

Efficacy of florfenicol for control of mortality associated with
Flavobacterium columnare in tilapia

Thinh H. Nguyen*, & Hue N. D. Truyen

Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research paper

Received: November 11, 2017

Revised: January 15, 2018

Accepted: January 22, 2018

Keywords

Flavobacterium columnare

Florfenicol

Tilapia

*Corresponding author

Nguyen Huu Thinh

Email: nhthinh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The efficacy of florfenicol for control of mortality associated with *Flavobacterium columnare* was studied in tilapia. *F. columnare* T3-8/10 strain used for infection was tested for virulence by bath challenge to tilapia (body weight: BW 14 - 16 g) and antimicrobial sensitivity test. The results showed LD₅₀ of this bacterial strain was 4.8×10^4 CFU/mL and it was sensitive to florfenicol. Experiment for control mortality caused by the bacterium in tilapia (BW 18 - 20 g) was designed with four treatments including negative control (uninfected fish), positive control, NT10 and NT15 (infected with LD₅₀). Just after infection, fish in positive control, NT10 and NT15 treatments were treated with florfenicol at doses of 0, 10 and 15 mg/kg BW/day for 10 days, respectively, by feeding fish with medicated feed. Mortality of fish in positive control treatment after 14 days of infection was $54.0 \pm 5.47\%$ and statistically different in comparison with those in negative control, NT10 and NT15 treatments were 0.0, 3.0 ± 4.72 and $2.60 \pm 2.51\%$, respectively ($P < 0.05$). Fish in NT10 and NT15 treatments were sampled for testing florfenicol residue in the flesh at day 1, 16, 20 and 24 after treatment. The results showed florfenicol residue levels in the flesh of sampled fish at all testing timepoints were significantly lower in comparison with the safe concentration lower than 1000 ppb regulated by the Ministry of Agriculture and Rural Development of Vietnam.

Cited as: Nguyen, T. H., & Truyen, H. N. D. (2018). Efficacy of florfenicol for control of mortality associated with *Flavobacterium columnare* in tilapia. *The Journal of Agriculture and Development* 17(4), 76-85.

Đánh giá hiệu quả kiểm soát tỷ lệ chết trên cá rô phi nhiễm *Flavobacterium columnare* bằng florfenicol

Nguyễn Hữu Thịnh & Truyen Nhã Định Huệ

Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 11/11/2017
 Ngày chỉnh sửa: 15/01/2018
 Ngày chấp nhận: 22/01/2018

Từ khóa

Cá rô phi
Flavobacterium columnare
 Florfenicol

Tác giả liên hệ

Nguyễn Hữu Thịnh
 Email: nhthinh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu hiệu quả của florfenicol trong kiểm soát tỷ lệ chết do *Flavobacterium columnare* được thực hiện trên cá rô phi. Chủng *F. columnare* T3-8/10 sử dụng cảm nhiễm cá với liều gây chết LD₅₀ cá rô phi thí nghiệm (14 – 16 g/cá) bằng phương pháp tẩm là $4,8 \times 10^4$ CFU/mL và nhạy cảm với florfenicol. Thí nghiệm kiểm soát bệnh do *F. columnare* trên cá (18 – 20 g/cá) có bốn nghiệm thức gồm đối chứng âm ĐC(-) không gây nhiễm; đối chứng dương ĐC(+), NT10 và NT15 gây nhiễm với liều LD₅₀. Ngay sau khi gây nhiễm, cá ở ĐC(+), NT10 và NT15 được cấp florfenicol với liều tương ứng 0, 10 và 15 mg/kg thể trọng cá/ngày trong 10 ngày qua việc cho cá ăn thức ăn trộn sẵn kháng sinh. Tỷ lệ cá chết sau 14 ngày gây nhiễm ở ĐC(+), NT10 và NT15 lần lượt là 0,0, 3,0 ± 4,72 và 2,60 ± 2,51% ($P < 0,05$). Cá ở NT10 và NT15 được thu mẫu kiểm tra dư lượng florfenicol trong cơ thịt vào các ngày 1, 16, 20 và 24 sau khi ngưng cấp florfenicol. Dư lượng florfenicol trong cơ thịt cá ở tất cả các thời điểm thu mẫu đều thấp hơn rất nhiều so với mức 1000 ppb quy định bởi Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn Việt Nam.

1. Đặt Vấn Đề

Bệnh do *Flavobacterium columnare* đã xảy ra ít nhất trên 36 loài cá nuôi khắp thế giới, bao gồm nhiều loài cá nuôi có giá trị kinh tế quan trọng như cá da trơn Mỹ, cá hồi vân, cá tra và cá rô phi (Edward, 2000). Tại Việt Nam, bệnh do *F. columnare* cũng xảy ra và gây tổn thất lớn cho nghề nuôi cá tra thâm canh (Tu & ctv. 2012). Bệnh này cũng đã ảnh hưởng nghiêm trọng trên cá rô phi nuôi. Cá tra, rô phi thường bị hao hụt rất lớn sau khi cá bị xây xát do vận chuyển hoặc do thay đổi điều kiện môi trường đột ngột do cơn mưa lớn và kéo dài. Khi nhiễm bệnh này, cá chết nhanh trong thời gian từ 2 - 4 ngày sau khi có biểu hiện bệnh lý. Tỷ lệ cá chết khoảng 80 - 100% đối với cá ương trong bể và 35 - 60% nuôi ở ao đất (Tu & ctv., 2012).

Florfenicol là kháng sinh phổ rộng có thể dùng trong điều trị và làm giảm tỉ lệ chết do nhiều loại bệnh trên cá như bệnh viêm ruột và nhiễm trùng huyết trên cá da trơn Mỹ do *Edwardsiella ictaluri* (McGinnis & ctv., 2003), bệnh nhiễm trùng máu *Streptococcus iniae*, bệnh thối mang, mòn

đuôi trên cá rô phi do *F. columnare* (Gaunt & ctv., 2010). Florfenicol đã được các nghiên cứu sử dụng ở liều 10 và 15 mg florfenicol/kg thể trọng cá/ngày với liệu trình điều trị trong 10 ngày. Kháng sinh này được phép sử dụng trong trị các bệnh nhiễm khuẩn cho cá nuôi tại 25 nước trên thế giới kể cả Mỹ (Gaunt & ctv., 2010). Tại Việt Nam, florfenicol được cho phép sử dụng hạn chế với dư lượng trong cơ thịt cá sau khi thu hoạch ở mức thấp hơn 1000 ppb (Danh mục hóa chất kháng sinh hạn chế sử dụng trong sản xuất kinh doanh thủy sản, thông tư số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009 của Bộ trưởng Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn).

Cá rô phi có sản lượng nuôi ước đạt 200 ngàn tấn/năm tại Việt nam. Cá được nuôi chủ yếu trong lồng, bè trên sông. Hình thức nuôi này có hạn chế lớn nhất là khả năng kiểm soát bệnh do sự lây lan tự do của mầm bệnh trong nước sông và bè nuôi. Thêm vào đó, việc áp dụng trực tiếp các chất sát khuẩn vào nước trong bè nuôi như treo túi thuốc trong bè hay tạt trực tiếp vào bè thường không có hiệu quả phòng trị bệnh cao do không thể duy trì được nồng độ hóa chất trong

nước trong thời gian đủ dài cho việc sát khuẩn. Do hạn chế trên nên việc trị bệnh cho cá nuôi bè chủ yếu vẫn được áp dụng qua đường tiêu hóa, cụ thể là biện pháp tắm thuốc vào thức ăn cho cá ăn.

Nghiên cứu hiệu quả của florfenicol trong kiểm soát tỷ lệ chết trên cá rô phi nuôi nhiễm *F. columnare* là yêu cầu cấp thiết nhằm hạn chế được tác hại của bệnh và nâng cao tỷ lệ sống trong khi chưa có biện pháp phòng bệnh hiệu quả. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả của florfenicol với các liều cấp thuốc qua đường tiêu hóa trong kiểm soát tỷ lệ chết của cá rô phi nhiễm *F. columnare* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vi khuẩn *Flavobacterium columnare*

Chủng *Flavobacterium columnare* T3-8/10 phân lập từ cá rô phi bị bệnh mòn vây cụt đuôi vào năm 2016 lưu giữ tại phòng thí nghiệm Bệnh Học Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm được sử dụng trong nghiên cứu này. Chủng vi khuẩn này đã được định danh bằng đặc điểm hình thái, sinh hóa và sinh học phân tử. Vi khuẩn từ ống giống gốc được cấy trên Cytophaga agar (CA), ủ ở 28°C trong 72 giờ. Khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn có màu vàng nhạt dạng rễ cây, dính chặt vào mặt thạch được tăng sinh trong Cytophaga Broth (CB) ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ trên máy lắc ngang với tốc độ 100 lần/phút. Canh khuẩn này được sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm.

2.2. Phân lập và định danh *Flavobacterium columnare*

Cá bệnh từ các thí nghiệm cảm nhiễm được thu mẫu kiểm tra sự cảm nhiễm vi khuẩn tại các vết loét trên da và vây bị mòn. Nhớt da tại các vị trí này được soi tươi và nhuộm gram, quan sát hình thái dưới kính hiển vi. Mẫu cấy ria mẫu nhớt từ các vết thương được thực hiện trên môi trường chọn lọc CA bổ sung polymyxin B 10 IU/mL và neomycin 10 µg/mL (Sigma-Aldrich). Các đĩa cấy phân lập được ủ ở 28°C trong 72 giờ. Sau đó, vi khuẩn được cấy thuần bằng cách chọn những khuẩn lạc đặc trưng, đứng riêng lẻ cấy ria lên môi trường CA mới.

Các gốc vi khuẩn phân lập thuần được định danh bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR). Kit NKALKLYS-DNAPREP của Công

ty Trách Nhiệm Hữu Hạn Dịch Vụ Thương Mại Nam Khoa (công ty Nam Khoa) được sử dụng ly trích DNA từ vi khuẩn phân lập thuần. Khuẩn lạc vi khuẩn được cho vào ống eppendorf 1,5 µL chứa 500 µL dung dịch tách chiết, ủ ở 96°C trong 10 phút trong buồng ủ nhiệt khô, làm lạnh nhanh trong khay đá trong 10 phút, sau đó ly tâm ở 13.000 rpm trong 5 phút. 10 µL dịch nổi được pha loãng với 40 µL TE 1X, đánh khuấy trong 5 giây và sử dụng như mạch khuôn DNA cho phản ứng PCR.

Kỹ thuật PCR một bước được áp dụng để phát hiện *Flavobacterium columnare*. Cặp mồi FcFd (5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTTTC-TAGAGACA-3' và FcRs (5'-TAATYRCTAAA-GATGTTCTTTCTACTTGGTT TG-3' được sử dụng khuếch đại đoạn gen có kích thước 504 bp (Panangala & ctv., 2007). Mỗi được cung cấp từ công ty IDT (Mỹ) với nồng độ gốc là 100 µM (100 pmoles/µL). Thành phần phản ứng PCR với thể tích 25 µL gồm Gotag Green Master Mix 2X 12,5 µL, mồi xuôi FcFd (20 µM) 0,5 µL, mồi ngược FcRs (20 µM) 0,5 µL, nước không chứa DNA 9,5 µL và DNA ly trích 2 µL. Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy luân nhiệt BioRad iQ5 với quy trình nhiệt gồm 1 chu kỳ kích hoạt polymerase (95°C, 1'), 30 chu kỳ biến tính, bắt cặp và tổng hợp (theo thứ tự 95°C, 30 giây; 63°C, 45 giây và 72°C, 30 giây) và cuối cùng 1 chu kỳ kéo dài mạch (72°C, 10'). Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 3%.

2.3. Xác định liều LD₅₀

Cá rô phi, trọng lượng 14 – 16 g/cá, được sử dụng trong các thí nghiệm cảm nhiễm. Trước khi thực hiện các thí nghiệm, năm cá thể cá được kiểm tra ngẫu nhiên tình trạng nhiễm ký sinh trên da và mang dưới kính hiển vi và nhiễm khuẩn bằng cách cấy mẫu gan, thận và lách trên môi trường Brain Heart Infusion agar. Sau đó, cá được đưa vào bể 75 L chứa 50 L nước trước khi gây nhiễm 7 ngày cho thích nghi với môi trường nước trong bể.

Môi trường CB đã tăng sinh chủng *F. columnare* T3-8/10 được điều chỉnh về mật độ quang OD 0,2 ở bước sóng 590 nm và xác định mật độ vi khuẩn bằng phương pháp cấy trang đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường CA được sử dụng gây nhiễm cho cá.

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên với bốn nghiệm thức có các liều

gây nhiễm chênh lệch nhau 10 lần (theo thứ tự từ thấp đến cao gồm nghiệm thức T1, T2, T3 và T4) và 1 nghiệm thức đối chứng (ĐC) không gây nhiễm. Cá được gây nhiễm bằng phương pháp tắm, mỗi nghiệm thức có 2 lần lặp lại với 20 cá/lần lặp lại. Sử dụng 500 mL canh CB đã được điều chỉnh OD vào bể nuôi cá chứa 49,5 L nước. Sau đó, lấy 5 L nước từ bể này chuyển sang bể thứ hai chứa 45 L nước. Tiếp tục làm như vậy cho đến bể thứ 4. Nước trong bể của nghiệm thức đối chứng không chứa canh khuẩn gây bệnh.

Cá được cho ăn thức ăn Aquaxcel 7404 (Cargill) với mức 4% trọng lượng thân/ngày chia làm 2 lần (8 giờ và 16 giờ). Nước trong bể được sục khí liên tục và thay 20 – 30% nước mỗi ngày. Nhiệt độ phòng gây bệnh được giữ ở mức 25⁰C bằng máy điều hòa nhiệt độ. Các bể thí nghiệm được chăm sóc như nhau. Các chỉ tiêu NH₃, pH và oxy hòa tan (DO) của nước trong bể được kiểm tra cách 3 ngày 1 lần vào lúc 8 giờ sáng bằng bộ kit Sera. Nhiệt độ được đo 2 lần/ngày (8 giờ và 16 giờ) bằng nhiệt kế rượu. Triệu chứng, bệnh tích của cá bệnh, số cá chết trong bể được ghi nhận ngày hai lần liên tục suốt 14 ngày sau gây nhiễm. Cá bệnh được thu mẫu cấy phân lập vi khuẩn và tiến hành định danh bằng kỹ thuật PCR xác định tác nhân gây chết đối với cá. Liều LD₅₀ được xác định theo phương pháp của Reed & Muench (1938).

2.4. Đặc điểm nhạy kháng sinh của *Flavobacterium columnare*

Sáu loại đĩa kháng sinh gồm florfenicol 30 µg (Oxoid), ampicillin 10 µg, doxycycline 30 µg, gentamycin 10 µg, tetracycline 30 µg và trimethoprim-sulfamethoxazole 1,25/23,75 µg (Công ty Nam Khoa) được sử dụng kiểm tra tính nhạy cảm kháng sinh của chủng *F. columnare* T3-8/10. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp Bauer – Kirby với môi trường Mueller-Hinton Agar (Merck). Đường kính vòng vô khuẩn được ghi nhận sau 72 giờ ủ ở 28⁰C. Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn được xác định dựa vào hướng dẫn chuẩn đường kính của vòng vô khuẩn theo tài liệu McGinnis & ctv. (2003).

2.5. Sử dụng florfenicol kiểm soát bệnh

Cá rô phi, trọng lượng 19 - 21 g/cá, được sử dụng trong thí nghiệm này. Cách tăng sinh vi khuẩn, gây nhiễm và chăm sóc cá sau gây nhiễm cũng như phân lập định danh vi khuẩn xác định

tác nhân gây bệnh được thực hiện tương tự như ở thí nghiệm xác định LD₅₀.

Thức ăn Aquaxcel 7404 (Cargill) được nghiền và trộn với florfenicol (Virbac) ở hai mức 500 và 750 mg/kg thức ăn. Thức ăn đối chứng không có florfenicol. Sau đó các thức ăn được bổ sung 1% Carboxy Methyl Cellulose (chất kết dính), tái ép viên với đường kính 1 mm, sấy ở nhiệt độ 50⁰C trong 6 giờ và bảo quản ở tủ đông -20⁰C cho đến khi sử dụng.

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức (NT) gồm đối chứng âm ĐC(-), đối chứng dương ĐC(+) được cho ăn thức ăn không có florfenicol; và NT10 và NT15 được cho ăn thức ăn có hàm lượng florfenicol lần lượt là 500 và 750 mg/kg tương ứng với liều florfenicol kiểm soát bệnh là 10 và 15 mg/kg thể trọng cá. Mỗi NT có 5 lần lặp lại với 20 cá/lần lặp lại. Từ ngày 1 đến ngày 10 sau khi gây nhiễm, cá ở NT ĐC(-) và ĐC(+) được cho ăn thức ăn không có florfenicol, cá ở NT10 và NT15 được cho ăn thức ăn có florfenicol. Từ ngày 11 đến ngày 24, cá trong tất cả các nghiệm thức được cho ăn thức ăn không có florfenicol. Lượng thức ăn cho cá ăn trong ngày tương ứng 4% trọng lượng thân.

2.6. Kiểm tra hàm lượng và dư lượng của florfenicol trong thức ăn và cơ thịt cá

Thức ăn sử dụng cho cá ở các nghiệm thức của thí nghiệm sử dụng florfenicol kiểm soát bệnh được gửi mẫu xét nghiệm hàm lượng florfenicol tại Trung Tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm thành phố Hồ Chí Minh.

Cá thí nghiệm của các nghiệm thức NT10 và NT15 được thu mẫu kiểm tra dư lượng florfenicol trong cơ thịt vào các ngày 1, 16, 20 và 24 sau khi ngưng sử dụng thức ăn có florfenicol (tương ứng với các ngày 11, 26, 30 và 34 sau khi gây nhiễm với *F. columnare*). Mỗi thời điểm thu 1 cá/nghiệm thức. Số cá thu vào ngày 11 sau gây nhiễm không được tính vào tỷ lệ cá chết của các nghiệm thức. Cá được gây mê trong nước pha thuốc gây mê AQUIS® (Bayer) 10 ppm, sau đó được đánh vảy, lột lườn thịt hai bên cơ thể cho vào túi nhựa riêng và bảo quản ở -20⁰C cho đến khi được gửi mẫu phân tích.

2.7. Phân tích thống kê

Tỷ lệ cá chết (%) được chuyển đổi sang giá trị arcsin căn bậc hai của tỷ lệ chết, sau đó thiết lập bảng ANOVA xác định sự khác biệt giữa

các nghiệm thức và phân tích sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở xác suất $P < 0,05$ bằng bảng trắc nghiệm Duncan với phần mềm SPSS 16.0.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Kiểm tra sức khỏe cá trước khi cảm nhiễm và chất lượng nước trong bể cá

Trước khi gây nhiễm, cá được kiểm tra tình trạng nhiễm ký sinh trùng trên mang và da cũng như tình trạng nhiễm khuẩn trong nội quan gan, thận và lách. Kết quả kiểm tra cho thấy không phát hiện sự hiện diện của ký sinh trùng từ các mẫu nhớt, da và mang của cá được kiểm tra. Kết quả kiểm tra nhiễm khuẩn cũng cho thấy không phát hiện sự hiện diện của bất kỳ khuẩn lạc vi khuẩn từ các mẫu cấy gan, thận và lách của cá kiểm tra.

Các chỉ tiêu chất lượng nước trong bể của cả hai thí nghiệm xác định LD₅₀ và kiểm soát tỷ lệ chết của cá do *F. columnare* ghi nhận được đều dao động trong khoảng giới hạn thích hợp cho sự sống và phát triển bình thường của cá rô phi. Do nhiệt độ phòng thí nghiệm gây bệnh được ổn định bởi máy điều hòa nhiệt độ nên nhiệt độ nước trong bể duy trì trong khoảng 25 – 28°C. Đây là khoảng nhiệt độ thích hợp cho *F. columnare* gây bệnh trên cá (Robert & ctv., 1998). Nước trong bể được sục khí liên tục nên DO luôn duy trì ở mức 5 – 7 mg/L. Thêm vào đó, các bể được thay 20 - 30% lượng nước mỗi ngày nên pH ít biến động (6,5 – 7,5) và NH₃ ở nồng độ rất thấp (0,0001 - 0,0005 mg/L).

Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ cho thấy chủng *F. columnare* T3-8/10 nhạy hoàn toàn với 6 loại kháng sinh kiểm tra, trong đó đường kính vòng vô khuẩn tại đĩa florfenicol lên đến 52 mm (Bảng 2). Theo Tu & ctv. (2012), các chủng *F. columnare* phân lập từ cá tra có tỷ lệ 85% nhạy với ampicillin và tetracyclin và 30% nhạy với Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Rahman & ctv. (2010) báo cáo các chủng *F. columnare* phân lập từ cá rô đồng nhạy cảm với chloramphenicol, oxytetracycline, erythromycin và streptomycin. Trong nghiên cứu này, chủng *F. columnare* T3-8/10 vẫn còn nhạy cảm với nhiều loại kháng sinh. Florfenicol cho vòng vô khuẩn có đường kính lớn nhất nên kháng sinh này được ưu tiên được chọn sử dụng trong kiểm soát bệnh thối đuôi, mòn vây do *F. columnare* trên cá rô phi.

3.2. Liều LD₅₀ của chủng *Flavobacterium columnare* T3-8/10

3.2.1. Phân lập và định danh *F. columnare*

Cá bệnh được thu mẫu, soi tươi và nhuộm Gram mẫu nhớt tại các vị trí loét da và mòn vây dưới kính hiển vi. Rất nhiều vi khuẩn dạng sợi, mảnh, kích thước khoảng 10 -20 μm và di động mạnh có thể quan sát được trong mẫu soi tươi nhớt da. Các vi khuẩn dạng sợi mảnh này bắt màu Gram âm khi được nhuộm Gram (Hình 1). Đây chính là hình thái đặc trưng của vi khuẩn dạng sợi *F. columnare* đã được báo cáo phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) (Figueido & ctv., 2005) và cá rô đồng (*Anabas testudeni*) (Rahman & ctv., 2010).

Khi cấy phân lập các mẫu nhớt trên môi trường chọn lọc Cytophaga agar có bổ sung kháng sinh neomycin và polymycin, các khuẩn lạc có màu vàng nhạt, rìa dạng rễ cây bám chặt vào bề mặt thạch xuất hiện rõ sau khi ủ ở 28°C, 72 giờ (Hình 2). Từ các mẫu cấy phân lập, vi khuẩn đã được phân lập thuần trên môi trường Cytophaga được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu FcFd/FcRs. Tất cả vi khuẩn phân lập đều cho băng DNA có kích thước khoảng 504 bp trên băng điện di (Hình 3).

3.2.2. Kết quả gây nhiễm và xác định LD₅₀

Kết quả kiểm tra mật độ *F. columnare* trong môi trường tăng sinh điều chỉnh về OD 0,2 bằng phương pháp cấy trang trên Cytophaga agar đạt $8,7 \times 10^8$ CFU/mL. Như vậy, liều gây nhiễm của các nghiệm thức T1, T2, T3 và T4 lần lượt là $8,7 \times 10^3$, $8,7 \times 10^4$, $8,7 \times 10^5$ và $8,7 \times 10^6$ CFU/mL.

Ngày đầu tiên sau gây nhiễm cá vẫn có biểu hiện bình thường. Tuy nhiên, sang ngày thứ hai cá có biểu hiện lơ đờ và giảm bắt mồi. Cá chết từ ngày thứ 2 trở đi và số lượng chết tăng dần cho đến ngày thứ 12 sau gây nhiễm. Liều gây nhiễm cao hơn cho số lượng cá chết nhiều hơn. Cá bệnh nhẹ trên da và vây tiết nhiều nhớt. Cá bệnh nặng có vùng da hai bên thân bị lở loét và vây tua rách, rụng, đặc biệt là vây đuôi (Hình 4).

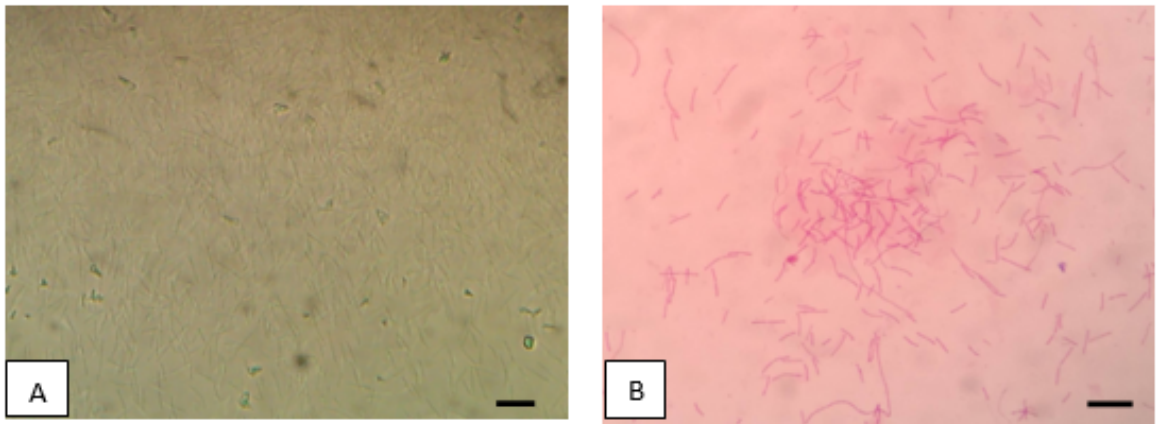
Số lượng và tỷ lệ cá chết trung bình của các nghiệm thức trong thí nghiệm xác định LD₅₀ được trình bày ở Bảng 3. Tỷ lệ cá chết cộng dồn nhỏ hơn 50% và lớn hơn 50% số cá thí nghiệm thuộc các nghiệm thức T1 và T2 với mật độ vi khuẩn gây nhiễm lần lượt là $8,7 \times 10^3$ và $8,7$

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm kiểm soát bệnh do *F. columnare* bằng florfenicol

Nghiệm thức	Liều florfenicol (mg/kg cá)	Gây nhiễm	Cho ăn từ ngày 1 -10	Cho ăn từ ngày 11 -24
DC (-)	0	Không	Thức ăn không có florfenicol	Thức ăn không có florfenicol
DC (+)	0	Có	Thức ăn không có florfenicol	Thức ăn không có florfenicol
NT10	10	Có	Thức ăn có florfenicol	Thức ăn không có florfenicol
NT15	15	Có	Thức ăn có florfenicol	Thức ăn không có florfenicol

Bảng 2. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của chủng *F. columnare* T3-8/10

Kháng sinh	Hàm lượng (μg)	Nhạy	Kháng	T3-8/10
Ampicillin	10	> 17	< 13	32
Doxycycline	30	> 16	< 12	32
Florfenicol	30	> 19	< 14	52
Gentamycin	10	> 15	< 12	28
Tetracycline	30	> 19	< 14	40
Trimethoprim/sulfamethoxazole	1,25/23,75	> 16	< 10	26



Hình 1. Hình thái *Flavobacterium columnare*. Soi tươi (A) và nhuộm Gram (B), (kích thước thanh: 10 μm).

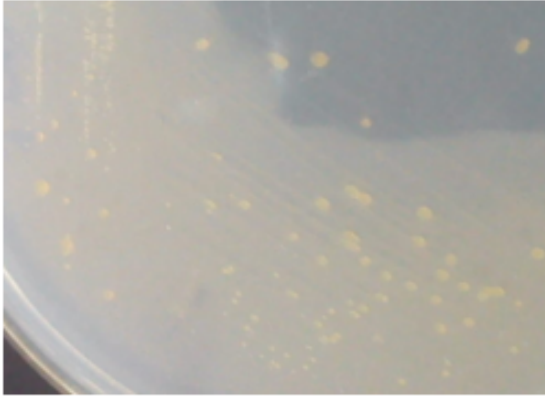
$\times 10^4$ CFU/mL. Kết quả tính toán liều LD₅₀ của chủng *F. columnare* T3-8/10 theo phương pháp của Reed & Muench (1938) đạt $4,8 \times 10^4$ CFU/mL.

Flavobacterium columnare là vi khuẩn hiện diện trong hầu hết môi trường nuôi thủy sản. Vi khuẩn này được xem là mầm bệnh cơ hội khi cá bị stress do chất lượng môi trường nuôi kém như oxy hòa tan thấp, nồng độ ammonia, nitrite tăng cao hay cá bị xay sát do cơ học như vận chuyển, đánh bắt (Robert & ctv., 1998). Do đó trong các thí nghiệm gây cảm nhiễm với mầm

bệnh cơ hội, liều gây bệnh cần phải khá lớn để gây nhiễm thành công. Các kết quả nghiên cứu đã được công bố cho thấy liều LD₅₀ khi gây bệnh bằng phương pháp ngâm cho cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là $3,2 \times 10^6$ CFU/mL (Tu & ctv. 2012). Rahman & ctv. (2010) đã gây nhiễm cá rô đồng bằng phương pháp ngâm ở mật độ $3 - 5 \times 10^8$ CFU/mL với các chủng *F. columnare* khác nhau và đã ghi nhận tỷ lệ cá chết thay đổi từ 40 – 100%. Tuy nhiên, Figueido & ctv. (2005) đã không thành khi gây nhiễm cá da trơn Mỹ (*Ictalurus punctatus*) bằng phương pháp ngâm với

Bảng 3. Số lượng và tỷ lệ cá chết trung bình trong thí nghiệm xác định LD₅₀

Nghiệm thức	Lặp lại	Số cá bố trí/lần lặp lại	Số cá chết cộng dồn	Số cá sống cộng dồn	Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
T1	2	20	9	25,5	26,1
T2	2	20	21,5	14,5	82,7
T3	2	20	36,5	7	83,9
T4	2	20	54,5	2	96,5



Hình 2. Phân lập *Flavobacterium columnare* từ cá rô phi. Khuẩn lạc từ mẫu cấy vết loét da cá rô phi có màu vàng nhạt, dạng rễ cây trên môi trường thạch Cytospha bổ sung polymyxin và neomycin sau 72 giờ ủ ở 28⁰C.

mật độ vi khuẩn gây nhiễm $3,0 \times 10^7$ CFU/mL. Trong thí nghiệm này cá được gây nhiễm bằng phương pháp tắm với thời gian tiếp xúc giữa cá và chủng *F. columnare* T3-8/10 không giới hạn với kết quả LD₅₀ đạt $4,8 \times 10^4$ CFU/mL và thấp hơn so với nghiên cứu trước đây. So với phương pháp ngâm, phương pháp tắm hoàn toàn không gây stress cho cá vì không cần chuyển cá sang bể ngâm vi khuẩn. Cá không bị stress nên không ảnh hưởng đến mức độ bắt mồi là thức ăn có florfenicol trong thí nghiệm kiểm soát bệnh.

3.3. Kiểm soát bệnh do *F. columnare*

3.3.1. Lượng thức ăn cá tiêu thụ

Bảng 4 trình bày lượng thức ăn cá ăn ở các nghiệm thức. Kết quả cho thấy cá ở nghiệm thức ĐC(-) tiêu thụ thức ăn nhiều nhất và thấp nhất là cá ở ĐC(+). Cá ở NT10 và NT15 có lượng tiêu thụ thức ăn thấp hơn ĐC(-) tuy nhiên sự khác biệt này là không đáng kể. Kết quả này cho thấy hàm lượng 500 và 750 mg/kg florfenicol trong thức ăn không ảnh hưởng đến mức độ

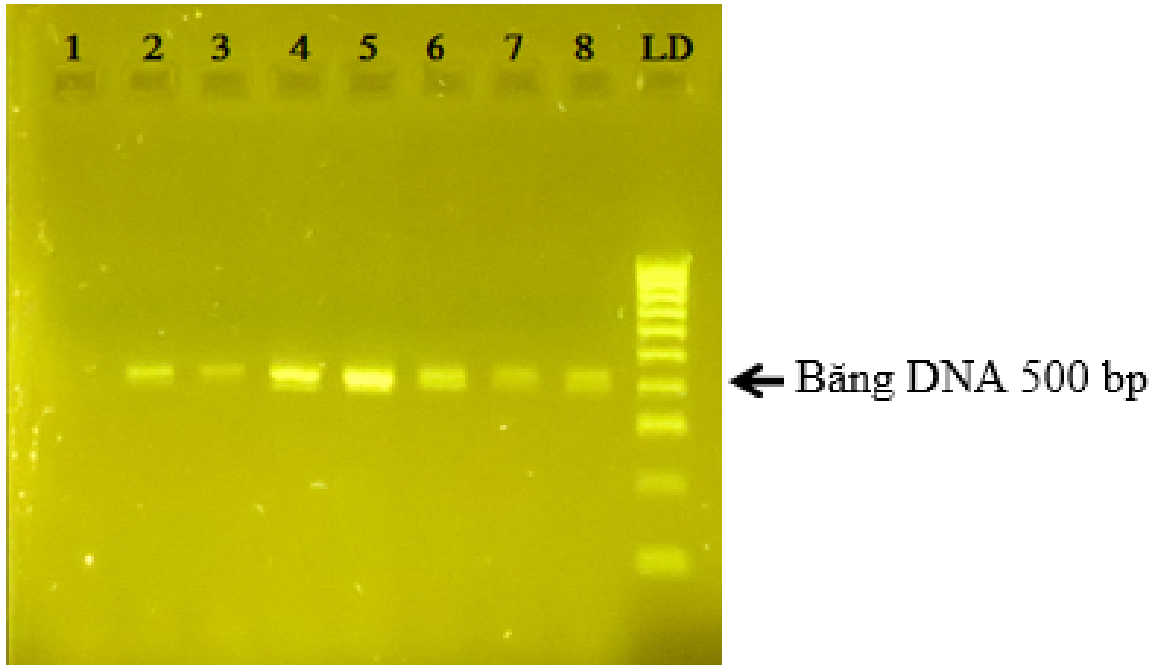
bắt mồi của cá rô phi.

3.3.2. Hàm lượng florfenicol trong thức ăn

Kết quả kiểm tra hàm lượng florfenicol trong thức ăn của các nghiệm thức NT10 và NT15 lần lượt là 407,6 và 678,2 mg/kg. So với dự định hàm lượng florfenicol 500 và 750 mg/kg thức ăn, hàm lượng florfenicol thực tế có trong thức ăn sử dụng cho cá ở NT10 và NT15 thấp hơn. Trong thí nghiệm này, cá có trọng lượng trung bình khoảng 20 g/cá. Lượng florfenicol một cá thể cá trong NT10 và NT15 cần tiêu thụ lần lượt 0,2 và 0,3 mg/ngày nhằm đạt được liều chỉ định florfenicol 10 và 15 mg/kg cá/ngày. Từ kết quả trình bày ở bảng 7, một cá thể cá trong NT10 và NT15 ăn lượng thức ăn lần lượt 0,75 và 0,76 g/ngày. Như vậy, lượng florfenicol một cá thể cá trong nghiệm thức NT10 và NT15 tiêu thụ lần lượt là 0,54 và 0,89 mg/ngày. Roiha và ctv. (2011) đã áp dụng liều chỉ định florfenicol 10 mg/kg cá/ngày trong điều trị nhiễm khuẩn *F. columnare* trên ấu trùng cá halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Tuy nhiên, lượng florfenicol thực tiễn ấu trùng cá trong các nghiệm thức tiêu thụ lên đến 30 – 115 mg/kg cá/ngày. Các kết quả trên cho thấy việc cấp thuốc cho cá theo đúng liều chỉ định có phần khó khăn hơn so với động vật trên cạn. Tuy nhiên, đặc biệt đối với kháng sinh, lượng kháng sinh cá tiêu thụ được thực tế khó có thể đúng nhưng cần cao hơn liều chỉ định nhằm đạt hiệu quả điều trị cao và hạn chế tình trạng vi khuẩn trở nên đề kháng kháng sinh.

3.3.3. Tỷ lệ cá chết ở các nghiệm thức

Cá được gây nhiễm bằng phương pháp tắm với liều *F. columnare* $6,9 \times 10^4$ CFU/mL (xấp xỉ với liều LD₅₀ $4,8 \pm 10^4$ CFU/mL). Sau 14 ngày gây bệnh, cá ở các bể đối chứng âm vẫn bơi lội linh hoạt, phản ứng nhanh nhẹn với tiếng động. Trên cơ thể cá không thấy xuất hiện bất cứ dấu hiệu nhiễm bệnh nào. Điều này chứng tỏ cá ở nghiệm thức ĐC(-) vẫn hoàn toàn khỏe mạnh. Ở



Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện *Flavobacterium columnare* của các gốc vi khuẩn phân lập từ cá rô phi (băng DNA đặc hiệu 504 bp).

Giếng 1: Đối chứng (-). Giếng 2 - 4: Các gốc vi khuẩn phân lập từ cá bệnh của thí nghiệm LD₅₀.

Giếng 5: Chủng *F. columnare* T3-8/10. Giếng 6-8: Các gốc vi khuẩn phân lập từ cá bệnh của thí nghiệm kiểm soát tỷ lệ cá chết do *F. columnare* bằng florfenicol. Giếng LD: Thang DNA 100 bp.

Bảng 4. Lượng thức cá ăn trong 10 ngày thí nghiệm kiểm soát bệnh

NT	Số lượng cá	Tổng lượng thức ăn (g)	Lượng thức ăn (g) một cá thể cá ăn/ngày
ĐC(-)	100	777,4	0,78
ĐC(+)	100	602,2	0,60
NT 10	100	749,0	0,75
NT 15	100	763,0	0,76

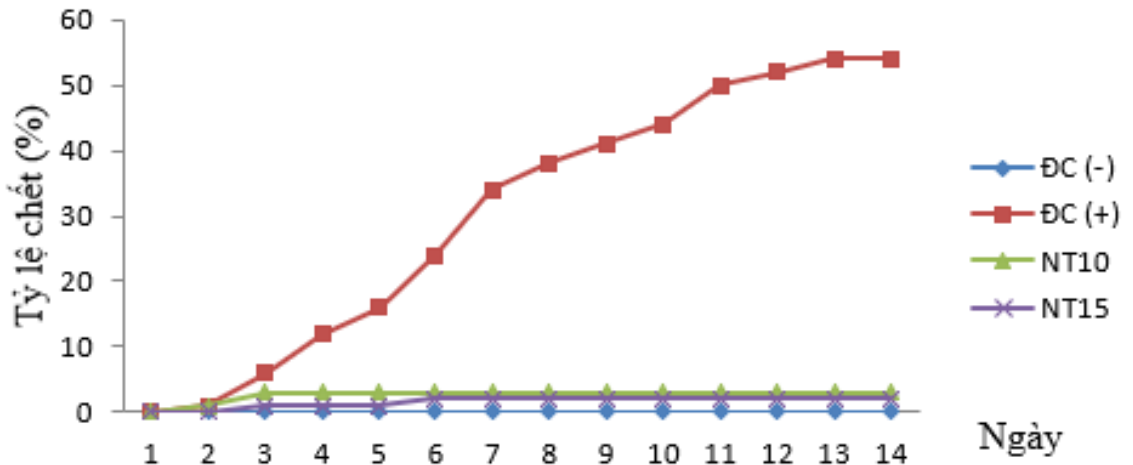


Hình 4. Biểu hiện bên ngoài của cá bệnh trong thí nghiệm LD₅₀.

các thí nghiệm gây nhiễm, từ ngày thứ 2 cá bắt đầu chết ở ĐC(+) và NT 10. Trong khi đó cá ở NT15 chỉ bắt đầu chết từ ngày thứ 3. Cá ở ĐC(+)

có tỷ lệ chết tăng liên tục đến ngày thứ 13. Các thí nghiệm thức sử dụng florfenicol hoàn toàn không còn cá chết sau ngày thứ 3 ở NT10 và ngày thứ 6 ở NT15 (Hình 5). Tỷ lệ cá chết sau 14 ngày gây nhiễm ở ĐC(+) lên đến $54,0 \pm 5,47\%$ và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với tỷ lệ chết ở ĐC(-), NT10 và NT15 lần lượt là 0,0; $3,0 \pm 4,72$ và $2,60 \pm 2,51\%$. Tỷ lệ cá chết ở thí nghiệm thức NT10 và NT15 khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với ở ĐC(-) ($P > 0,05$).

Tất cả cá chết đều xuất hiện các biểu hiện vết trắng ở đuôi, hai bên thân và mất nhiều nhớt. Vùng da bị nhiễm khuẩn mất đi màu sáng tự nhiên, ở mép vết thương có màu xám, trắng bao quanh. Các vây, đặc biệt là vây đuôi, bị mòn và



Hình 5. Tỷ lệ cá chết (%) trong thí nghiệm kiểm soát cảm nhiễm *F. columnare* bằng florfenicol.

cụt dần. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR cho thấy *F. columnare* là tác nhân duy nhất gây bệnh này trên cá rô phi trong quá trình tiến hành thí nghiệm trị bệnh.

Florfenicol là kháng sinh đã được sử dụng với liều 10 và 15 mg/kg cá với liệu trình 10 ngày liên tục nhằm kiểm soát nhiều bệnh nhiễm khuẩn trên nhiều loài cá khác nhau như *Francisella asiatica* trên cá rô phi (Esteban & ctv., 2010), *F. columnare* trên ấu trùng cá halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Roiha & ctv., 2011), *F. columnare* trên cá sunshine bass (cá mẹ *Morone chrysops* lai cá bố *Morone saxatilis*) (Darwish & ctv., 2012) và *Edwardsiella ictaluri* trên loài cá da trơn Mỹ (*Ictalurus punctatus*) (Patricia & ctv., 2006). Darwish & ctv. (2012) báo cáo kết quả sử dụng florfenicol liều 15 mg/kg thể trọng cá trong liệu trình 10 ngày điều trị nhiễm khuẩn tự nhiên *F. columnare* trên cá sunshine bass đã nâng cao tỷ lệ sống lên 90% so với cá không được điều trị là 71%. Roiha & ctv. (2011) với liều và liệu trình điều trị như trên đã thành công trong điều trị nhiễm *F. columnare* trên ấu trùng cá halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Kết quả cho thấy toàn bộ ấu trùng trong các bể không được điều trị chết trong vòng 6 ngày sau khi có biểu hiện bệnh. Trong khi đó, ấu trùng ở các bể điều trị sau 2 ngày đã giảm đáng kể tỷ lệ chết và sau 6 ngày cá bình phục hoàn toàn. Tỷ lệ chết của ấu trùng ở cá bể này chỉ ở mức 32%.

3.3.4. Dư lượng florfenicol trong cơ thịt cá

Kết quả kiểm tra dư lượng florfenicol trong cơ thịt cá được trình bày ở Bảng 5. Thời gian ngưng sử dụng một loại kháng sinh trước khi thu hoạch cá nếu không được quy định cụ thể có thể áp dụng theo mức 500 độ ngày. Độ là nhiệt độ trung bình của môi trường nước trong thời gian ngưng kháng sinh (Edward, 2000). Nhiệt độ nước trong các bể thí nghiệm kiểm soát bệnh biến động trong khoảng 25 – 28°C. Như vậy thời gian cần thiết để cơ thể cá loại thải florfenicol tính theo nhiệt độ cao nhất và thấp nhất của nước trong bể là 18 đến 20 ngày. Kết quả kiểm tra dư lượng kháng sinh florfenicol trong cơ thịt cá giảm dần theo thời điểm thu mẫu kiểm tra (Bảng 5) và đều thấp hơn mức 1000 ppb theo thông tư số 15/2009/TT-BNN ban hành ngày 17 tháng 3 năm 2009 của Bộ trưởng Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn.

Bảng 5. Dư lượng florfenicol trong cơ thịt cá sau khi ngưng cho ăn kháng sinh (ppb)

Ngày	NT10	NT15
1	10,0	50,2
16	3,8	3,8
20	2,0	2,5
24	1,2	2,1

4. Kết Luận và Đề Nghị

4.1. Kết luận

Cho cá ăn cho ăn thức ăn có florfenicol với hàm lượng 407,6 và 678,2 mg/kg thức ăn với tỷ lệ 4%/ngày đều có hiệu quả kiểm soát tốt tỷ lệ chết trên cá rô phi trong điều kiện gây bệnh thực nghiệm với chủng *Flavobacterium columnare* T3-8/10.

Florfenicol có thể sử dụng một cách an toàn với dư lượng trong cơ thịt cá thí nghiệm thấp hơn mức giới hạn quy định.

4.2. Đề nghị

Thử nghiệm kiểm soát bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi trong ao ương và bè nuôi.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Darwish, M. A., Bebak, J. A., & Schrader, K. K. (2012). Assessment of AquaFlo®, copper sulphate and potassium permanganate for control of *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* infection in sunshine bass, *Morone chrysops* female x *Morone saxatilis* male. *Journal of Fish Diseases* 35(9), 637-647.
- Edward, J. N. (2000). *Fish disease diagnosis and treatment* (2th ed., 272-273). Iowa, USA: Wiley and Blackwell.
- Figueido, H. C. P., Klesius, P. H., Arias, C. R., Evans, J., Shoemaker, C. A., & Pereira, D. J. (2005). Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of Fish Diseases* 28(4), 199-204.
- Esteban S., Richard G. E., & John P. H. (2010). *In vitro* and *in vivo* efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (11), 4664-4670.
- Gaunt, P. S., Gao, D., Sun, F., & Endris, R. (2010). Efficacy of florfenicol for control of mortality caused by *Flavobacterium columnare* infection in Channel Cat fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 22(2), 115-122.
- McGinnis, A., Gaunt, P., Santucci, T., Simmons, R., & Endris, R. (2003). *In vitro* evaluation of the susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to florfenicol. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15(6), 576-579.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard of Antimicrobial Susceptibility). (2001). *Testing; Eleventh Information Supplement*. Pennsylvania, USA: NCLS document M100-S11 NCCLS.
- Panangala, V. S., Shoemaker, C. A., Van Santen, V. L., Dybvig, K., & Klesius, P. H. (2007). Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organism* 74(3), 199-208.
- Patricia, S. G., Anissa. L. M., Timothy, D. S., Jean, C., & Peter, W. (2006). Field Efficacy of Florfenicol for Control of Mortality in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), Caused by Infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of The World Aquaculture Society* 37(1), 1-11.
- Rahman, M. M., Ferdowsy, H., Kashem, M. A., & Foyzal, M. J. (2010). Tail and Fin Rot Disease of Indian Major Carp and Climbing Perch in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences* 10(8), 800-804.
- Reed, L.J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
- Robert, M. D., Ronald, L. T., John, P. H., & Camus, A. C. (1998). Columnaris disease: A bacterial infection caused by *Flavobacterium columnare*. *Southern Regional Aquaculture Center Publication* 479, 31-44.
- Roiha, I. S., Samuelsen, O. B., & Harboe, T. (2011). Efficacy of florfenicol in the treatment of bacterial infections in halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases* 34(12), 927-930.
- Tu, D. T., Nguyen, T. T., & Nguyen, T. A. (2012). Study the aetiological agent causing white patch disease in catfish farm (*Pangasianodon hypophthalmus*) and therapy solution. *Can Tho University Journal of Science* 22c, 136-145.