

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ NHẠY VỚI KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *Flavobacterium columnare* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRẮM CỎ NUÔI TẠI MIỀN BẮC

Trương Đình Hoài*, Đoàn Thị Ninh, Trần Thị Trinh,
Đặng Thị Hóa, Nguyễn Ngọc Tuấn, Kim Văn Vạn

Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 23.02.2022

Ngày chấp nhận đăng: 05.04.2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các dấu hiệu bệnh đặc trưng, phân lập, định danh và đánh giá hiện trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá trắm cỏ ở một số tỉnh miền Bắc. Tổng số 103 mẫu cá trắm cỏ nghi nhiễm *F. columnare* đã được thu từ 25 hộ nuôi thuộc 03 tỉnh (Hà Nội, Hải Dương và Bắc Ninh) để phục vụ nghiên cứu. Kết quả cho thấy cá trắm cỏ nhiễm bệnh có biểu hiện đặc trưng như tia mang xơ, bạc trắng, xơ vây, xuất hiện các đốm bạc màu trên da. Tổng số 67 chủng vi khuẩn thuần, dạng rễ đã được nuôi cấy thành công và 25 chủng đại diện từ các trại nuôi được định danh bằng phản ứng sinh hóa kết hợp với giám định bằng PCR. Kết quả cảm nhiễm của 03 chủng đại diện bằng phương pháp ngâm ở nồng độ 2×10^6 CFU/ml trong 2h gây chết 100% cá trắm cỏ cỡ 25-30g trong 48-72h. Kết quả kháng sinh đồ cho thấy tỉ lệ cao *F. columnare* nhạy với các loại kháng sinh doxycycline, amoxicillin, florfenicol và oxytetracycline (92-100%); tuy nhiên tỉ lệ kháng với sulfamethoxazole /trimethoprim và erythromycin là khá cao, lần lượt là 44 và 16%. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin quan trọng phục vụ chẩn đoán, phòng và điều trị bệnh do *F. columnare* gây ra trên cá trắm cỏ.

Từ khóa: *Flavobacterium columnare*, cá trắm cỏ, kháng kháng sinh.

Isolation and Antibiotic Susceptibility of *Flavobacterium columnare* Infecting Grass Carp Cultured in Northern Vietnam

ABSTRACT

This study was conducted to identify the pathogen *F. columnare* from diseased grass carp cultured in northern Vietnam and to examine the susceptibility of this bacterium to various common antibiotics used in aquaculture. A total of 103 grass carp samples suspected to be infected with *F. columnare* were collected and screened from 25 grass carp farms in Ha Noi, Hai Duong and Bac Ninh provinces. The grass carps infected with *F. columnare* exhibited the symptoms of decayed, white-grey gill filaments, rotten fins, and skin discoloration. From 67 yellow and rhizoid isolates recovered from the collected samples, 25 representative isolates (one per farm) were identified by the phenotypic tests and PCR assays. Grass carps (20-25g) challenged with *F. columnare* at the dose of 2×10^6 CFU/ml by immersion in 2h resulted in 100% mortality within 48-72 hpi. The antibiotic test showed that high proportion of *F. columnare* isolates were susceptible to doxycycline, amoxicillin, florfenicol, and oxytetracycline (92-96%), but resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim (44%) and erythromycin (16%). The present study provided necessary information for diagnosing and controlling *F. columnare* in grass carp.

Keywords: *Flavobacterium columnare*, grass carp, antibiotic resistance.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá trắm cỏ là một trong những loài cá nước ngọt có tầm quan trọng về mặt thương mại, góp

khoảng 10,5% sản lượng cá toàn cầu (FAO, 2020; Shi & cs., 2021). Sản lượng cá trắm cỏ trên toàn thế giới đạt khoảng 5,5 triệu tấn vào năm 2018, chỉ sau cá rô phi và trở thành loài cá

được nuôi nhiều thứ hai trên thế giới (Shen & cs., 2019). Tại Việt Nam, cá trắm được nuôi phổ biến ở nhiều địa phương do loài cá này có thể được nuôi ở vùng nước tĩnh và nước chảy, nuôi lồng, nuôi ao, nuôi cá - lúa, nuôi trong hệ VAC. Cá trắm cỏ dễ nuôi, không đòi hỏi thức ăn có chất lượng dinh dưỡng quá cao, tốc độ sinh trưởng nhanh, thịt cá thơm ngon nên được người tiêu dùng ưa chuộng. Tuy nhiên sự phát triển nhanh kèm theo mật độ nuôi cao, ô nhiễm môi trường và biến đổi khí hậu làm cho dịch bệnh trên cá trắm cỏ ngày càng phức tạp, đặc biệt là bệnh do vi khuẩn (Gallani & cs., 2020).

Bệnh do *Flavobacterium columnare* đã được báo cáo gây bệnh cho 36 loài cá nuôi khắp thế giới, bao gồm nhiều loài cá nuôi có giá trị kinh tế cao như cá nheo mỹ, cá hồi vân, cá tra và cá rô phi, đặc biệt loài vi khuẩn này gây ảnh hưởng nghiêm trọng trên cá nước ngọt nuôi với tỉ lệ chết khoảng 80-100% đối với cá hương, cá giống và 35-60% ở cá trưởng thành (Từ Thanh Dung & cs., 2012). Trong số các nhóm vi khuẩn gây bệnh trên cá nước ngọt thì *F. columnare* được coi là một trong những loài vi khuẩn gây thiệt hại lớn cho cá nước ngọt nói chung và cá trắm cỏ nói riêng. Tại Việt Nam, mặc dù đã có một số nghiên cứu về phân lập, định danh vi khuẩn *F. columnare* nhưng chủ yếu trên cá tra (*Pagasianodon hypophthalmus*) ở Đồng Bằng Sông Cửu Long (Từ Thanh Dung & cs., 2012), thông tin về dịch bệnh do vi khuẩn *F. columnare* trên cá trắm cỏ chưa được nghiên cứu chuyên sâu. Nghiên cứu này được thực hiện để xác định sự có mặt và gây bệnh của vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá trắm cỏ thông qua các phương pháp phân lập và giám định các chủng vi khuẩn từ cá bệnh thu ở khu vực phía Bắc trong năm 2021. Đồng thời đánh giá hiện trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh để cung cấp thông tin cho việc xây dựng các giải pháp điều trị bệnh do *F. columnare* trên cá trắm cỏ.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu trắm cỏ nghi nhiễm *F. columnare* được thu từ các đợt

bùng phát bệnh tại một số tỉnh khu vực phía Bắc. Các trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất phục vụ cho quá trình thu mẫu, nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn, cảm nhiễm kháng định tác nhân gây bệnh và đánh giá mức kháng kháng sinh của vi khuẩn sau định danh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu và sàng lọc mẫu nghi nhiễm

Tổng số 103 mẫu cá trắm cỏ nghi nhiễm *F. columnare* (trắng da, bạc mang) còn sống hoặc mới chết được thu từ các đợt bùng phát bệnh ở 25 hộ nuôi thuộc 3 tỉnh Hà Nội (n = 34), Hải Dương (n = 38) và Bắc Ninh (n = 31) dựa trên các dấu hiệu bệnh như xơ, bạc mang, mòn vây và xuất hiện các đốm bạc màu bên ngoài cơ thể (Declercq & cs., 2013a; Lu & cs., 2021). Mẫu sau khi thu được vận chuyển về và phân tích tại Phòng thí nghiệm bằng phương pháp vận chuyển kín bằng túi PE có bơm oxy hoặc vận chuyển lạnh trong các thùng giữ nhiệt. Mẫu cá sau thu được sàng lọc sơ bộ sự có mặt của vi khuẩn Gram âm, dạng sợi mảnh ở các vị trí tổn thương theo mô tả của Declercq & cs. (2013a) trước khi nuôi cấy, phân lập. Các dấu hiệu lâm sàng và đặc điểm bệnh tích của cá sau sàng lọc được ghi chép để tổng hợp và nhận diện các dấu hiệu đặc trưng của bệnh.

2.2.2. Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn

Tất cả mẫu sau sàng lọc sơ bộ được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn. Mẫu bệnh ở các vị trí tổn thương được ria cấy trên môi trường Cytophagar (CA). Khuẩn lạc vi khuẩn sau nuôi cấy có màu vàng, dạng rễ như mô tả của Dong & cs. (2016) và Kunttu & cs. (2011) được tách để nuôi cấy thuần. Các chủng vi khuẩn sau nuôi cấy thuần được lưu giữ trong môi trường có bổ sung glycerol (20%) ở điều kiện -80°C.

2.2.3. Định danh và giám định tác nhân

Xác định đặc điểm hình thái, sinh hóa: Lựa chọn ngẫu nhiên 25 chủng vi khuẩn đại diện (01 chủng/hộ thu mẫu) để đưa vào xác định một số đặc điểm hình thái, sinh hóa thông thường theo mô tả của Bernardet & Grimont (1989) và Buller (2004). Vi khuẩn thuần được quan sát

hình thái khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy, hình dạng vi khuẩn qua nhuộm Gram; soi tươi xác định đặc tính di động. Các phản ứng catalase, oxidase, hấp thụ thuốc thử red congo được tiến hành theo hướng dẫn của kit thử; thử sắc tố flexirubin bằng dung dịch KOH 20%. Các chủng vi khuẩn được định danh sơ bộ là *F. columnare* khi có kết quả kiểm tra tương đồng với chủng chuẩn *F. columnare* ATCC23463.

Phương pháp tách chiết DNA và giám định vi khuẩn bằng sinh học phân tử: Tất cả 25 chủng vi khuẩn sau định danh sơ bộ bằng hình thái, sinh hóa được tách chiết DNA. Quá trình tách chiết sử dụng bộ kit Instagen (Bio-rad, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau tách được bảo quản ở điều kiện -20°C . Các chủng vi khuẩn được giám định loài *F. columnare* sử dụng primer xác định sự có mặt của gen đích ISR với đoạn mỗi xuôi FCISRFL: TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAGAGACA; mỗi ngược FCISRR: TAATYRCTAAAGATGTTCTTTCTACTTGTTTG, kích cỡ sản phẩm khoảng 450-550bp (Welker & cs., 2005). Hỗn dịch cho 1 phản ứng PCR có thể tích tổng 25 μl chứa 1 đơn vị Gotag green Master Mix (Promega, UK), 0,8 μM mỗi primer xuôi và ngược, 200ng mẫu DNA, 4 μl nước tách DNA. Hỗn dịch được đưa vào máy luân nhiệt để khuếch đại DNA theo chu kỳ nhiệt như sau: tiên biến tính ở 94°C trong 5 phút; 40 chu kỳ lặp lại với biến tính ở 94°C trong 30s, gắn mỗi ở 55°C trong 45s, kéo dài ở 72°C trong 60s; và giai đoạn kéo dài sau cùng ở 72°C trong 7 phút. Đối chứng dương là chủng chuẩn *F. columnare* ATCC 23463, đối chứng âm hỗn hợp phản ứng không chứa DNA và thay bằng PBS. Sản phẩm PCR được phân tích trên máy điện di sử dụng bản gel chứa 1,5% agarose nhuộm bằng dung dịch RedSafe (Intron, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di bản gel được chụp bằng hệ thống Gel imager (Bio-Rad, Mỹ).

2.2.4. Cảm nhiễm, kháng định tác nhân gây bệnh

Lựa chọn đại diện 03 chủng sau định danh từ 3 tỉnh đã thu mẫu (FC-TC-HN04; FC-TC-HD02; FC-TC-BN05) để tiến hành cảm nhiễm

trên cá trắm cỏ theo phương pháp ngâm theo mô tả bởi Dong & cs. (2016). Cá thí nghiệm (n = 120 con, kích cỡ từ 25-30g) được nuôi thuần một tuần trước khi thí nghiệm. Tiến hành nuôi tăng sinh các chủng vi khuẩn bằng môi trường Tryptone Yeast Extract Salts (TYES) trong 36h. Sử dụng phương pháp chng cấy trên đĩa thạch để xác định mật độ vi khuẩn trong dịch gốc. Bổ sung môi trường nuôi TYES để điều chỉnh mật độ vi khuẩn gốc của 3 chủng về mức đồng đều khoảng 2×10^8 CFU/ml.

Đối với mỗi chủng vi khuẩn, pha loãng 50ml dịch khuẩn gốc vào nước sạch đủ 5 lít để ngâm cảm nhiễm, với một mức mật độ vi khuẩn gây nhiễm là 2×10^6 CFU/ml. Sử dụng 15 cá/lô ngâm, lặp lại 2 lần và thời gian ngâm cảm nhiễm là 2h. Cá sau cảm nhiễm được chuyển nuôi trong các bể 120l và theo dõi trong 7 ngày. Lô đối chứng thao tác tương tự với dịch ngâm không chứa vi khuẩn.

Cá chết hoặc có biểu hiện bệnh sau cảm nhiễm được thu để quan sát triệu chứng, bệnh tích, nhuộm gram, soi tươi quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn trong mô bào. Một số mẫu cá được nuôi cấy, phân lập lại vi khuẩn và được giám định nhanh bằng PCR để khẳng định tác nhân gây bệnh.

2.2.5. Đánh giá mức độ nhạy/kháng của vi khuẩn với kháng sinh

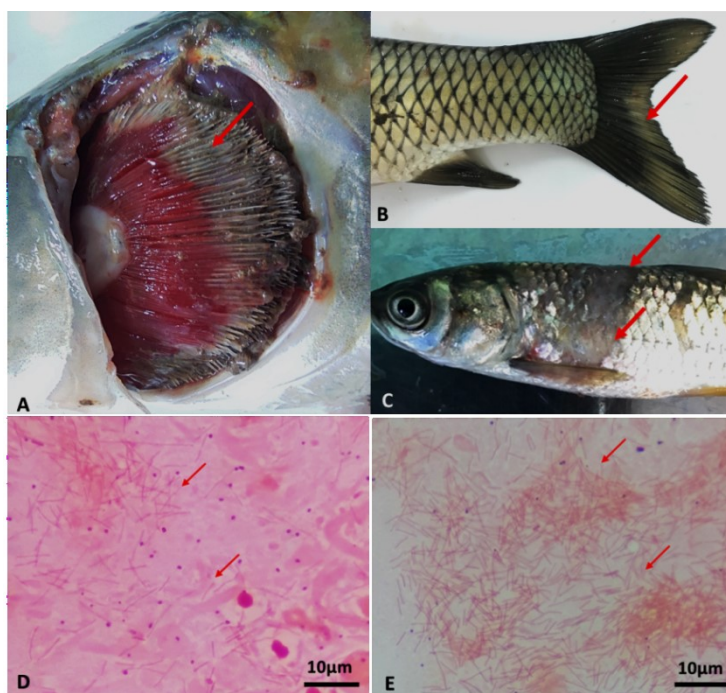
Mức độ kháng/nhạy của vi khuẩn *F. columnare* đối với kháng sinh được đánh giá sử dụng phương pháp đĩa kháng sinh khuếch tán cho nhóm vi khuẩn di động trượt, được hướng dẫn trong tài liệu Clinical Laboratory Standards Institute VET04 (2020). Thử nghiệm được thực hiện trên 25 chủng vi khuẩn *F. columnare* sau định danh đối với 6 loại kháng sinh được phép sử dụng trong NTTS bao gồm: amoxicillin (AX, 10 μg); erythromycin (ER, 15 μg); sulfamethoxazole/trimethoprim (SMX/TMP - 23,75/1,25 μg); doxycycline (DX - 30 μg), oxytetracycline (OTC - 30 μg); florfenicol (FL - 30 μg). Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy thuần trong môi trường lỏng Mueller Hinton Broth (MHB) pha loãng (4 g/l) sau 36h ở 28°C . Dịch nuôi cấy được điều chỉnh về mức 0,5 theo

thang chuẩn McFarland để đạt mật độ vi khuẩn khoảng 1×10^8 CFU/ml và được tiếp tục pha loãng theo tỉ lệ 1:100 bằng môi trường MHB (pha loãng). Chẳng đều 50 μ l dịch khuẩn sau pha loãng lên đĩa thạch Mueller-Hinton pha loãng (4 g/l MHB + 17 g/l agar). Tiến hành đặt các tấm kháng sinh lên đĩa thạch sau chẳng cấy và ủ ở 28°C. Kích thước vòng vô khuẩn được đo sau 48h, tính nhạy/kháng của kháng sinh đối

với vi khuẩn được phân chia thành các mức nhạy, nhạy vừa và kháng theo CLSI (20016) và CLSI VET4 (2020).

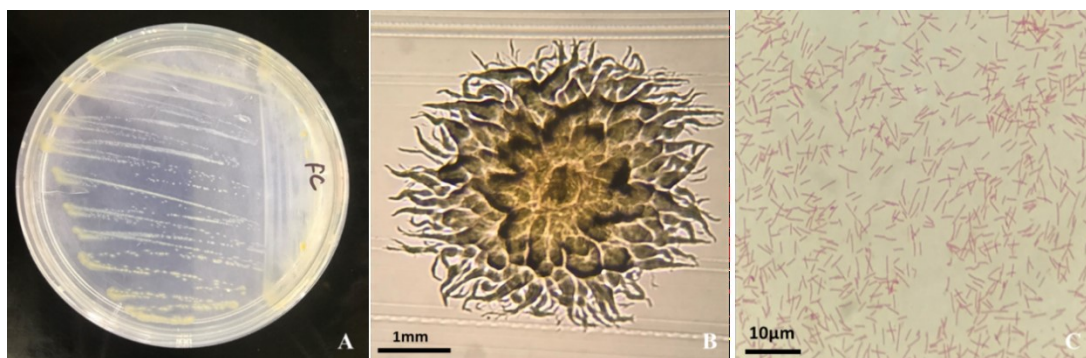
2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu về tỉ lệ cá chết tích lũy trong quá trình cảm nhiễm, mức độ kháng/nhạy của vi khuẩn với từng loại kháng sinh được tổng hợp và phân tích bằng phần mềm Excel 2013.



Ghi chú: Cá trắm cỏ có dấu hiệu xơ, bạc mang nặng (A); xơ, mòn vảy (B); bạc màu, tuột vảy và xuất hiện vi khuẩn Gram âm, dạng sợi mảnh ở các vùng tổn thương khi nhuộm tươi mẫu da (D) và mang (E).

Hình 1. Triệu chứng lâm sàng trên cá trắm cỏ nhiễm *F. columnare*



Ghi chú: A, B: Hình thái vi khuẩn *F. columnare* phát trên trên cytophagar sau 48h nuôi cấy; C: Hình dạng vi khuẩn sau nuôi cấy thuần.

Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và hình dạng vi khuẩn nghi *F. columnare* phân lập từ cá trắm cỏ nhiễm bệnh

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu, sàng lọc mẫu cá nhiễm bệnh

Trong nghiên cứu này, tổng số 103 mẫu cá trắm cỏ nghi nhiễm *F. columnare* đã được thu và sàng lọc từ 25 hộ nuôi ở 3 tỉnh Hà Nội, Bắc Ninh và Hải Dương. Cá nghi nhiễm bệnh có các dấu hiệu lâm sàng đặc trưng như xuất hiện đốm bạc màu, mất vảy trên cơ thể, xơ, bạc vảy, tia mang xơ trắng. Cá nhiễm bệnh không thể hiện các bệnh tích bên trong các nội quan. Các vùng tổn thương trên da, mang cá nhiễm bệnh có sự xuất hiện của vi khuẩn gram âm (-) dạng sợi mảnh, tập trung thành cụm lớn hoặc xuất hiện rải rác trong mô bào (Hình 1).

F. columnare đã được ghi nhận là bệnh thường gặp, gây thiệt hại lớn với nghề nuôi cá trắm cỏ ở nhiều nước trên thế giới, tuy nhiên tại Việt Nam chưa có các nghiên cứu, báo cáo chính thức về tác nhân gây bệnh này trên cá trắm cỏ. Dấu hiệu bệnh ghi nhận được trên cá trắm cỏ nhiễm *F. columnare* trong nghiên cứu hoàn toàn tương đồng với mô tả của Lu & cs. (2021). Dấu hiệu tia mang xơ, bạc màu xuất hiện các vùng trắng bạc và mất màu trên cơ thể là các dấu hiệu bệnh đặc trưng nhất của cá nhiễm *F. columnare* (Declercq & cs., 2013a). Các vùng tổn thương trên mang làm giảm khả năng hô hấp của cá, gây suy giảm chức năng sinh lý của cơ thể và có thể gây chết khi các vùng tổn thương lan rộng. Ngoài ra, mang và da đóng vai trò quan trọng đối với khả năng miễn dịch của

cá. Khi các cơ quan này bị tổn thương, khả năng miễn dịch của cá suy giảm (Koppang & cs., 2015), dẫn đến cá dễ nhiễm các loại tác nhân gây bệnh khác hoặc chống chịu kém với điều kiện môi trường nuôi. Các báo cáo trước đó cũng ghi nhận vi khuẩn *F. columnare* ít tấn công và nhiễm vào các cơ quan nội tạng (Declercq & cs., 2013a) vì vậy không xuất hiện dấu hiệu bệnh đặc trưng ở các cơ quan này.

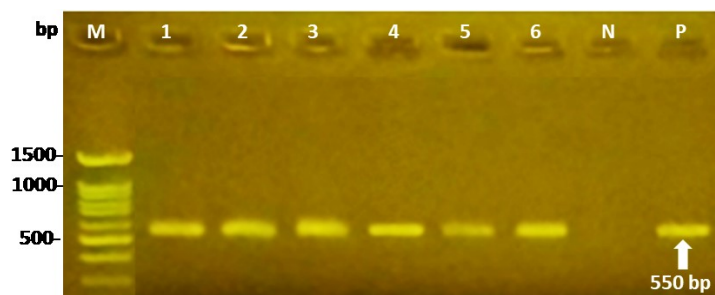
3.2. Kết quả phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Quá trình nuôi cấy phân lập đã thu được 67 chủng vi khuẩn thuần màu vàng, dạng rẽ đặc trưng, phát triển sau 36-48h nuôi cấy trên môi trường Cytophagar. Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái, và đặc tính sinh hóa của 25 chủng vi khuẩn đại diện (1 chủng/hộ) cho thấy 25/25 chủng đều có các đặc điểm về hình thái, sinh hóa đồng nhất và tương đồng với kết quả thu được trên chủng chuẩn *F. columnare* ATCC 23463 (Bảng 1). Một số đặc điểm đặc trưng của các chủng vi khuẩn ghi nhận được như: không phát triển trên môi trường giàu dinh dưỡng TSA; trên môi trường Cytophagar, khuẩn lạc vi khuẩn có dạng rẽ đặc trưng, màu vàng, lồi, bám sâu trên bề mặt thạch, đạt kích thước khoảng 0,5-3mm sau 36-48h nuôi cấy. Vi khuẩn Gram âm, dạng sợi mảnh, kích cỡ khoảng 0,5-1,0 × 4-10µm (Hình 2), tất cả các chủng đều có khả năng di động trượt, phản ứng dương tính với các thuốc thử catalase, oxidase, flexirubin và Red congo.

Bảng 1. Kết quả thử một số đặc tính hình thái, sinh hoá của các chủng vi khuẩn nghi *F. columnare* phân lập được từ cá trắm cỏ nhiễm bệnh

Đặc tính sinh thái, sinh hóa	Chủng phân lập từ cá trắm cỏ nhiễm bệnh (n = 25)	Chủng chuẩn <i>F. columnare</i> ATCC 23463
Gram	-	-
Phát triển trên TSA	-	-
Hình thái khuẩn lạc trên Cytophagar	Rẽ	Rẽ
Hình thái vi khuẩn	Sợi mảnh	Sợi mảnh
Di động trượt	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Flexirubin	+	+
Red congo	+	+

Ghi chú: (+): Phản ứng dương tính; (-): Phản ứng âm tính.



Ghi chú: M: Marker. Giếng 1-6 tương ứng là các chủng đại diện phân lập trên cá trắm cỏ nhiễm bệnh thu từ Hà Nội, Bắc Ninh và Hải Dương (2 chủng/tỉnh); N: Đối chứng âm; P: Đối chứng dương (chủng *F. columnare* ATCC23463).

Hình 3. Kết quả giám định đại diện cho 6 chủng *F. columnare* từ cá trắm cỏ bằng PCR

Theo Kunttu & cs. (2011) và Dong & cs. (2015), vi khuẩn *F. columnare* có nhiều dạng hình thái khuẩn lạc khác nhau như dạng rễ cây, màu vàng; dạng rìa lồi lõm nhẹ và dạng rìa tròn nhẵn, với khuẩn lạc dạng rễ là chỉ thị cho khả năng di động trượt của vi khuẩn (Chang & cs., 1984). Tính di động trượt cũng quan sát được ở tất cả các chủng vi khuẩn dạng rễ thu được trong nghiên cứu này. Quan trọng hơn, các chủng có hình thái khuẩn lạc khác nhau thì có mức độ độc lực khác nhau, trong đó chỉ có chủng dạng rễ có mức độ độc lực cao với các loài thủy sản (Dong & cs., 2015; Kunttu & cs., 2011). Như vậy, các chủng vi khuẩn dạng rễ phân lập được từ cá trắm cỏ có thể là các chủng độc lực, có khả năng gây bệnh trên cá.

Quá trình giám định bằng PCR đối với 25 chủng đại diện sau thử sinh hóa cho kết quả 25/25 chủng dương tính với đoạn môi đặc hiệu cho loài *F. columnare*, kích cỡ đoạn môi khoảng 550bp, trùng với vị trí xuất hiện vạch của chủng đối chứng dương *F. columnare* ATCC23463 (Hình 3). Kết hợp các kết quả đánh giá hình thái, sinh hóa và giám định bằng PCR khẳng định 25 chủng vi khuẩn thuần lựa chọn đại diện đều là *F. columnare*.

3.3. Kết quả cảm nhiễm khẳng định tác nhân gây bệnh

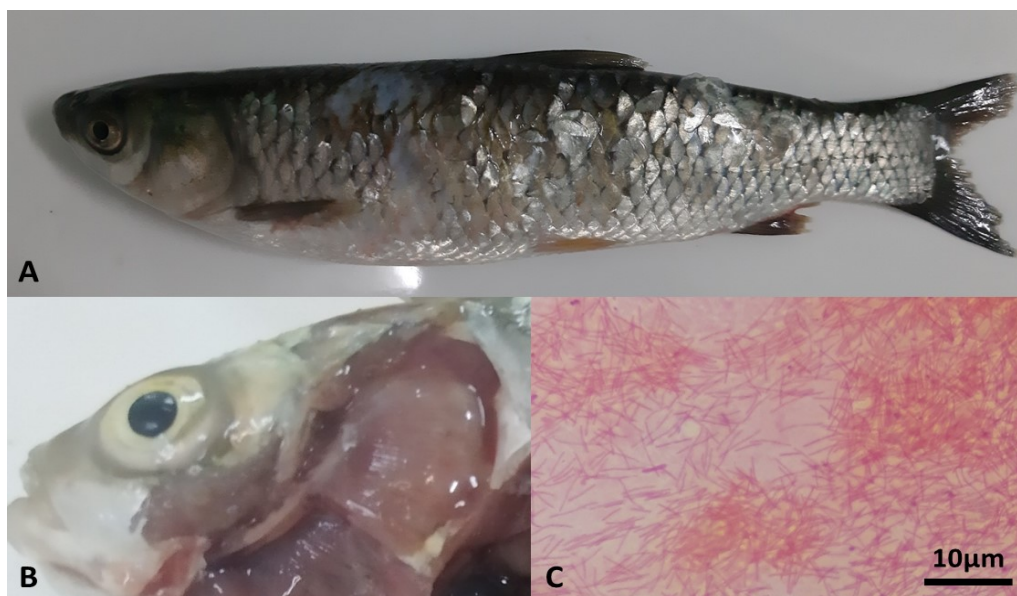
Để khẳng định các chủng *F. columnare* phân lập được là tác nhân gây bệnh theo quy tắc Koch's, 03 chủng đại diện cho 3 tỉnh thu mẫu đã được sử dụng để cảm nhiễm trên cá trắm cỏ. Kết quả ngâm cảm nhiễm 2×10^6 CFU/ml trong 2h

cho thấy 100% cá cảm nhiễm ở các lô thí nghiệm chết sau 72h nhiễm bệnh. Trong khi đó, không có cá chết ở các lô đối chứng (Bảng 2).

Cá chết trong quá trình cảm nhiễm xuất hiện các triệu chứng tương đồng với cá nhiễm bệnh ngoài tự nhiên như bơi lơ dờ, và ngáp bề mặt do thiếu khí. Kiểm tra lâm sàng cho thấy mặc dù đặc điểm bạc da chưa thể hiện rõ như cá mắc bệnh tự nhiên, điều này có thể do nồng độ gây nhiễm cao và cá chết cấp tính, tuy nhiên những cá chết từ 48-72h đều có biểu hiện trắng mang do vi khuẩn tấn công làm tắc tuần hoàn mang, tia mang có những vùng hoại tử và bạc màu (Hình 4A). Mẫu nhuộm gram, soi tươi các vị trí tổn thương đều có sự hiện diện dày đặc của vi khuẩn gây bệnh dạng sợi mảnh, gram âm (Hình 4B). Khuẩn lạc sau nuôi cấy có hình thái tương đồng với chủng vi khuẩn đưa vào cảm nhiễm. Ba chủng phân lập lại từ cá cảm nhiễm được giám định lại bằng PCR đều cho kết quả dương tính với gen xác định loài *F. columnare*. Như vậy, kết quả cảm nhiễm một lần nữa khẳng định vi khuẩn *F. columnare* là tác nhân gây bệnh trên cá trắm cỏ nhiễm bệnh thu từ tự nhiên. Ngoài ra, theo Kuo & cs. (1981) vi khuẩn này sinh sản nhanh và phát tán ra xung quanh và môi trường nước, chúng tiết chất độc và làm hoại tử gốc mang, làm cá thiếu khí gây chết nhanh. Các chủng độc lực cao có thể gây chết cấp tính cho cá trong 24h. Từ kết quả cảm nhiễm trong nghiên cứu này cho thấy các chủng *F. columnare* phân lập được ở các vùng nuôi cá trắm cỏ ở Việt Nam là những chủng có độc lực cao.

Bảng 2. Kết quả theo dõi tỉ lệ cá chết sau cảm nhiễm

Chủng vi khuẩn	Tỉ lệ chết tích lũy (%)		
	24h	48h	72h
FC-TC-HD02	36,7 ± 4,7	73,3 ± 18,8	100 ± 0
FC-TC-HN03	40,0 ± 9,4	76,7 ± 14,1	100 ± 0
FC-TC-BN05	43,3 ± 14,1	73,3 ± 9,4	100 ± 0
Đối chứng	0	0	0



Ghi chú: A: Cá cảm nhiễm có dấu hiện đốm bạc màu trên da, mòn vẩy và dễ bong vẩy; B: Bạc và hoại tử mang; C: Vi khuẩn tập trung thành đám lớn trên các vùng tổn thương.

Hình 4. Cá trắm cỏ nhiễm bệnh trong quá trình cảm nhiễm

Bảng 3. Kết quả thử kháng sinh đồ đối với 25 chủng *F. columnare* phân lập từ cá trắm cỏ

Tên kháng sinh	Kí hiệu	Nhạy	Nhạy trung bình	Kháng
		n (%)		
Doxycycline	DX	23 (92,0)	2 (8,0)	0 (0,0)
Sulfamethoxazole /Trimethoprim	SMX/TMP	14 (56,0)	0 (0,0)	11 (44,0)
Amoxicillin	AX	23 (92,0)	1 (4,0)	1 (4,0)
Erythromycin	ER	18 (72,0)	3 (12,0)	4 (16,0)
Florfenicol	FL	23 (92,0)	0 (0,0)	2 (8,0)
Oxytetracycline	OTC	24 (96,0)	1 (4,0)	0 (0,0)

3.4. Mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá trắm cỏ

Kháng sinh thường được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn trong nuôi trồng thủy sản. Việc sử dụng kháng sinh không đúng cách,

lạm dụng kháng sinh dễ dẫn đến hiện tượng kháng thuốc, giảm hiệu quả điều trị bệnh. Trong nghiên cứu, mức kháng/nhạy của 25 chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập từ cá trắm cỏ nhiễm bệnh đã được đánh giá đối với 6 loại kháng sinh được phép sử dụng trong NTTS. Kết

qua thử nghiệm cho thấy các chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập được đều có mức nhạy khá cao với 6 loại kháng sinh thử nghiệm, tỉ lệ nhạy từ 56-96% (Bảng 3). Không có chủng vi khuẩn *F. columnare* nào kháng với doxycycline, oxytetracycline; tỉ lệ chủng nhạy với hai loại kháng sinh này tương ứng ở mức 92% và 96%. Trên 90% số chủng thể hiện mức nhạy cao với florfenicol và amoxicillin, trong khi tỉ lệ chủng kháng với erythromycin và sulfamethoxazole/trimethoprim cao hơn các kháng sinh khác, tương ứng ở mức 16,0% và 44,0%.

Mức nhạy cao của vi khuẩn *F. columnare* với hầu hết các loại kháng sinh sử dụng trong NTTS ghi nhận được trong nghiên cứu tương đồng với các kết quả đã được Tohnee & Deemagarn (2013) và Declercq & cs. (2013b) báo cáo trên *F. columnare* phân lập được từ cá rô phi và nhiều loài cá nước ngọt khác. Trong số các loại kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu, hỗn hợp kháng sinh sulfamethoxazole/trimethoprim (SMX/TMP) có mức kháng cao nhất (44% số chủng), trong khi mức kháng của 5 loại kháng sinh còn lại ở mức từ 0-16%. Tỉ lệ nhạy của *F. columnare* phân lập từ cá trắm cỏ đối với SMX/TMP trong nghiên cứu (56%) cao hơn so với mức nhạy của *F. columnare* phân lập từ cá tra (30%) trong công bố của tác giả Từ Thanh Dung & cs. (2012). Tuy nhiên so với các loại kháng sinh khác sử dụng trong nghiên cứu, mức kháng của SMX/TMP cao có thể dẫn đến giảm hiệu quả nếu sử dụng kháng sinh này trong quá trình điều trị.

4. KẾT LUẬN

F. columnare là tác nhân gây bệnh xơ, bạc mang, xơ vây và bạc màu da trên cá trắm cỏ. Các chủng vi khuẩn phân lập được đều có khuẩn lạc dạng rẽ, di động trượt, là các chủng có độc lực cao trên động vật thủy sản và được chứng minh bằng cảm nhiễm thực nghiệm. Vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá trắm cỏ có tỉ lệ nhạy cao với 4 loại kháng sinh oxytetracycline, amoxicillin, florfenicol, doxycycline, trong khi tỉ lệ chủng kháng với erythromycin, sulfamethoxazole/ trimethoprim ở mức cao.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các hộ nuôi cá trắm cỏ tại các tỉnh đã phối hợp thực hiện, tạo điều kiện thu mẫu để hoàn thành nghiên cứu này. Nghiên cứu được thực hiện dưới sự tài trợ của dự án Việt- Bỉ với mã số đề tài T2021-14-23VB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bernardet J.F. & Grimont P.A. (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 39(3): 346-354.
- Buller N.B. (2004). Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. Cabi.
- Chang L., Pate J.L. & Betzig R. (1984). Isolation and characterization of nonspreading mutants of the gliding bacterium *Cytophaga johnsonae*. Journal of bacteriology. 159: 26-35.
- CLSI (2016). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET04. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Declercq A.M., Haesebrouck F., Van den Broeck W., Bossier P. & Decostere A. (2013a). Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. Veterinary research. 44: 1-17.
- Declercq A., Boyen F., Van Den Broeck W., Bossier P., Karsi A., Haesebrouck F. & Decostere A. (2013b). Antimicrobial susceptibility pattern of *Flavobacterium columnare* isolates collected worldwide from 17 fish species. Journal of fish diseases. 36: 45-55.
- Dong H., LaFrentz B., Pirarat N. & Rodkhum C. (2015). Phenotypic characterization and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from red tilapia, *Oreochromis* sp., in Thailand. Journal of fish diseases. 38: 901-913.
- Dong H., Senapin S., LaFrentz B. & Rodkhum C. (2016). Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid

- morphotypes of *Flavobacterium columnare* in red tilapia, *Oreochromis sp.*, fry. *Journal of fish diseases*. 39: 649-655.
- FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in action*. Rome, Italy. p. 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Koppang E.O., Kvellestad A. & Fischer U. (2015). Fish mucosal immunity: gill Mucosal health in aquaculture. Elsevier. pp. 93-133.
- Kunttu H., Jokinen E., Valtonen E. & Sundberg L.R. (2011). Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 1319-1326.
- Kuo S.C., Chung H.Y. & Kou G.H. (1981). Studies on artificial infection of the gliding bacteria in cultured fishes. *Fish Pathology*. 15: 309-314.
- Lu Z., Gao R., Duan Y., Han R., Guo W., Dan X. & Li Y. (2021). Isolation and genetic characterization of *Flavobacterium columnare* from grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, in China. *Aquaculture*. 541: 736762.
- Shen Y., Wang L., Fu J., Xu X., Yue G.H. & Li J. (2019). Population structure, demographic history and local adaptation of the grass carp. *BMC genomics*. 20(1): 1-16.
- Shi F., Lu Z., Yang M., Li F., Zhan F., Zhao L., Li Y., Li Q., Li J. & Li J. (2021). Astragalus polysaccharides mediate the immune response and intestinal microbiota in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*. 534: 736205.
- Tohmee N. & Deemagarn T. (2013). *Flavobacterium columnare* isolated from brains of pond culture Nile tilapia in Thailand. 38th ICVS Conference, Bangkok, Thailand.
- Từ Thanh Dung, Nguyễn Anh Tuấn & Nguyễn Thị Tiên (2012). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh trắng đuôi trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và giải pháp điều trị. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 22c: 136-145.
- Welker T.L., Shoemaker C.A., Arias C.R. & Klesius P.H. (2005). Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Diseases of aquatic organisms*. 63:129-138.