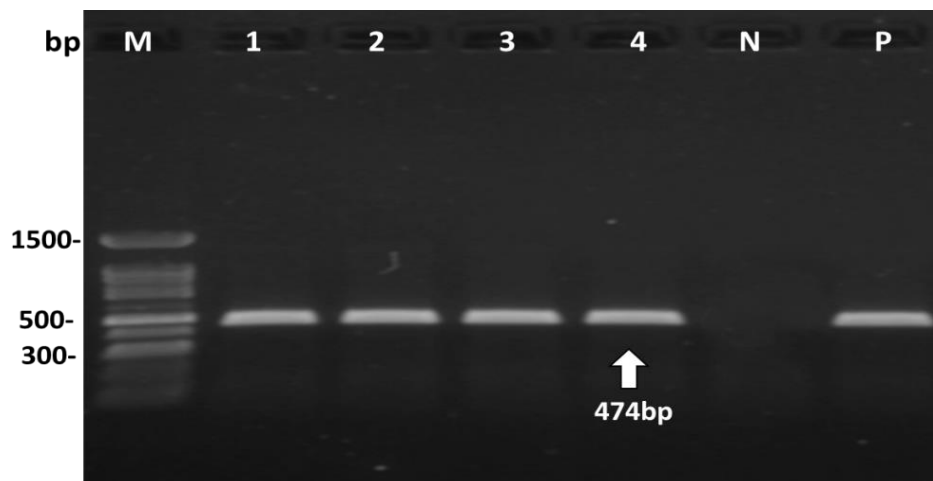
3.2. Kết quả kháng sinh đồ của kháng sinh amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid đối với *S. agalactiae*

Vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi có mức độ nhạy khá cao đối với cả 2 loại kháng sinh amoxicillin và kháng sinh kết hợp amoxicillin - clavulanic acid. Đối với kháng sinh

amoxicillin, đường kính vòng vô khuẩn trung bình của 4 chủng là 24,7mm; 25,5mm; 29,0mm, tương ứng với các nồng độ 10 μ g; 15 μ g và 20 μ g. Khi sử dụng kháng sinh kết hợp amoxicillin - clavulanic acid, ở cùng nồng độ kháng sinh, đường kính vòng vô khuẩn đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với khi sử dụng kháng sinh amoxicillin, đạt 26,5mm ở nồng độ 10 μ g/đĩa; 29,2mm ở nồng độ 15 μ m/đĩa và 34,3mm ở nồng độ 20 μ g/đĩa (Bảng 2 và Hình 4).

Như vậy, khả năng ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* của kháng sinh kết hợp amoxicillin - clavulanic acid cao hơn so với kháng sinh amoxicillin. Kết quả này hoàn toàn phù hợp và tương đồng với các nghiên cứu trước. Mặc dù clavulanic acid chỉ có hoạt tính kháng khuẩn yếu, nhưng khi bổ sung clavulanic acid vào amoxicillin đã làm tăng khả năng diệt khuẩn của amoxicillin đối với các loài vi khuẩn có khả năng sản xuất enzyme β -lactamase (Todd & Benfield, 1990).

Đánh giá khả năng diệt khuẩn và hiệu quả điều trị của amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi



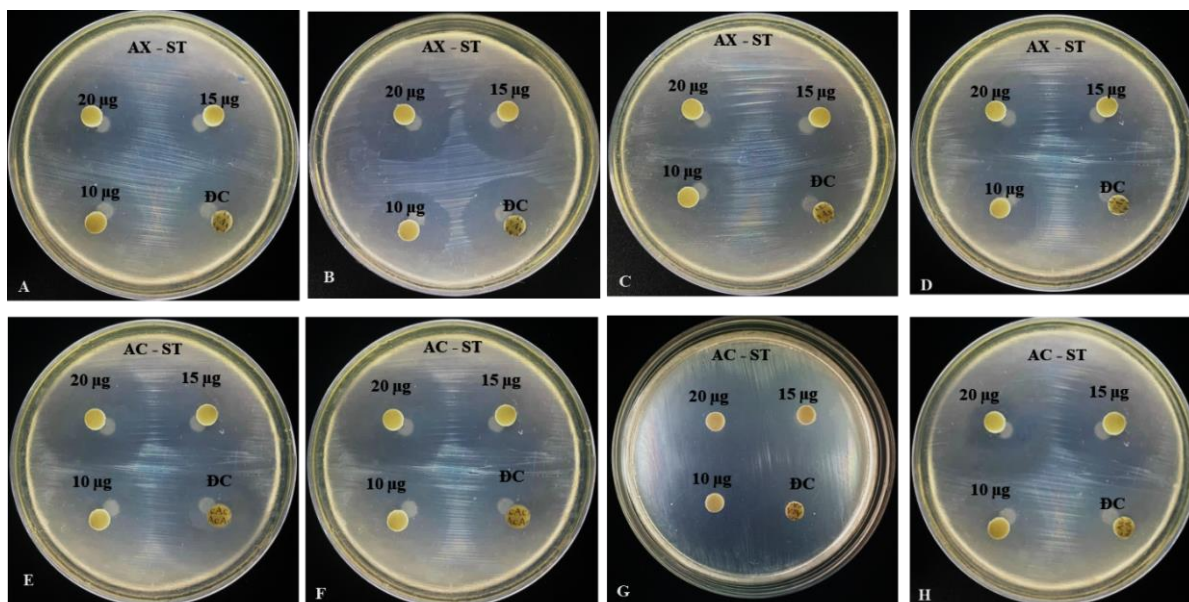
Ghi chú: M: Marker, giếng 1-4: 04 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* trong nghiên cứu; N: Đối chứng âm; P: Đối chứng dương.

Hình 3. Kết quả giám định PCR các chủng vi khuẩn *S. agalactiae*

Bảng 2. Kết quả thử kháng sinh đồ của kháng sinh amoxicillin và kháng sinh kết hợp amoxicillin - clavulanic acid trên các chủng *S. agalactiae* (n = 4)

Tên kháng sinh	Nồng độ kháng sinh/đĩa (µg)		
	10	15	20
Amoxicillin (AX)	24,7 ^a ± 0,7	25,5 ^a ± 0,9	29,0 ^a ± 0,8
Amoxicillin/Clavulanic (AC)	26,5 ^b ± 1,2	29,2 ^b ± 1,1	34,3 ^b ± 1,3

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Ghi chú: Kết quả kháng sinh đồ của kháng sinh amoxicillin (A-D) và amoxicillin kết hợp clavulanic acid (E-H) với vi khuẩn *S. agalactiae*.

Hình 4. Hình ảnh thử kháng sinh đồ trong nghiên cứu

Bảng 3. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của amoxicillin (AX) và amoxicillin kết hợp clavulanic acid

Chủng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (μg)									
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Kháng sinh amoxicillin										
ST-RP-HD-3-22	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ST-RP-HN-5-22	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ST-RP-BN-6-22	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ST-RP-BN-7-22	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Kháng sinh amoxicillin kết hợp clavulanic acid										
ST-RP-HD-3-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST-RP-HN-5-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST-RP-BN-6-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST-RP-BN-7-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Chú thích (+) : Vi khuẩn phát triển; (-) : Vi khuẩn không phát triển.

3.3. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh amoxicillin (AX) và kháng sinh kết hợp amoxicillin - clavulanic acid đối với vi khuẩn *S. agalactiae*

Trên môi trường nuôi cấy MHA, khi không bổ sung kháng sinh (đối chứng), cả 4 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* thử nghiệm đều phát triển tốt. Tuy nhiên, khi bổ sung kháng sinh ở các nồng độ pha loãng khác nhau vào môi trường nuôi cấy, sự phát triển của vi khuẩn có khác biệt rõ rệt.

Đối với môi trường nuôi cấy có bổ sung kháng sinh amoxicillin, vi khuẩn phát triển bình thường ở các nồng độ 0,125 μg ; 0,25 μg ; 0,5 μg ; 1 μg . Tuy nhiên ở nồng độ kháng sinh từ 2 μg vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn và không quan sát được sự xuất hiện của khuẩn lạc trên đĩa thạch nuôi cấy (Bảng 3, Hình 5A; B; C). Như vậy có thể thấy nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của amoxicillin đối với vi khuẩn *S. agalactiae* là 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Đối với môi trường nuôi cấy bổ sung kháng sinh amoxicillin kết hợp với clavulanic acid, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) giảm rõ rệt. Cả 4 chủng vi khuẩn chỉ phát triển được ở môi trường có nồng độ kháng sinh 0,125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ và bị ức chế hoàn toàn khi môi trường nuôi bổ sung kháng sinh ở nồng độ từ 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trở lên (Bảng 2,

Hình 5D; E; F). Kết quả cho thấy kháng sinh amoxicillin kết hợp với clavulanic acid có tác dụng làm tăng độ nhạy với vi khuẩn *S. agalactiae* so với kháng sinh amoxicillin, giá trị MIC của amoxicillin kết hợp với clavulanic acid giảm xuống còn 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ so với 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ của amoxicillin.

Một nghiên cứu liên quan của Woo & cs. (2021), phân tích về độ nhạy của kháng sinh với vi khuẩn *Streptococcus parauberis* phân lập từ cá biển. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng được nghiên cứu kháng penicillin và ampicillin (1,2%), tetracycline (68,7%), oxytetracycline (72,3%), doxycycline (53,0%) và erythromycin (37,3%), nhưng đều nhạy với amoxicillin/clavulanic. Mặc dù, Woo & cs. (2021) không so sánh mức độ kháng giữa AX và AC, tuy nhiên kết quả nghiên cứu cho thấy bổ sung Clavulanic acid đã giúp cho việc trị bệnh *Streptococcus* sp. có hiệu quả tốt hơn các loại kháng sinh khác. Nghiên cứu của Darwish & cs. (2003) về đánh giá hiệu quả của amoxicillin trong kiểm soát *S. iniae* ở cá vược cho thấy MIC dao động lớn từ 0,0156-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, biến thiên lớn so với MIC = 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ của amoxicillin đối với 4 chủng *S. agalactiae* trong nghiên cứu này, sự khác biệt về MIC có thể do loài vi khuẩn khác nhau, số lượng chủng nghiên cứu khác nhau.

Đánh giá khả năng diệt khuẩn và hiệu quả điều trị của amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi

3.4. Xác định LD₅₀ của vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi

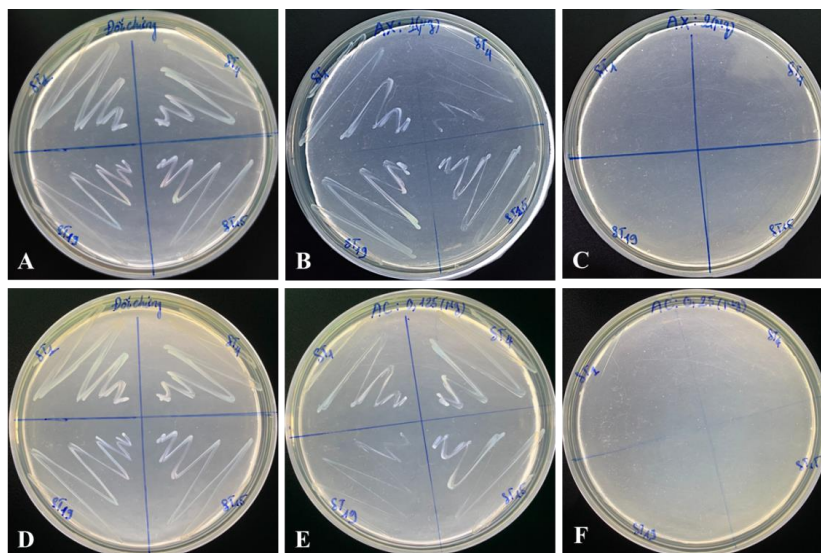
Kết quả theo dõi diễn biến sau cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* cho thấy xu hướng gây chết ở mật độ cao nhất (10^7 CFU/cá), cá chết rất nhanh ngay sau khi tiêm, tỷ lệ chết đạt đến mức 35,6% sau 24h tiêm, tỷ lệ chết đạt mức 100% sau 3 ngày tiêm. Ở mật độ tiêm thấp hơn, 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 và 10^2 CFU/cá, cá có xu hướng chết chậm dần, tỷ lệ chết sau 14 ngày theo dõi lần lượt là 88,9; 75,6; 53,3; 46,7 và 33,3%. Giá trị LD₅₀ thu được của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* (ST-RP-HN-5-22) trên cá rô phi đạt mức $3,2 \times 10^3$ CFU/cá. Thực hiện giải phẫu, kiểm tra cá thí nghiệm cho thấy ở lô đối chứng cá vẫn khỏe mạnh, không chết và không có các dấu hiệu bệnh lý bất thường nào. Trong khi đó ở các lô gây nhiễm, tất cả các mẫu cá chết hoặc gần chết từ sau 3 ngày tiêm cá đều có biểu hiện: bỏ ăn, tách đàn, bơi xoắn vặn, đen thân, xuất huyết da, gớt vảy. Một số mẫu cá chết ở giai đoạn khoảng sau 4 ngày gây cảm nhiễm có biểu hiện mắt mờ đục; lồi mắt, nội tạng sưng, xuất huyết hoặc xuất hiện dịch viêm (Hình 7).

Khả năng gây bệnh và mức độ độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi đã được nhiều tác giả trên thế giới nghiên cứu, Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn (2009)

sử dụng vi khuẩn *S. agalactiae* tiêm cho cá rô phi và tìm được giá trị LD₅₀ khoảng $3,97 \times 10^5$ CFU/ml. Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương (2012) khi nghiên cứu khả năng gây bệnh của vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá điêu hồng cũng thu được kết quả LD₅₀ là $4,89 \times 10^4$ CFU/ml. Sự sai khác về LD₅₀ ở các nghiên cứu so với nghiên cứu này có thể do độc lực của chủng vi khuẩn sử dụng, sự khác biệt về điều kiện môi trường, đặc biệt là nhiệt độ trong quá trình cảm nhiễm.

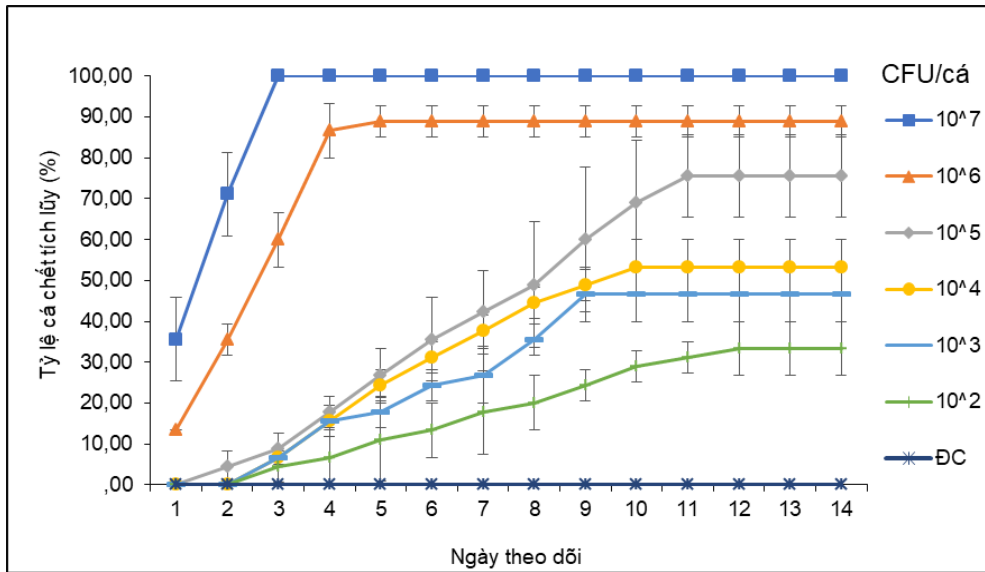
3.5. Kết quả cảm nhiễm và điều trị

Trong suốt thời gian thí nghiệm, các yếu tố môi trường tương đối ổn định do hệ thống thí nghiệm được kiểm soát chặt chẽ. Nhiệt độ đo được tại các bể thí nghiệm đều nằm trong khoảng từ 30-32°C, theo Balarin & Haller (1982) nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng và phát triển ở cá rô phi là 20-35°C. Ngoài ra, nhiệt độ từ 31-33°C cũng là điều kiện phù hợp cho sự phát triển và gây bệnh của *S. agalactiae* (Trương Đình Hoài & cs., 2014). Một số thông số môi trường nước khác như hàm lượng oxy hòa tan được giữ ở mức 5,9-6,5 mg/l, pH 7,1-8,2, NH₃/NH₄⁺ 0-0, 5 mg/l phù hợp với sự sinh trưởng và phát triển của cá rô phi (Phillipart & Ruwet, 1982).

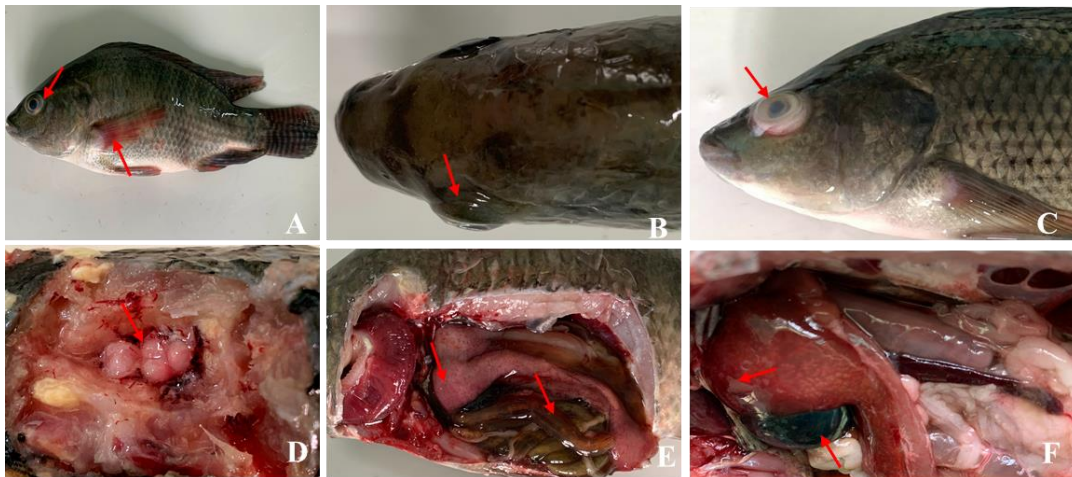


Ghi chú: Vi khuẩn trên môi trường TSA không bổ sung kháng sinh (A, D), có kháng sinh amoxicillin (B),(C); và có kháng sinh amoxicillin kết hợp clavulanic acid (E),(F).

Hình 5. Kết quả thử MIC trên 04 chủng *S. agalactiae*



Hình 6. Tỷ lệ chết tích lũy của cá sau khi tiêm cảm nhiễm chủng vi khuẩn *S. agalactiae*



Ghi chú: (A): Cá xuất huyết gốc vây, lồi mắt (mũi tên); (B- C): Cá lồi mắt, đục mắt; (D): Não xuất huyết (mũi tên); (E): Ruột, gan xuất huyết (mũi tên); (F): Gan tụ huyết, mật sưng.

Hình 7. Triệu chứng và bệnh tích cá nhiễm bệnh

Kết quả cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* bằng phương pháp tiêm LD₅₀ cho thấy sau 48-56h tiêm cảm nhiễm, cá bắt đầu xuất hiện các triệu chứng bệnh như bơi lơ đãng, giảm ăn. Các phác đồ điều trị được thực hiện ngay 60h sau cảm nhiễm. Các bể được khử trùng và hai lô cá điều trị được sử dụng kháng sinh amoxicillin và kháng sinh kết hợp amoxicillin - clavunanic acid. Diễn biến tỷ lệ cá chết tích lũy ở các lô thí nghiệm được thể hiện ở hình 8.

Với lô đối chứng dương (cá được tiêm cảm nhiễm nhưng không điều trị), cá bắt đầu chết

sau 72h cảm nhiễm, tỷ lệ chết tăng dần và tỷ lệ sống sau 14 ngày của thí nghiệm là 48,9%. Khi tiến hành nhuộm tươi gan, thận, não của cá chết có xuất hiện vi khuẩn *S. agalactiae* với mật độ cao trong mô bào (Hình 10A). Đối với lô không cảm nhiễm vi khuẩn, không ghi nhận cá chết, tỷ lệ sống của cá đạt 100% sau 14 ngày thí nghiệm và không xuất hiện vi khuẩn trong mô gan, thận, não khi nhuộm tươi (Hình 10B).

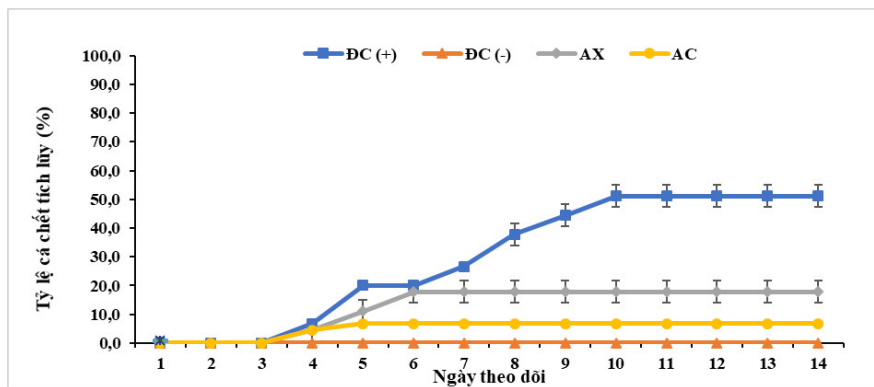
Trong khi đó, các lô cảm nhiễm vi khuẩn được điều trị bằng kháng sinh đều có tỷ lệ sống của cá sau thí nghiệm (77,8-91,1%) cao hơn so

Đánh giá khả năng diệt khuẩn và hiệu quả điều trị của amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi

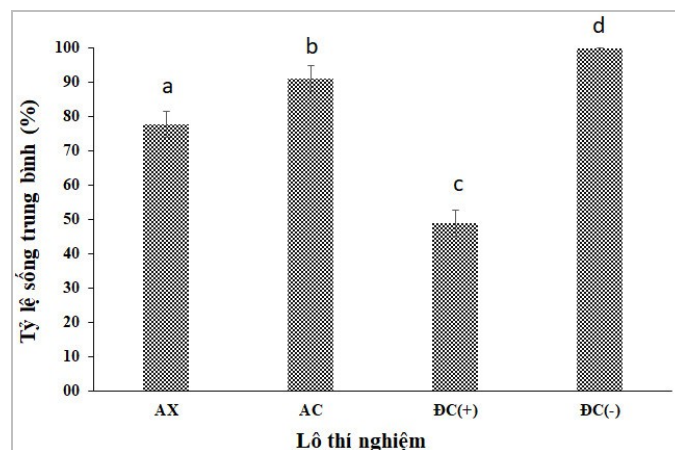
với lô cảm nhiễm không điều trị ($P < 0,05$). Tỷ lệ sống của rô phi ở lô điều trị kháng sinh amoxicillin kết hợp clavulanic acid cao hơn so với lô cá được điều trị với kháng sinh amoxicillin ($P < 0,05$). Cá ở lô được điều trị amoxicillin kết hợp clavulanic acid hồi phục nhanh, hoạt động bình thường sau 3 ngày điều trị, khi tiến hành nhuộm tươi các mô gan, thận, não sau quá trình thí nghiệm không còn phát hiện vi khuẩn cảm nhiễm tồn tại trong cơ thể cá (Hình 10C). Đối với lô điều trị bằng kháng sinh amoxicillin, ngoài hiệu quả điều trị bệnh thấp hơn, kết quả nhuộm Gram mô gan, thận, não của cá sau thời gian theo dõi điều trị vẫn còn phát hiện rải rác một lượng nhỏ vi khuẩn *S. agalactiae* xuất hiện trong mô bào (Hình 10D). Như vậy, kết quả điều trị thử nghiệm cho thấy lô thí nghiệm điều trị bằng AC có hiệu quả cao hơn và diệt khuẩn triệt

để hơn so với lô thí nghiệm điều trị bằng amoxicillin và lô thí nghiệm không điều trị.

Hiện nay việc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *S. agalactiae* trên cá nước ngọt đã được nghiên cứu trong đó amoxicillin thường được sử dụng với liều 40 mg/kg cá (Chardin & cs., 2009; Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài, 2021). Tuy nhiên, bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* thường hay bị tái nhiễm sau quá trình điều trị do vi khuẩn tồn tại lâu trong môi trường nước, do khả năng diệt khuẩn của kháng sinh chưa triệt để hoặc vi khuẩn kháng với loại kháng sinh sử dụng trong điều trị. Kết quả đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu của AC so với AX và hiệu quả điều trị thu được từ nghiên cứu này là thông tin quan trọng và hữu ích để xây dựng các phác đồ điều trị phù hợp nhằm nâng cao hiệu quả điều trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

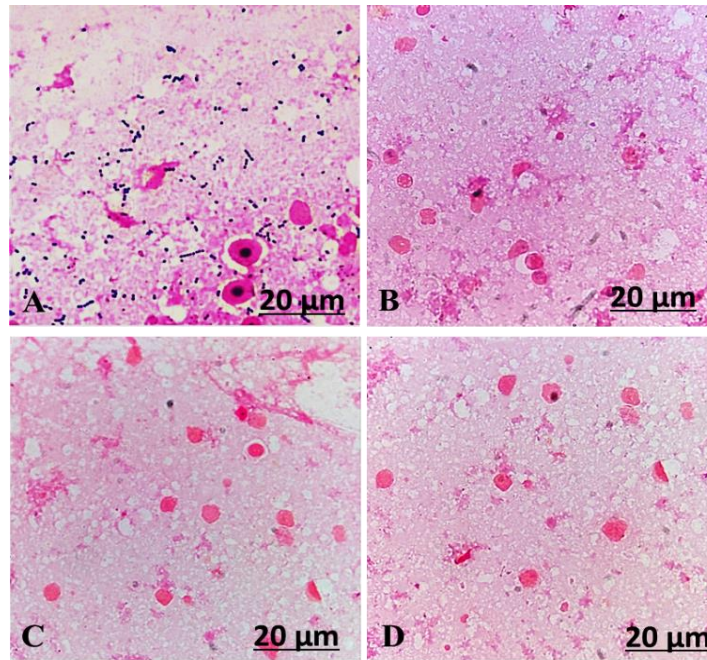


Hình 8. Diễn biến tỷ lệ chết tích lũy của cá ở các lô thí nghiệm trong 14 ngày theo dõi



Ghi chú: AX: Lô điều trị sử dụng amoxicillin; AC: Lô điều trị sử dụng amoxicillin kết hợp clavulanic acid; ĐC (+): Lô cảm nhiễm không điều trị; ĐC (-): Lô tiêm bằng PBS, không điều trị.

Hình 9. Tỷ lệ sống của cá rô phi trong các lô thí nghiệm



Ghi chú: (A): Lô đối chứng (+); (B): Lô đối chứng (-); (C): Lô điều trị bằng kháng sinh amoxicillin kết hợp clavulanic acid; (D): Lô điều trị bằng kháng sinh amoxicillin.

Hình 10. Hình ảnh nhuộm tươi mô thận của cá từ các lô thí nghiệm ở ngày thứ 14

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy việc bổ sung acid clavulanic đã làm tăng hiệu quả diệt khuẩn của amoxicillin đối với vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi thông qua đánh giá kết quả kháng sinh đồ và nồng độ ức chế tối thiểu. Ở quy mô phòng thí nghiệm, amoxicillin được bổ sung acid clavulanic với tỷ lệ phối trộn 4:1 với liều lượng 40 mg/kg cá đã giúp tăng hiệu quả điều trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* và nâng cao tỷ lệ sống cho các rô phi. Tuy nhiên, cần tiếp tục thử nghiệm các công thức và tỉ lệ phối trộn giữa amoxicillin và acid clavulanic để đạt hiệu quả tối ưu và giảm được lượng acid clavulanic

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.05-2020.18. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của nhóm sinh viên, học viên cao học Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balarin J.A. & Haller R.D. (1982). The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. Recent advances in aquaculture. pp. 266-355.
- Bauer A. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J clin pathol. 45:149-158.
- Brown A.G. (1986). Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor--a case study in drug discovery and development. Drug design and delivery. 1(1): 1-21.
- Chardin H., Yasukawa K., Nouacer N., Plainvert C., Aucouturier P., Ergani A., Descroix V., Toledo-Arenas R., Azerad J. & Bouvet A. (2009). Reduced susceptibility to amoxicillin of oral *Streptococci* following amoxicillin exposure. Journal of medical microbiology. 58(8): 1092-1097.
- Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương (2012). Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điều hồng (*Oreochromis* sp.) gây bệnh mù mắt và xuất huyết. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. tr. 203-212.
- Darwish A.M., & Ismaiel A.A. (2003). Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. Journal of Aquatic Animal Health. 15(3): 209-214.

- Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài. (2021). Tác nhân gây bệnh đốm đỏ mắt ở cá trắm đen (*Mylopharyngodon piceus*) và kết quả điều trị. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 28(6): 52-58.
- Längin A., Alexy R., König A. & Kümmerer K. (2009). Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere*. 75(3): 347-354.
- Li J., Ye X., Lu M., Deng G., Tian Y., Jiang X. & Li J. (2010). Rapid identification of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* with duplex PCR assay. *Journal of Hunan Agricultural University*. 36(4): 449-452.
- Litster A.L., Wu C.C. & Constable P.D. (2012). Comparison of the efficacy of amoxicillin-clavulanic acid, cefovecin, and doxycycline in the treatment of upper respiratory tract disease in cats housed in an animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 241(2): 218-226.
- MARD (2019). Decision to approve the plan of tilapia farming development by 2020, driven by 2030. Ministry of Agriculture and Rural Development, Vietnam (MARD).
- Reed L.J. & Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoint. *American Journal of Hygiene*. 27: 493-497.
- Rico A., Phu T.M., Satapornvanit K., Min J., Shahabuddin A.M., Henriksson P.J., Francis J.M., David C.L., Anders D. & Van den Brink P.J. (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*. 412: 231-243.
- Rattanachaikunsopon P. & Phumkhachorn P. (2009). Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of bioscience and bioengineering*. 107(5): 579-582.
- Todd P.A. & Benfield P. (1990). Amoxicillin/clavulanic acid: an update of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*. 39: 264-307.
- Trương Đình Hoài, Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Thị Mai Phương & Nguyễn Thị Hậu (2014). Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* sp. nuôi tại một số tỉnh miền bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 12(3): 360-371.
- Trương Đình Hoài, Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Hậu (2014). Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* sp. nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 12(3): 360-371.
- Wiegand I., Hilpert K. & Hancock R.E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 3(2): 163-175.
- Philippart J.C. & Ruwet J.C. (1982). Ecology and distribution of tilapias. In *The Biology and Culture of Tilapias* (Eds. R.S.V. Pullin and R.H. Lowe-McConnell). ICLARM, Manila, Philippines. pp. 15-60.
- Woo S.J., Do M.Y., Jeong M.G., Kim N.Y. & Kim M.S. (2021). Prevalence, antibiotic susceptibility and serotyping of *Streptococcus parauberis* isolates from diseased marine fish. *Aquaculture Research*. 52(12): 6525-6536.