TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY ĐÔ

KHOA SINH HỌC ỨNG DỤNG

LUẬN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC

CHUYÊN NGÀNH NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

MÃ SỐ: 304

XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU CỦA FLORFENICOL ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA TẠI ĐỒNG THÁP VÀ AN GIANG

SINH VIÊN THỰC HIỆN

PHẠM THỊ LINH MỤI

MSSV:06803021

Lớp NTTS K1

Cần Thơ, 2010

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY ĐÔ

KHOA SINH HỌC ỨNG DỤNG

LUẬN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC

CHUYÊN NGÀNH NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

MÃ SỐ: 304

XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU CỦA FLORFENICOL ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA TẠI ĐỒNG THÁP VÀ AN GIANG

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

Th.s LÂM PHÚC NHÂN

Ks. PHẠM THANH HƯƠNG

SINH VIÊN THỰC HIỆN

PHẠM THỊ LINH MỤI

MSSV:06803021

Lớp NTTS K1

Cần Thơ, 2010

XÁC NHẬN CỦA HỘI ĐỒNG BẢO VỆ LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC

Luận văn: Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của florfenicol đối với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá tra tại Đồng Tháp và An Giang.

Sinh viên thực hiện: PHẠM THỊ LINH MỤI

Lớp: Nuôi trồng thủy sản K1

Đề tài được hoàn thành theo yêu cầu cuả cán bộ hướng dẫn và hội đồng bảo vệ luận văn đại học Khoa Sinh Học Ứng Dụng – Đại Học Tây Đô.

Cần Thơ, ngày……tháng……năm…….

Cán bộ hướng dẫn **Sinh viên thực hiện**

ThS. LÂM PHÚC NHÂN **PHẠM THỊ LINH MỤI**

KS. PHẠM THANH HƯƠNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

PG.s. T.s. NGUYỄN VĂN BÁ

LỜI CẢM TẠ

Sau 3 tháng thực tập từ tháng 3 năm 2010 đến tháng 6 năm 2010 tại Chi Cục Thủy Sản Thành Phố Cần Thơ, 168 Hai Bà Trưng, Phường Tân An -Quận Ninh Kiều-Thành Phố Cần Thơ, áp dụng những kiến thức đã học kết hợp với kinh nghiệm thực tế, luận văn đã được chỉnh sữa và hoàn thành.

Em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đối với thầy Lâm Phúc Nhân và cô Phạm Thanh Hương Phòng Thí Nghiệm Chi Cục Thủy Sản TP. Cần Thơ đã tận tình giúp đỡ cho em suốt thời gian làm đề tài.

Em xin chân thành cám ơn quý thầy cô – Khoa Sinh Học Ứng Dụng – Trường Đại Học Tây Đô đã tận tình dạy bảo, truyền đạt cho em những kiến thức qúy báu trong những năm học vừa qua, tạo dựng hành trang để em bước vào cuộc sống sau này.

Xin cám ơn tất cả cô chú, anh chị trong Chi Cục Thủy Sản Thành Phố Cần Thơ đã tận tình chỉ dẫn, giúp đỡ và đóng góp ý kiến bổ ích để hoàn thành thực tập tốt nghiệp.

Chân thành cám ơn tất cả các bạn trong lớp NTTS K1 trong thời gian qua luôn ủng hộ, động viên để hoàn thành thực tập tốt nghiệp.

Em xin cám ơn Cha, mẹ, anh, em tôi đã luôn động viên và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Với sự hiểu biết còn hạn hẹp và thu thập tài liệu còn hạn chế nên báo cáo tốt nghiệp không tránh khỏi sự sai sót. Kính mong được sự đóng góp ý kiến của quý thầy cô và các bạn.

Em xin chân thành cám ơn và ghi nhớ!

PHẠM THỊ LINH MỤI

CAM KẾT KẾT QUẢ

Tôi xin cam kết luận văn này được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu của tôi và kết quả nghiên cứu này chưa được dùng cho bất kỳ luận văn cùng cấp nào khác.

PHẠM THỊ LINH MỤI
Ngày: ……

TÓM TẮT

Mục tiu của nghin cứu l xc ịnh nồng ộ ức chế tối thiểu của thuốc khng sinh florfenicol ln 10 chủng vi khuẩn Edwardsiella ictaluri gy bệnh trn c tra ở tỉnh An Giang v Đồng Thp. Kết quả phn lập kiểm tra cc chỉ tiu cơ bản v ịnh danh bằng bộ kit API 20E xc ịnh ược 10 chủng E. ictaluri gy bệnh gan thận mủ trn c tra. Để at ược mục tiu ề ti ề ra, phương php lập khng sinh ồ ở ĩa khng sinh thương mại (30 µg) v ĩa khng sinh tự tạo ở cc nồng ộ (50 µg, 70 µg, 90 µg, 110 µg, 130 µg, 150 µg) v phương php pha long thuốc khng sinh trong môi trường lỏng theo phương php Broth (Geert Huys, 2002) nhằm xc ịnh ộ nhạy v gi trị MIC của florfenicol ln 10 chủng vi khuẩn E. ictaluri trn.

Kết quả khng sinh ồ trn 10 chủng vi khuẩn E. ictaluri có 30% số chủng vi khuẩn nhạy với ĩa khng sinh florfenicol 30 µg, 60% chủng vi khuẩn nhạy ở 90 µg v 90% chủng vi khuẩn nhạy với 110 µg. Kết quả gi trị MIC l 30% nhạy ở 2 µg/ml, 60% nhạy ở 32 µg/ml, 100% nhạy ở 128 µg/ml. Kết quả nghin cứu cho thấy khng sinh florfenicol còn nhạy với vi khuẩn E. ictaluri nhưng với nồng ộ thuốc khng sinh cao hơn nồng ộ florfenicol chuẩn.

Từ khóa: Edwardsiella ictaluri, florfenicol, gan thận mủ, c tra.

MỤC LỤC

Trang

LỜI CẢM TẠ ..... **i**

CAM KẾT KẾT QUẢ ..... **ii**

TÓM TẮT ..... **iii**

MỤC LỤC ..... **iv**

DANH MỤC BẢNG ..... **vi**

DANH MỤC HÌNH ..... **vii**

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT ..... **viii**

CHƯƠNG 1: ĐẶT VẤN ĐỀ **1**

1.1 Giới thiệu 1

1.2 Mục tiêu nghiên cứu 2

1.3 Nội dung nghiên cứu 2

CHƯƠNG 2: LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU **3**

2.1 Đặc điểm sinh học cá tra 3

2.2. Một số nghiên cứu trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* 3

2.2.1. Đặc iểm sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn E. ictaluri 3

2.2.2. Phổ loài cảm nhiễm và phân bố của vi khuẩn *E.ictaluri* 4

2.2.3. Triệu chứng và bệnh tích của cá bệnh 4

2.2.4. Đường lây truyền 5

2.3 Sơ lược về thuốc kháng sinh 5

2.3.1 Đặc điểm của kháng sinh florfenicol 6

2.3.2 Những nghiên cứu về kháng sinh florfenicol trong điều trị bệnh trên động vật thủy sản 7

CHƯƠNG 3:VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU **9**

3.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu 9

3.2 Vật liệu nghiên cứu 9

3.2.1 Đối tượng thí nghiệm 9

3.2.2 Dụng cụ thí nghiệm 9

2.2.3 Hóa chất thí nghiệm..... 9
3.3. Phương pháp nghiên cứu.....9
3.3.1. Phương pháp thu mẫu bảo quản và vận chuyển.....9
3.3.2. Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn 10
3.3.3. Phương pháp kiểm tra kháng sinh đồ.....11
3.3.4. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)..... 12
CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ THẢO LUẬN..... 14
4.1 Kết quả thu mẫu cá tra..... 14
4.2 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn cá bệnh.....15
4.2.1 Kết quả phân lập vi khuẩn và kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa..... 15
4.2.2. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa bằng bộ kít API 20E trên vi khuẩn E.ictaluri..... 17
4.3 Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ trên các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* 19
4.4 Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh lên vi khuẩn *E. ictaluri* 22
4.5 So sánh tính nhạy của vi khuẩn E. ictaluri ở hai tỉnh An Giang và Đồng Tháp..... 24
CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT.....26
5.1 Kết luận 26
5.2 Đề xuất.....26
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....27
PHỤ LỤC

DANH SÁCH BẢNG

Trang

Bảng 1.1 Dấu hiệu bệnh lý và đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*..... 14

Bảng 4.2 Kết quả kiểm tra các đăc điểm hình thái, sinh hóa của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* *17*

Bảng 4.3 Kết quả test API 20E trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra 18

Bảng 4.4 Kết quả kháng sinh đồ của florfenicol ở nồng độ30 µg, 70 µg, 90 µg và 110 µg lên chủng vi khuẩn E10068. 20

Bảng 4.5 Bảng Giá trị MIC của 10 chủng vi khuẩn E. Ictaluri 23

DANH SÁCH HÌNH

Trang

Hình 2.1 Công thức cấu tạo florfenicol 6

Hình 4.1: Cá bị bệnh gan thận mủ với nhiều đốm trắng ở gan, thận, tỳ.....15

Hình 4.2: Khuẩn *Edwardsiella ictaluri* Phát triển trên môi trường TSA sau 48h, kích thước li ti có màu trắng đục..... 16

Hình 4.3: Hình nhuộm Gram vi khuẩn *E. ictaluri* Gram âm (100X) 17

Hình 4.4: Bộ kit API 20E (A) và kết quả test các chỉ tiêu sinh hóa của vi khuẩn *E. ictaluri* sau 24 giờ (B) 19

Hình 4.5: Đĩa khng sinh ở nồng ộ 30 µg, 70 µg, 90 µg v 110 µg..... 22

Hình 4.6: Kết quả gi trị MIC của khng sinh florfenicol ln chủng vi khuẩn E10077..... 24

Hình 4.7: Đường kính vô trng (mm) của vi khuẩn E. ictaluri phn lập ở An (A) Giang v Đồng Thp (B) với ĩa khng sinh florfenicol thương mại (30 µg) 25

Hình 4.8: Gi trị MIC của vi khuẩn E. ictaluri phn lập ở An Giang (A) v Đồng Thp (B).....26

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Đồng bằng sông cửu long	ĐBSCL
Edwardsiella ictaluri	*E. ictaluri*
Edwardsiella ictaluri 10058	E10058
Edwardsiella ictaluri 10059	E10059
Edwardsiella ictaluri 10063	E10063
Edwardsiella ictaluri 10064	E10064
Edwardsiella ictaluri 10066	E10066
Edwardsiella ictaluri 10068	E10068
Edwardsiella ictaluri 10073	E10073
Edwardsiella ictaluri 10074	E10074
Edwardsiella ictaluri 10075	E10075
Edwardsiella ictaluri 10077	E10077
Minimal inhibitory concentration	MIC
Trytone Soya Agar	TSA
Nutrient Agar	NA
Mueller Hinton Agar	MHA
Nutrient Broth	NB

CHƯƠNG 1

ĐẶT VẤN ĐỀ

1.1 Giới thiệu

Trong nhiều năm qua ngnh thủy sản Việt Nam ˜ có những bước pht triển nhanh v ổn ịnh góp phần quan trọng vo sự tăng trưởng của nền kinh tế quốc dn. Tỷ trọng của thủy sản trong khối nông, lm v ngư nghiệp v trong kinh tế quốc dn tăng dần qua cc năm. Ngnh thủy sản ˜ trở thnh ngnh kinh tế quan trọng, góp phần chuyển ổi cơ cấu nông nghiệp nông thôn, tham gia xóa ãi giảm ngho, cải thiện cuộc sống cộng ồng dn cư.

Cc ối tượng nuôi hiện nay chủ yếu l cc loi c nước ngọt v tôm biển. Ở Đồng Bằng Sông Cửu Long ối tượng c nước ngọt ược nuôi nhiều nhất l c tra. C tra ược xem l một trong những mặt hng thủy sản xuất khẩu có thế mạnh của Việt Nam. Tuy nhin, trong hai năm trở lại ˆy ˜ có nhiều dấu hiệu bất ổn xuất hiện trong qu trình nuôi v tiu thụ c tra, m dấu hiệu r nt nhất l sự sụt giảm diện tích nuôi v tổng gi trị kim ngạch xuất khẩu.

Theo bo co của Cục Thủy Sản năm 2009 diện tích nuôi trồng thủy sản ton vng phía Nam l 926.770 ha với sản lượng ạt 2.123.160 tấn, chiếm 79,0% về diện tích v 80,0% sản lượng của cả nước. Trong ã, riêng diện tích nuôi c tra l 6.788 ha với sản lượng ạt 998.255 tấn (Đỗ Hải Linh, 2009).

Do nhu cầu cá tra xuất khẩu và tiêu thụ trong nước đều tăng cao, nên giải pháp quan trọng để tạo thêm nhiều sản phẩm là nuôi công nghiệp tập trung. Tuy nhiên, môi trường nuôi ngày càng biểu hiện xấu kết hợp với việc nuôi cá tra phát triển nhanh mà không theo quy hoạch (số lượng chất hữu cơ thải trực tiếp ra môi trường là rất lớn so với nuôi các đối tượng thủy sản khác) nên cá nuôi ngày càng phải chịu đựng với điều kiện môi trường sống khắc nghiệt, bệnh dễ có điều kiện phát triển lây lan (Nguyễn Quốc Thịnh, 2006).

Các bệnh thường xuất hiện trên cá tra nuôi hiện nay như: bệnh ký sinh trùng, các bệnh nhiễm khuẩn như bệnh đốm đỏ, bệnh gan thận mủ, bệnh lở loét… Trong đó bệnh gan thận mủ do *Edwardsiella ictaluri* được xem là bệnh nguy hiểm nhất vì gây chết rất nhanh và tỉ lệ chết cao (Từ Thanh Dung và *ctv*, 2004). Trước đây, thuốc kháng sinh chloramphenicol được người nuôi sử dụng nhiều trong việc điều trị bệnh gan thận mủ trên cá tra do hiệu lực diệt khuẩn cao. Nhưng từ năm 2004 Bộ thủy sản Việt Nam đã cấm sử dụng chloramphenicol trong nuôi trồng thủy sản vì chúng gây ra hiện tượng thoái hóa tủy xương. Tuy nhiên, dẫn xuất Florinated của kháng sinh này đã được thay thế là florfenicol và nhanh chóng được sử dụng phổ biến trong chăn nuôi và thủy sản.

Crumlish *et al* (2002) ghi nhận các chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* nhạy hoàn toàn với thuốc florfenicol. Sau thời gian nuôi nông dân sử dụng nhiều loại kháng sinh kết quả đã hình thành *Edwardsiella ictaluri* kháng với florfenicol với tỷ lệ là 42,5% (Nguyễn Hữu Thịnh và *ctv*, 2007).

Theo bo co Chi cục Thủy Sản Thnh phố Cần Thơ ̃ lm khng sinh ồ ở nồng ộ 30 µg/ ĩa, với nồng ộ ny ̃ không kìm hm ược sự pht triển của vi khuẩn Edwardsiella ictaluri nhưng thông tin từ vi hộ nuôi c tra thì florfenicol vẫn còn dng ể trị bệnh do vi khuẩn Edwardsiella ictaluri nhưng chưa xc ịnh ược nồng ộ tối thiểu. Chính vì thế ề ti "**Xc định nồng độ ức chế tối thiểu của florfenicol đối với vi khuẩn Edwardsiella ictaluri gy bệnh trn c tra tại Đồng Thp v An Giang** " ược thực hiện l rất cần thiết.

1.2 Mục tiu nghin cứu

Xc ịnh hm lượng ức chế tối thiểu của florfenicol ối với vi khuẩn Edwardsiella ictaluri gy trn c tra nhằm lm cơ sở cho việc chọn lựa hm lượng thuốc florfenicol trong việc iều trị bệnh gan thận mủ trn c tra ngoi thực tế hiện nay.

1.3 Nội dung nghin cứu

Phn lập, ịnh danh vi khuẩn Edwardsiella ictaluri trn 10 mẫu c tra bệnh.

Lập khng sinh ồ 10 chủng vi khuẩn trn với khng sinh florfenicol.

Xc ịnh nồng ộ ức chế tối thiểu MIC (Minimal inhibitory concentration) của florfenicol ối với cc chủng vi khuẩn trn.

CHƯƠNG 2

LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU

2.1 Đặc điểm sinh học cá tra

Bộ siluriformes

Họ Pangasidae Bleeker, 1858

Giống Pangasianodon Rainboth, 1996

Loài P.hypophthalmus Sauvage, 1878

Cá tra Pangasianodon hypophthalmus phân bố ở lưu vực sông Mekong, có mặt ở cả 4 nước: Việt Nam, Lào, Thái Lan và Campuchia. Ở nước ta cá bột và cá giống chủ yếu vớt trên sông Tiền, cá trưởng thành chỉ thấy ở trong ao tù nước đọng, nhiều chất hữu cơ, oxy hòa tan thấp và có thể nuôi với mật độ cao. Tuổi thành thục: 3-4 năm tuổi. Cá có tập tính di cư ngược dòng đẻ trứng. Mùa sinh sản của cá trên sông Mekong tập trung từ tháng 5-7 (âm lịch) hàng năm. Trong tự nhiên, cá tra là loài ăn tạp, cá ăn được mùn bã hữu cơ, rễ cây sinh vật, rau quả, tôm tép, cua, côn trùng, ốc và cá... Cá 3 ngày tuổi ăn phiêu sinh động vật (trích bởi Nguyễn Văn Thường, 2008). Cá tra là loài có tốc độ sinh trưởng nhanh, sau 1 năm nuôi cá đạt trọng lượng 1–1,5 kg/con, trong những năm sau cá lớn nhanh hơn, có thể đạt 25 kg ở cá 10 tuổi.

2.2 Một số nghiên cứu trên vi khuẩn Edwardsiella ictaluri

2.2.1 Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn E. ictaluri

Vi khuẩn E. ictaluri được mô tả bởi Hawker et al (1981) là một loài đặc trưng thuộc nhóm Enterobacteriaceae, là vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn, kích thước 0,75 x 1,5-2,5 µm. Theo kết quả nghiên cứu của Plumb (1993) thì vi khuẩn E. ictaluri cũng có dạng hình que thẳng nhỏ nhưng kích thước có thay đổi 1 µm x 2-3 µm. Di động yếu ở 25-30 ^{0}C, không di động ở nhiệt độ cao, lên men glucose, không oxy hóa, phản ứng catalase dương tính, âm tính trong phản ứng ở oxidase, phát triển tốt ở 28 ^{0}C và phát triển yếu ở 37 ^{0}C (Từ Thanh Dung và ctv, 2004).

Từ Thanh Dung và ctv (2004) vi khuẩn có thể phân lập từ mẫu cá bệnh (Gan, thận, tỳ tạng) trên môi trường TSA (Trytone Soya Agar) hoặc NA (Nutrient Agar) sau 48 giờ ở 28 ^{0}C tạo thành khuẩn lạc trắng đục. Đặc điểm sinh hóa vi khuẩn E. ictaluri cho hầu hết các phản ứng âm tính, chỉ có 2 phản ứng dương tính là Lysine và Gluose. Vi khuẩn E. ictaluri cho phản ứng Indole và H_2S âm tính. Còn theo kết quả kiểm tra API 20E của Lương Trần Thục Đoan (2006) cho thấy

vi khuẩn E. ictaluri phản ứng dương tính GLU (Glucose) còn các đường khác MAN, INO, SUR, RHA, SAC, MEL, AMY và ARA đều âm tính, vi khuẩn còn cho phản ứng âm tính với ONPG, ADH, ODC, H_2S, URE, TDA, IND, VP, GEL. Ngoài ra còn cho phản ứng dương tính với LDC và CIT.

2.2.2 Phổ loài cảm nhiễm và phân bố của vi khuẩn E. ictaluri

Vi khuẩn E. ictaluri được phân lập đầu tiên trên cá Nheo Mỹ bởi Hawker (1979). Sau đó Austin (1999) đã phát hiện ra vi khuẩn này gây bệnh nhiễm trùng máu cấp tính trên cá Nheo Mỹ gây tỉ lệ hao hụt cao, với tên là Enteric Septicemia of Catfish (ESC), gây thiệt hại lớn cho ngành công nghiệp nuôi cá nheo. Năm 1985, Boonyaratpalin cũng đã phát hiện khuẩn E.ictaluri gây bệnh trên cá trê trắng (Clarias bactrachus) và trong môi trường nước Thái Lan (trích dẫn bởi Kasornchandra, 1987). Năm 2003, ở Indonesia nhóm nghiên cứu của Yuasa et al cũng lần đầu tiên chứng minh Edwardsiella ictaluri là tác nhân gây bệnh đốm trắng nội tạng cá tra.

Bệnh mủ gan do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra được phát hiện đầu tiên tại Việt Nam năm 1998 trên cá tra nuôi bè với dấu hiệu bệnh có nhiều nốt trắng trên gan (Ferguson *et al*, 2001). Đây là một bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho các hộ nuôi cá tra ở ĐBSCL. Theo Từ Thanh Dung và *ctv* (2004) bệnh mủ gan xuất hiện ở các tỉnh nuôi cá tra thâm canh phát triển mạnh như Vĩnh Long, Đồng Tháp và Cần Thơ. Tỉ lệ xuất hiện bệnh mủ gan trên cá tra khoảng 61% (mô hình nuôi ao), 73,4% (mô hình nuôi bè) và 88% ở mô hình nuôi đăng quầng (Trần Anh Dũng, 2005). Trong khi kết quả điều tra của Nguyễn Chính (2005), tỉ lệ xuất hiện bệnh mủ gan trên cá nuôi ở An Giang và Cần Thơ thì mô hình nuôi ao tỉ lệ xuất hiện là 82% và mức độ thiệt hại có thể lên đến 60-80%, ở mô hình nuôi bè tỉ lệ xuất hiện là 100% và mức độ thiệt hại có thể xảy ra từ 80-90%.

2.2.3 Triệu chứng và bệnh tích của cá bệnh

Vào những năm 2004, theo nghiên cứu của Đỗ Thị Hòa và ctv cá bị nhiễm vi khuẩn E. ictaluri thường có biểu hiện kém ăn hoặc bỏ ăn, gầy yếu, bụng thường trương to, xung quanh miệng thường có những đám xuất huyết. Một số cá có mắt lồi, đục một hay cả hai bên mắt (Nguyễn Hữu Thịnh và ctv, 2007).

Kết quả nghiên cứu mô học của Nguyễn Quốc Thịnh và ctv (2004) cho thấy cá bệnh biểu hiện ở các cơ quan: Gan, thận cá bị sưng rất to, thận có hiện tượng nhũn, tỳ tạng sưng ít lớn. Trên gan, thận, tỳ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng tròn, đường kính khoảng 1-3 mm các cơ quan này to và có hiện tượng nhũn ở thận. Tỷ lệ chết thay đổi từ 10-90% tổng số cá nuôi trong bể. Ngoài ra còn một số vùng bị xung huyết động mạch và tĩnh mạch gan, những cụm vi khuẩn xuất hiện ở rìa các vết thương các vết ngoại tử tạo thành bó trên mẫu mô ở các cơ quan gan, thận và tỳ tạng.

Đặc biệt l hệ thống mao mạch, hiện tượng ny lm cho tổ chức gan sưng to. Ở thận cũng xy ra hiện tượng xung huyết. Tỳ tạng l cơ quan cũng bị ảnh hưởng trầm trọng v có sự xuất hiện của những vng hoại tử. Sự hoại tử ở tỳ tạng ảnh hưởng nghim trọng ến hệ miễn dịch của c, do ˆy l cơ quan chủ yếu sản xuất ra bạch cầu do ĩ c bệnh nặng khng thể hầu như không còn. Ngoi, thận, gan, tỳ tạng, những cơ quan khc như mang, cơ, tim không có những biến ổi lớn khi c bị bệnh trắng gan. Tuy nhin ở mang có hiện tượng sưng phồng v dính lại của cc tia mang thứ cấp (Nguyễn Quốc Thịnh v ctv, 2004).

2.2.4 Đường ly truyền

Theo Shott v et al (1986) thì vi khuẩn E. ictaluri có thể nhiễm cho c bằng hai ường khc nhau. Vi khuẩn trong nước có thể qua ường mũi của c xm nhập vo cơ quan khứu gic v di chuyển vo dy thần khứu gic, sau ĩ vo no ến sọ v da. E. ictaluri cũng có thể xm nhiễm qua ường tiu hóa qua nim mạc ruột vo mu gy nhiễm trng mu. Bằng ường ny thì vi khuẩn vo mao mạch trong biểu bì gy hoại tử v mất sắc tố của da. C da trơn còn nhiễm E. ictaluri qua ường miệng gy nhiễm khuẩn ruột. Bệnh pht triển gy vim ruột, vim gan v vim cầu thận trong vòng 2 tuần khi nhiễm bệnh. Tóm lại, vi khuẩn E. ictaluri có thể xm nhập vo cơ thể c từ môi trường nước qua da, qua mang c v miệng bằng ường thức ăn gy bệnh mủ gan (Trích bởi Chu Hồng Thy, 2008).

2.3 Sơ lược về thuốc kháng sinh

Khái niệm thuốc kháng sinh: Thuốc kháng sinh là các chất hữu cơ có cấu tạo hóa học phức tạp, có nguồn gốc sinh học (do xạ khuẩn, vi khuẩn và nấm sinh ra), hay do con người tổng hợp nên, có tác dụng một cách chuyên biệt trên một giai đoạn chủ yếu trong chu trình biến dưỡng của các vi khuẩn (tác nhân kháng khuẩn) của nấm (tác nhân kháng nấm) (Nguyễn Văn Cảnh, 2004). Hiện tượng kháng sinh được Alexender Fleming phát hiện từ năm 1928 thông qua phát hiện qua chất penicillin do một loại nấm có tên là penicillin notatum sản sinh ra. Đến năm 1940, người ta đã sản xuất thành công penicillin, thử nghiệm trên động vật đã cho kết quả tốt, đến năm 1946 đã sản xuất penicillin kết tinh, từ đó đã bắt đầu thời kỳ mới của kháng sinh (Prescott, 2000).

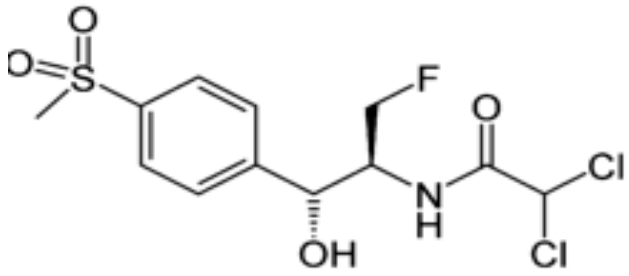
Trong nuôi trồng thủy sản việc sử dụng kháng sinh rất có hiệu quả trong các truờng hợp nhiễm khuẩn, giúp đông vật thủy sản phục hồi lại chức năng sinh lý bình thường, nâng cao tỉ lệ sống, nếu dùng kháng sinh đúng liều, đúng thuốc, đúng bệnh và đúng thời gian. Nhưng khi sử dụng kháng sinh có tác dụng tiêu cực vốn có của nó, nếu lạm dụng quá mức, sử dụng kháng sinh tùy tiện, thiếu hiểu biết có thể gây hậu quả nghiêm trọng tác động đến môi trường sinh thái, ảnh hưởng đến vật nuôi thủy sản, gây hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh và ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Tuy

vậy, việc dùng thuốc, đặc biệt là lạm dụng thuốc đang phổ biến trong ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam và các nước trong khu vực có thể đã mang lại hậu quả, các ảnh hưởng này càng nặng nề khi những người nông dân tham gia nuôi trồng thủy sản có những hiểu biết rất khiêm tốn về hiệu quả và tác dụng phụ của từng loại thuốc mà họ dùng hàng ngày (Bùi Thị Tho, 2003).

2.3.1 Đặc điểm của kháng sinh florfenicol

Trong những năm trước, hầu hết người chăn nuôi đều biết đến hiệu quả điều trị "thần kỳ" của chloramphenicol một kháng sinh của nhóm phenicol, nhưng hiện nay chloramfenicol đã cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản Việt Nam. Theo Dowling (2006) vì chloramphenicol có độc tính rất mạnh và là nguyên nhân gây ra hiện tượng thoái hóa tỷ xương. Tuy nhiên, dẫn xuất Florinated của kháng sinh này, đã được thay thế là florfenicol và nhanh chóng được sử dụng phổ biến trong chăn nuôi và thực phẩm, bao gồm ngành thủy sản (Dowling 2006; Michel et al, 2003; Wrzsinsk et al, 2005).

Công thức hóa học $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ (2,2-dichloro-N-((1R,2S)-3-fluoro-1-hydroxy-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)propan-2-yl)ethanamide).



Hình 2.1 Công thức cấu tạo florfenicol

Đặc tính

Florfenicol tan tốt trong dimethylformamide, methanol, ít tan trong acid acetic và khó tan trong nước (Zhejiang Hioar pharmaceutical Co.,LTD.) (Trích bởi Lê Thị Cẩm Tú, 2009).

Công dụng của kháng sinh florfenicol

Florfenicol là kháng sinh thế hệ mới nhất của phenicol, thuốc có tác dụng kìm khuẩn nhưng cũng có tác dụng diệt khuẩn trong một số trường hợp với điều kiện nhất định với nồng độ cao hơn. Thuốc có tác dụng ức chế vi khuẩn với nồng độ thấp, là một loại phổ rộng tác dụng lên nhiều loại vi khuẩn Gram âm, Gram dương (Bùi Thị Tho, 2003).

Cơ chế

Florfenicol có hoạt tính chống lại sự phát triển của vi khuẩn bằng cách kết dính với tiểu đơn vị 50S của ribosom, ngăn chặn cầu nối peptid giữa các acid amin. Vì vậy ức chế sự tổng hợp protein làm cho vi khuẩn không còn khả năng phát triển và tồn tại (Bùi Kim Tùng, 2001).

Cách dùng

Florfenicol có độ tồn dư thấp trong mô cơ. Dùng thuốc liều 10mg/kg thể trọng liên tục 12 ngày, khi ngưng sử dụng 7 ngày mức tồn dư trong cơ cá tra còn 0,222-0,109 ppm (mức cho phép của Việt Nam và Mỹ là 1 ppm) (Schering Plough Animal Health Comporation, 2005), sử dụng thuốc từ 7-10 ngày sẽ cho hiệu quả tốt, cá sẽ hồi phục nhanh khi người nuôi thực hiện tốt khâu vệ sinh diệt mầm bệnh trong khu vực nuôi và trong môi trường nước (Trích bởi Lê Thị Cẩm Tú, 2009).

2.3.2 Những nghiên cứu về kháng sinh florfenicol trong điều trị bệnh trên động vật thủy sản.

Ở Thụy Điển, florfenicol là sự lựa chọn đầu tiên trong việc phòng trị bệnh cho cá bột rainbow trout do vi khuẩn Flavobacterium psychrophilum, cách sử dụng là trộn vào thức ăn (Michel et al, 2003). Theo Fukui et al (1987) (được trích bởi Michel et al, 2003) thì florfenicol được xác định là điều trị rất hiệu quả trên động vật thủy sản ở Nhật Bản, ở Ireland, florfenicol cũng được khuyến cáo sử dụng để điều trị bệnh lở loét trên cá da trơn (ESC), bệnh trên cá hồi nước ngọt gây ra bởi nhóm Flavobacterium psychrophilum và Aeromonas salmonicidae. Ngoài ra, kháng sinh Aquaflor (50% florfenicol) được khuyến cáo sử dụng với liều lượng 20 mg/kg thể trọng /ngày (tương đương 10mg/florfenicol/kg thể trọng/ngày), dùng trong 10 ngày liên tiếp cho cá da trơn (Kenilworth, 2004). Intervet Schering Plough animal health (2004) cũng khuyến cáo sử dụng florfenicol với liều 10mg/florfenicol/kg thể trọng/ngày cá hồi do vi khuẩn Aeormonas salmonicida (Trích dẫn bởi Lê Thị Cẩm Tú, 2009). Tương tự, Bowker (2002) cũng điều trị hiệu quả bệnh trên cá hồi do vi khuẩn Oncorhynchus clarki lewisi và Flavobacterium psychrophilum bằng cách trộn florfenicol vào thức ăn với liều 10 mg/kg cá /ngày, cho ăn liên tục trong 10 ngày (Trích dẫn bởi Lê Thị Cẩm Tú, 2009). Cũng liệu lượng 10 mg/kg cá /ngày, cho ăn liên tục trong 10 ngày theo Gaunt et al (2004); Gaunt và et al (2006) xác định là có hiệu quả để khống chế vi khuẩn E. ictaluri gây bệnh ESC phổ biến trên cá nheo.

Tính nhạy của thuốc kháng sinh florfenicol cũng ̃ ược xc ịnh trn một số mầm bệnh vi khuẩn trn c qua một số nghin cứu như Crumlish (2002) thì vi khuẩn E. ictaluri phn lập trn c tra bệnh gan thận mủ ở ĐBSCL nhạy hon ton với thuốc kháng sinh florfenicol (Crumlish, 2002 trích dẫn bởi Nguyễn Hữu Thịnh v ctv 2007). Tương tự như kết quả trn, nghin cứu của Từ Thanh Dung v ctv (2008) bằng phương php xc ịnh nồng ộ ức chế tối thiểu (MIC ≤0.25 µg/ml) thì tc giả cho rằng thuốc flofenicol còn nhạy hon ton với vi khuẩn E. ictaluri phn lập từ c tra nuôi ở ĐBSCL thu từ những năm 2002-2005. Tuy nhin, với kết quả nghin cứu của Chu Hồng Thy (2008) thì có ến 62,5% vi khuẩn E. ictaluri phn lập từ c tra ở tỉnh Tr Vinh ̃ kháng với florfenicol (MIC_{50} = 2 µg/ml v MIC_{90} = 4 µg/ml).

D những nghin cứu gần ̂ y cho thấy tính nhạy của thuốc kháng sinh florfenicol bị giảm so với trước kia, nhưng theo số liệu iều tra của Nguyễn Tấn Duy Phong (2008) thì vẫn còn 50% số hộ nuôi c tra ở ĐBSCL có sử dụng florfenicol trong iều trị bệnh c. Chính vì thế, ể trnh hiện tượng lờn thuốc của vi khuẩn E. ictauri ối với florfenicol xảy ra thì cần phải tìm ra liều lượng sử dụng thuốc florfenicol thích hợp nhất ể ứng dụng vo thực tế trị bệnh cho c tra bệnh gan thận mủ.

CHƯƠNG 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ tháng 03/2010 đến tháng 06/2010

Địa điểm thực hiện: Chi cục Thủy sản Thành phố Cần Thơ

3.2 Vật liệu nghiên cứu

3.2.1 Đối tượng thí nghiệm

Các chủng vi khuẩn E.ictaluri phân lập từ cá tra (Pangasianodon hypophthalmus) bệnh được nuôi trên địa bàn 2 tỉnh: Đồng Tháp, An Giang.

3.2.2 Dụng cụ thí nghiệm

Dụng cụ tiểu phẫu, khay mổ, kéo, dao, que cấy, vòn cồn, giấy, bát lông, pipet (100 µl, 1000 µl, 5 ml) chai nấu môi trường (250 ml và 500 ml), đĩa petri, ống nghiệm, găng tay, ống tiêm, lame, lamella, kính hiển vi...

Giấy nhôm, đầu lọc, giấy lọc, dụng cụ bấm giấy lọc, tăm bông tiệt trùng, bình xịt cồn.

Các dụng cụ khác: Nồi thanh trùng bằng áp suất (autoclave), tủ cấy, tủ ấm, tủ thanh trùng khô, tủ lạnh, cân điện tử (4 số lẻ, Nhật).

3.2.3 Hóa chất thí nghiệm

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn: Môi trường Trypic Soy Agar (TSA), Nutrient Broth (NB), Môi trường Mueller Hinton Agar (MHA) (Hãng MERK).

Hóa chất nhuộm màu, Gram: Dung dịch Crytal violet, dung dịch Iodine, dung dịch alcohol/acetone, dung dịch safanin. (Xem phụ lục A.3)

Đĩa kháng sinh florfenicol thương mại (30 µg) (Hãng OXOID), và đĩa giấy tự tạo ở các nồng độ 50 µg, 70 µg, 90 µg, 110 µg, 130 µg, 150 µg.(phụ lục A.4).

Florfenicol 83,28% dạng bột, bộ kit API 20E (Pháp).

Các loại hóa chất: Cồn tuyệt đối, nước muối sinh lý, cồn 70 ^{0}C...

3.3 Phương pháp nghiên cứu

3.3.1 Phương pháp thu mẫu bảo quản và vận chuyển

Phương pháp thu mẫu bệnh phẩm cá

Mẫu cá được lấy khi cá còn sống hoặc mới chết không quá 10 phút.

Trong ao cá bệnh chọn số từ 3-5 (cá thịt), 5-7 (cá giống) có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng 1-2 con cá khỏe.

Phương pháp bảo quản và vận chuyển mẫu.

Cá sống, cho nước vào không quá 1/3 túi nylon sau đó thả cá vào túi, bơm oxy và buộc kín. Thời tiết nóng phải chuẩn bị một túi đá nhỏ đặt gần bọc cá. Trường hợp cá chết (không quá 10 phút), cho cá vào mỗi túi nylon không chứa nước một mẫu cá, buộc chặt và bảo quản lạnh.

Trong khi vận chuyển đặt mẫu trong phích lạnh. Mẫu được chuyển vào phòng thí nghiệm, tiến hành phân tích trong vòng 24 giờ.

3.3.2 Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn

Phương pháp phân lập vi khuẩn dựa theo tài liệu Viện Nghiên Cứu Sức Khỏe Động vật Thủy Sản Thái Lan (AAHRI) (1993):

- Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường TSA (lấy mẫu bệnh phẩm trực tiếp từ gan, thận, tỳ tạng).

- Ủ mẫu trong tủ ấm từ 48 giờ. Lặp lại thao tác này đến khi đạt đĩa cấy thuần.

- Quan sát hình dạng màu sắc khuẩn lạc (Phụ lục A.3).

- Nhuộm Gram, phản ứng Oxydase, phản ứng O/F và tính di động (Phụ lục A.3).

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E (Biomerieus® SA 69280 marcy I'Etoile-France).

- Cho một ít nước cất hoặc nước máy vào trong khay nhựa của bộ kit để giữ ẩm trong quá trình ủ trong tủ ấm. Đặt kit API vào khay nhựa.

- Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn: dùng que cấy tiệt trùng lấy một ít khuẩn lạc cho vào 5 ml nước muối sinh lý.

- Dùng dung dịch vi khuẩn cho vào đầy các ô CIT, VP và GEL.

- Tương tự cho vi khuẩn vào đầy phần tuýp các ô ADH, LCD, ODC, H_2S và URE, kế tiếp cho dầu paraffin vào đầy phần lõm các ô này. Tiếp theo dùng dung dịch vi khuẩn cho vào đầy phần tuýp các ô còn lại.

- Đậy nắp khay và ủ trong tủ ấm ở 26-28 ^{0}C.

- Đọc kết quả sau 48 giờ.

- Đọc kết quả:

  - Kiểm tra và ghi nhận các chỉ tiêu không cần thêm thuốc thử.

- Các chỉ tiêu cần thêm thuốc thử:
- Cho một giọt thuốc thử TDA vào ô TDA, đọc kết quả sau vài giây.
- Cho một giọt thuốc thử IND vào ô IND, đọc kết quả sau vài giây. Cho một giọt thuốc thử VP1 sau đó cho tiếp giọt thuốc thử VP2 vào ô VP, đọc kết quả sau 10-15 phút.
- Trước khi đọc kết quả, bộ kit API 20E phải đạt tối thiểu 3 chỉ tiêu cho kết quả dương tính. Ngược lại cần ủ mẫu thêm vài giờ.
- Sau khi cho thuốc thử vào thì đậy nắp khay nhựa lại.
- Khi đã cho thuốc thử vào các chỉ tiêu rồi thì không nên ủ lại trong tủ ấm.
- Kiểm tra kết quả test API 20E (Bảng A.2 và phụ lục A.3).

3.3.3 Phương pháp kiểm tra kháng sinh đồ

Phương pháp kháng sinh đồ dựa theo phương pháp của Viện Nghiên Cứu Sức Khỏe Động Vật Thủy Sản Thái Lan (AAHRI) (1993).

Các bước thực hiện:

Dùng que cấy tiệt trùng lấy vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 5 ml nước muối sinh lý tiệt trùng lắc đều.

So màu quang phổ ở bước sóng 590 nm và điều chỉnh mật độ vi khuẩn bằng môi trường NB cho đạt OD = 0.1±0.02 (khoảng 10^8 cfu/ml).

Dùng tăm bông tiệt trùng nhúng vào trong ống nghiệm chứa vi khuẩn và quét lên đĩa agar để khoảng 1 phút.

Dàn các đĩa kháng sinh vào đĩa agar sao cho khoảng cách 2 đĩa kháng sinh là 24 mm, khoảng cách giữa đĩa kháng sinh và mép đĩa petri là 10-15 mm. Lật đĩa lại và ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 28-30 ^{0}C.

Đọc kết quả:

Sau 48 giờ xuất hiện các vòng tròn không có vi khuẩn phát triển (vòng vô trùng) ở mỗi đĩa kháng sinh đo đường kính của vòng vô trùng xác định tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh.

3.3.4 Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Phương pháp xác định MIC bằng phương pháp Broth (Geert Huys, 2002) có chỉnh sửa.

Ngày thứ nhất và thứ hai

Chuẩn bị: Đĩa TSA, Ống nghiệm 10 ml NB Chai 50 ml NB; Nước muối sinh 0.85%. Nuôi vi khuẩn trên môi trường TSA, 48 giờ ở nhiệt độ 28 ^{0}C bao gồm vi khuẩn cần xác định MIC.

Kiểm tra sự thuần chủng của vi khuẩn bằng cách quan sát sự đồng nhất về hình dạng, kích thước, màu sắc của khuẩn lạc và nhuộm Gram.

Chọn 5 khuẩn lạc riêng lẻ trên đĩa TSA cho vào ống nghiệm chứa 10 ml NB, ủ ở 28^0C, 48 giờ.

Ngày thứ ba

Pha thuốc: Pha hai ống nghiệm thuốc gốc, mỗi ống 50 ml (là thuốc kháng sinh hay thuốc cần khảo nghiệm) (ống thứ nhất có hàm lượng thuốc là 1024 ppm và ống thứ hai có hàm lượng thuốc là 256 ppm). Thuốc phải được pha bằng Ethanol.

Pha loãng thuốc với độ pha loãng hai lần từ 2-1024 ppm trong ống nghiệm 50 ml. Hàm lượng thuốc 512 và 256 ppm được pha từ ống thuốc gốc thứ nhất (1024 ppm) bằng cách thêm nước muối sinh lý. Hàm lượng thuốc 128, 64, 32, 16, 8, 4 và 2 ppm được pha từ ống gốc thứ 2 (256 ppm) (Phụ lục A.4 Bảng A.3).

Lắc đều dung dịch thuốc trước khi pha loãng ở nồng độ tiếp theo. Điều cần chú ý là ở mỗi độ pha loãng, hàm lượng thuốc sẽ giảm đi phân nữa sau khi cho dung dịch vi khuẩn vào.

Đo mật độ vi khuẩn

Đo mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 590 nm và điều chỉnh mật độ vi khuẩn bằng môi trường NB cho đạt OD = 0.1 ± 0.02 (Khoảng 10^8 cfu/ml).

Lưu ý: đối chứng sử dụng khi so màu là môi trường NB, không dùng nước cất và không nên cho khuẩn vào thuốc lâu hơn 1 giờ sau khi đo mật độ.

Cho 2ml vi khuẩn, đã điều chỉnh mật độ vào mỗi ống nghiệm có hàm lượng thuốc từ 2-1024 ppm (Bảng A.2 và phụ lục A.4). Lắc đều dung dịch vi khuẩn trước khi cho vào các ống nghiệm có thuốc.

Mỗi lần xác định MIC cần phải có: Đối chứng âm (2 ml NB + 2 ml nước cất); đối chứng dương (2 ml vi khuẩn + 2 ml nước cất).

Tất cả các ống nghiệm được ủ ở 28°C trong 48 giờ.

Mỗi chủng vi khuẩn sau khi điều chỉnh mật độ được cấy lên môi trường TSA để kiểm tra sự thuần chủng và được ủ trong cùng điều kiện với các ống MIC.

Ngày thứ 4: Đọc kết quả

Kiểm tra sự thuần chủng của chủng vi khuẩn xét nghiệm trên đĩa TSA. Nếu phát hiện thấy có sự tạp nhiễm thì không đọc kết quả MIC.

Sự phát triển của vi khuẩn được xác định bằng cách so sánh độ đục của mỗi ống MIC với ống đối chứng âm và dương.

Giá trị MIC được xác định là hàm lượng thuốc trong ống nghiệm đầu tiên không có vi khuẩn phát triển. Trường hợp vi khuẩn phát triển ở tất cả các nồng độ thì giá trị MIC được xác định ở ống nghiệm có hàm lượng thuốc mà sự phát triển của vi khuẩn giảm khoảng 80% so với ống trước đó.

CHƯƠNG 4
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả thu mẫu cá tra

Dấu hiệu bên ngoài

Cá tra khỏe có màu sắc tươi sáng, da trơn láng, cơ thể cân đối thường có màu xanh đen trên lưng và phần đầu, ở phần bụng có màu trắng sữa, các tia vây có màu hồng không sơ xác. Các cơ quan nguyên ven không có vết loét, hậu môn, mang cá có màu đỏ tươi, cá bơi lội linh hoạt, phản ứng linh hoạt. Kết quả này phù hợp với nhận định của Dương Nhựt Long (2003).

Qua kết kiểm tra ban đầu cho thấy cá bệnh gan thận mủ có dấu hiệu bên ngoài không rõ ràng, một số trường hợp da cá bị tái lại, cá bơi lội chậm chập, cá kém ăn hoặc bỏ ăn, thường xung quanh miệng, mắt, thường xuất huyết (Bảng 4.1). Quan sát này phù hợp với mô tả cá tra bệnh gan thận mủ của Đỗ Thị Hòa và *ctv* (2004). Ngoài ra theo Nguyễn Hữu Thịnh và *ctv* (2007) cá bệnh gan thận mủ còn có một số biểu hiện như: mắt lồi, đục một hay cả hai bên mắt.

Bảng 4.1: Dấu hiệu bệnh lý và đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*

KH Vi khuẩn	Dấu hiệu bệnh lý	Mô tả khuẩn lạc
E10058	Phù đầu xuất huyết, gan thận, tỳ tạng nhiều đốm trắng	Tròn nhỏ, trắng đục
E10059	Xuất huyết vi, nhiều đốm trắng ở gan, thận, tỳ tạng, thận nhũn	Tròn nhỏ, trắng đục
E10063	Xuất hiện nhiều đốm trắng ở gan, thận, tỳ tạng.	Tròn nhỏ, trắng đục
E10064	Xuất huyết quanh mắt, thận, tỳ tạng nhiều đốm trắng	Tròn nhỏ, trắng đục
E10066	Phù đầu, phù mắt xuất huyết, gan, thận nhiều đốm trắng	Tròn nhỏ, trắng đục
E10068	Thận, gan, tỳ tạng nhiều đốm trắng	Tròn nhỏ, trắng đục
E10073	Gan, thận, tỳ tạng nhiều đốm trắng	Tròn nhỏ, trắng đục
E10074	Bên ngoài nhợt nhạt, gan thận nhiều đốm trắng.	Tròn nhỏ, trắng đục
E10075	Gan, thận, tỳ tạng sưng to có nhiều đốm trắng	Tròn nhỏ, trắng đục
E10077	Gan, tỳ tạng, thận nhũn có nhiều đốm trắng	Tròn nhỏ, trắng đục

Dấu hiệu bên trong

Cá khỏe thường cơ có màu trắng hồng, bên trong xoang bụng không có chất dịch. Màu sắc trên từng cơ quan đồng nhất và có cấu trúc rắn chắc, không có biểu hiện sưng hay nhũn ở các cơ quan: gan, thận, tỳ tạng, dạ dày, ruột không bị trương to và thường chứa nhiều thức ăn. Kết quả này phù hợp với mô tả của Dương Nhựt Long (2003).

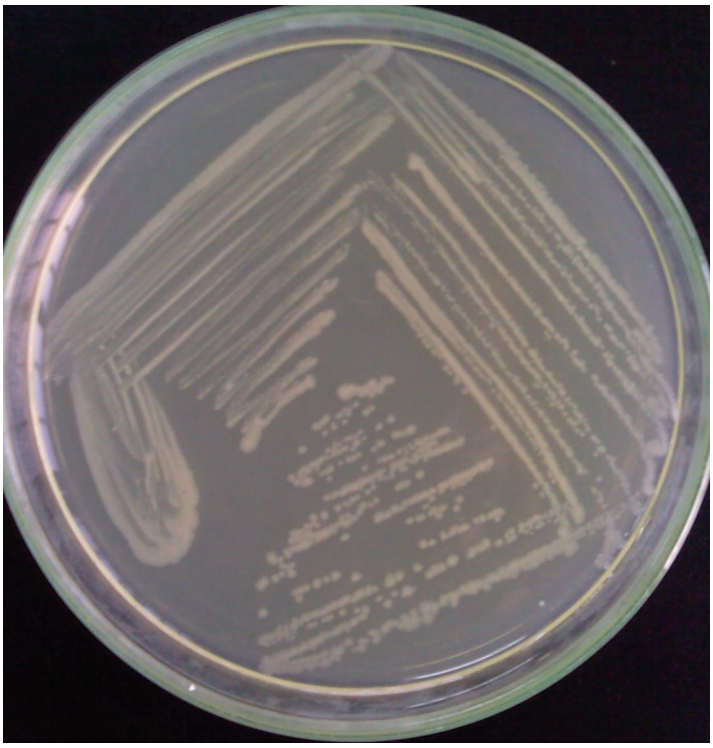
Đối với cá tra bệnh gan thận mủ trong ruột không có thức ăn. Gan, thận, tỳ tạng bị sưng to và có hiện tượng nhũn. Đồng thời cơ quan ở gan, thận, tỳ tạng còn xuất hiện nhiều đốm trắng tròn (Hình 4.1). Kết quả này cũng giống với nghiên cứu mô học của Nguyễn Quốc Thịnh và *ctv* (2004).

Hình 4.1: Cá bị bệnh gan thận mủ với nhiều đốm trắng ở gan, thận, tỳ tạng

4.2 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn từ mẫu cá bệnh

4.2.1 Kết quả phân lập vi khuẩn và kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản

Sau khi mẫu cá thu về được phân lập trong điều kiện tiệt trùng lấy mẫu bệnh phẩm trực tiếp từ các bộ phận gan, thận, tỳ tạng được cấy trên môi trường TSA (Tryptic soy agar) và sau 48 giờ kiểm tra sự phát triển của khuẩn lạc như hình dạng, màu sắc, kết quả dựa trên mô tả của Hawker và *et al* (1981).



Hình 4.2: Khuẩn *Edwardsiella ictaluri* Phát triển trên môi trường TSA sau 48h, khuẩn lạc có màu trắng đục.

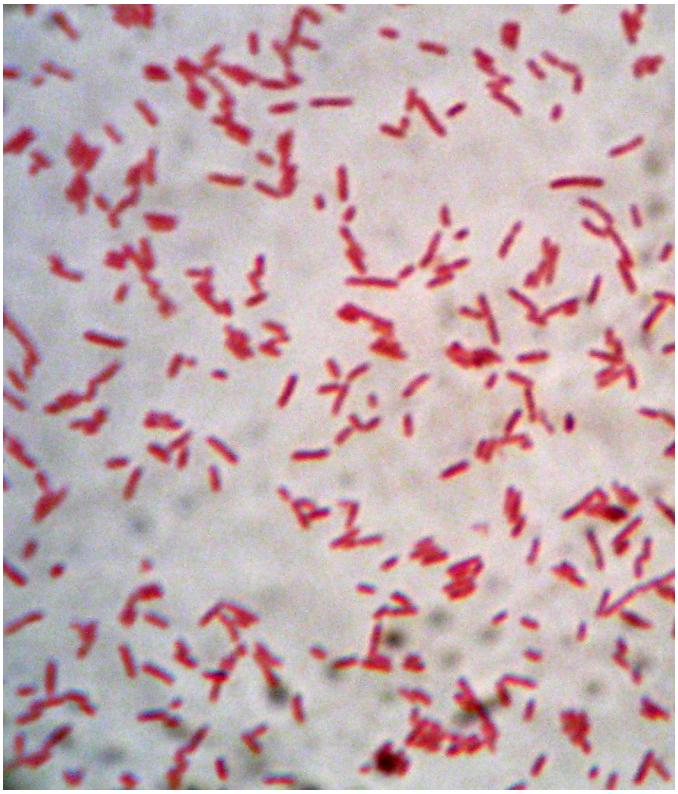
Vi khuẩn được tách ròng đến khi nào đạt vi khuẩn thuần sau đó kiểm tra các đặc điểm hình thái, sinh hóa của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri.* Qua kết qủa kiểm tra cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập đều tạo khuẩn lạc tròn, có màu trắng đục kích thước nhỏ hoặc li ti trên môi trường TSA và MHA sau 48 giờ ở nhiệt độ 28-30 ^{0}C (Hình 4.2). Kết qủa này giống mô tả của Hawker *et al* (1981). Khi phân lập trên cá Nheo Mỹ, đồng thời cũng giống mô tả của Plumb (1993) và Từ Thanh Dung và *ctv* (2004) khi phân lập vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá tra ở ĐBSCL.

Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản cho thấy các chủng vi khuẩn này thuộc Gram âm, hình que, di động yếu và phản ứng oxydase âm tính, O/F dương tính (Bảng 4.2 và phụ lục B.3).

Bảng 4.2: Kết quả kiểm tra các đặc điểm hình thái, sinh hóa của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*

STT	**Chỉ tiêu**	**Kết quả**
1	Gram	Âm
2	Hình dạng	Que ngắn
3	Di động	Yếu
4	Oxydase	Âm tính
5	O/F	dương tính

Theo Plumb (1993) thì vi khuẩn E. ictaluri cũng có dạng hình que thẳng nhỏ kích thước từ 1 µm x 2-3 µm. Di động yếu ở 25-30 ^{0}C, không di động ở nhiệt độ cao, lên men glucose, không oxy hóa, phản ứng catalase dương tính, âm tính trong phản ứng ở oxidase, phát triển tốt ở 28 ^{0}C và phát triển yếu ở 37 ^{0}C. Như vậy kết quả phân lập 10 chủng vi khuẩn trên cá tra bị bệnh gan thận mủ ở Đồng Tháp và An Giang, cũng như kết quả kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được có một số đặc điểm giống như mô tả của các tác giả trước (Từ Thanh Dung và ctv, 2004; Plumb, 1993).



Hình 4.3: Hình nhuộm Gram vi khuẩn *E. ictaluri* Gram âm, hình que (100X)

4.2.2 Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa bằng bộ kit API 20E trên vi khuẩn *E. ictaluri*

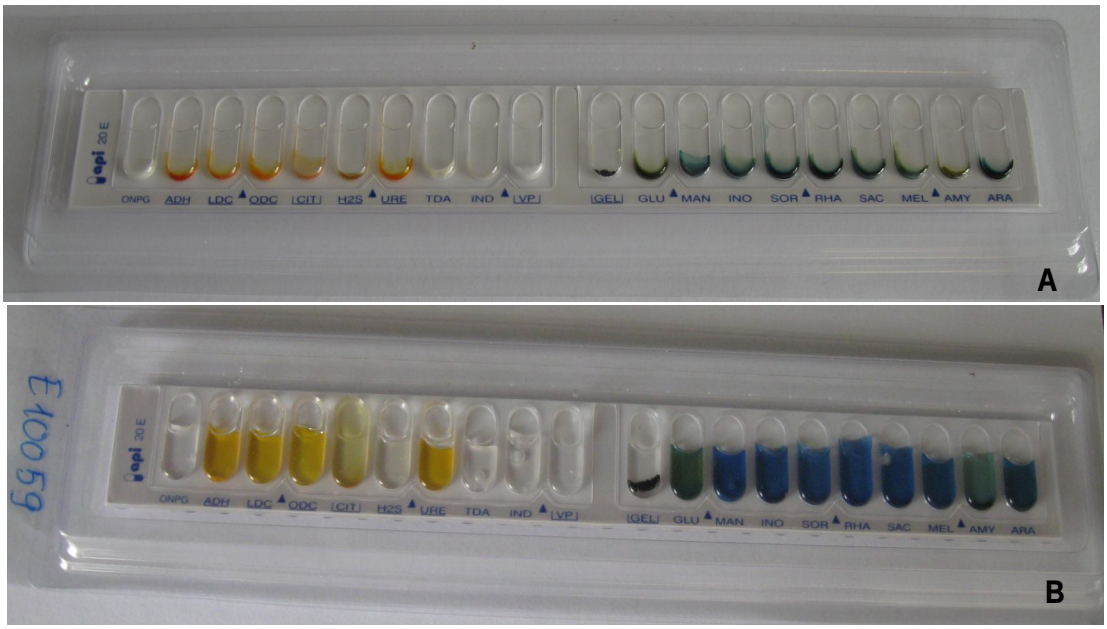
Qua kết quả kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa của 10 chủng *E. ictaluri* cho phản ứng dương tính với các chỉ tiêu LDC, CIT và chỉ tiêu đường GLU còn các đường khác như MAN, INO, SUR, RHA, SAC, MEL, AMY và ARA đều âm tính (Hình 4.4). Ngoài ra vi khuẩn còn cho phản ứng âm tính với ONPG, ADH, ODC, H_2S, URE, TDA, IND, VP, GEL (Bảng 4.3 và phụ lục B.3).

Bảng 4.3 Kết quả test API 20E trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra

Chỉ tiêu	Thành phần	Phản ứng màu	Kết quả
ONPG	Ortho-nitrophenyl galactosidase	Không màu	-
ADH	Arginine	vàng	-
LDC	Lysine	Đỏ cam	+
ODC	Ornithine	Xanh nhạt/vàng	-
CIT	sodium citrate	Vệt đen mãnh	+
H_2S	Sodium Thiosulphate	vàng	-
URE	Urea	vàng	-
TAD	L-Tryptophane	Xanh nhạt/vàng	-
IND	L-Tryptophane	Không màu	-
VP	Sodium Pyruvate	Không có màu đen	-
GEL	Gelatin	Xanh/xanh lá	-
GLU	D-glucose	vàng	+
MAN	D-manitol	Xanh/xanh lá	-
INO	Inositol	Xanh/xanh lá	-
SOR	D-sorbitol	Xanh/xanh lá	-
RHA	L-Rhamnose	Xanh/xanh lá	-
SAC	D-sucrose	Xanh/xanh lá	-
MEL	D-melibiose	Xanh/xanh lá	-
AMY	Amygdalin	Xanh/xanh lá	-
ARA	L-arabinose	Xanh/xanh lá	-

Kết quả này giống với kết quả của Lương Trần Thục Đoan (2006) khi kiểm tra vi khuẩn *E. ictaluri* ở cá tra bệnh gan thận mủ. Nhưng khi so sánh với các kết quả định danh và phân lập vi khuẩn trên cá tra bệnh gan thận mủ ở ĐBSCL bằng bộ kit API 20E của Từ Thanh Dung (2004) thì có sự sai khác theo tác giả chỉ có hai chỉ tiêu cho phản ứng sinh dương tính là GLU, LDC. Những kết quả nghiên cứu của Châu Hồng Thúy (2008) kiểm tra các đặc điểm sinh hóa của 50 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* hầu hết các phản ứng đều âm tính, chỉ có 2 chỉ tiêu cho phản ứng dương tính là GLU và VP. Nguyên nhân của sự sai khác là do các tác giả kiểm tra các đặc điểm sinh hóa cuả vi khuẩn này cách đây đã lâu trong điều kiện hiện tại vi khuẩn có thể thay đổi các đặc điểm sinh lý, sinh hóa và thu mẫu ở các vùng nuôi khác nhau.

Việc phân lập và định danh vi khuẩn rất cần thiết trong lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng, nó giúp xác định tác nhân gây bệnh và có thêm hiểu biết về trường hợp gây bệnh. Bởi vì dấu hiệu bên ngoài chưa hẳn có thể kết luận được nguyên nhân vì chưa chắc nó là tác nhân. Vì vậy, mầm bệnh chỉ được công nhân khi phân lập và định danh từ cá bệnh ngoài tự nhiên.



Hình 4.4: Bộ kit API 20E (A) và kết quả test các chỉ tiêu sinh hóa của vi khuẩn *E. ictaluri* sau 24 giờ (B)

4.3 Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ trên các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*

Vi khuẩn đầu tiên được tách ròng và nuôi cấy để được vi khuẩn thuần, và được tiến hành định danh vi khuẩn. Sau đó nuôi vi khuẩn trong môi trường NB để đạt được mật độ vi khuẩn khoảng 10^8 cfu/ml bằng máy so màu quang phổ. Tiến hành kiểm tra kháng sinh đồ ở 7 nồng độ gồm: đĩa kháng sinh thương mại (30 µg) và đĩa kháng sinh tự tạo ở 6 nồng độ khác nhau 50 µg, 70 µg, 90 µg, 110 µg, 130 µg, 150 µg của thuốc kháng sinh florfenicol lên vi khuẩn E. ictaluri. Kết quả đường kính trung bình vòng vô khuẩn được trình bày trong Bảng 4.3. Đồng thời để xác định nồng độ kháng sinh nào là nhạy, trung bình nhạy hay kháng thì phải dựa vào chuẩn đường kính vô khuẩn của kháng sinh theo nhà sản xuất: Đường kính vô khuẩn ≥ 19mm (nhạy), đường kính vô khuẩn 14-18 mm (trung bình), kháng ≤ 14mm.

Bảng 4.4 Đường kính vô trng (mm) của cc chủng vi khuẩn

STT	Vi khuẩn	Cc nồng độ thuốc khng sinh florfenicol						
		30 µg	50 µg	70 µg	90 µg	110 µg	130 µg	150 µg
1	E10058	30	//	//	//	//	//	//
2	E10059	20	//	//	//	//	//	//
3	E10063	0	10	14	16	19	22	25
4	E10064	10	13	16	19	22	23	25
5	E10066	28	//	//	//	//	//	//
6	E10068	10	14	17	20	23	25	27
7	E10073	8	10	13	15	19	21	24
8	E10074	12	15	18	20	23	26	29
9	E10075	0	0	0	0	10	15	17
10	E10077	10	13	15	20	25	30	35

Ghi ch: Kí hiệu "//" ở cc ô trn l do ở những nồng độ ny vi khuẩn nhạy hon ton tạo đường kính vô trng to nn không xc định được đường kính.

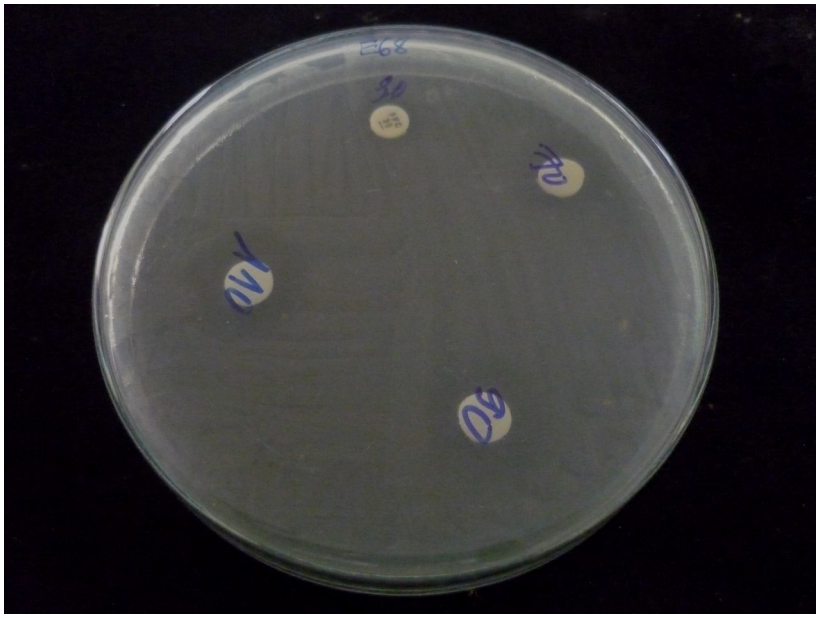
Qua Bảng 4.4 cho thấy ường kính vô trng của thuốc khng sinh florfenicol ln vi khuẩn E. ictaluri ở cc nồng ộ dao ộng từ 0-35 mm. Kết quả trn cũng cho thấy a số cc chủng ˜ khng với thuốc ngoại trừ 3 chủng E10058, E10059 v E10066 ở An Giang còn nhạy ở nồng ộ 30 µg (ĩa khng sinh thương mại). Đồng thời tiến hnh kiểm tra khng sinh ồ cc chủng khng ny ở nồng ộ cao hơn, ở nồng ộ 50 µg v 70 µg không tạo ược vòng vô trng. Nhưng ở nồng ộ 90 µg lc ny thuốc ˜ có hiệu quả diệt ược một số chủng vi khuẩn E10064, E10068, E10074, E10077 tạo ường kính vô trng (15-20 mm). Kết qủa ny cho thấy cc chủng vi khuẩn Edwardsiella ictaluri ˜ khng ở nồng ộ rất cao.

Trong khi những nghin cứu lm khng sinh ồ của cc chủng vi khuẩn phn lập ở ĐBSCL những năm trước thì kết quả thu ược có sự thay ổi rất lớn theo Crumlish et al (2002) ghi nhận cc chủng vi khuẩn E. ictaluri nhạy hon ton với thuốc florfenicol trong thời gian ny florfenicol iều trị bệnh gan thận mủ rất hiệu quả. Đến năm 2006 Crumlish et al ˜ tìm ược 57,1% số chủng ˜ khng với florfenicol v ến năm 2007 Nguyễn Hữu Thịnh v ctv ˜ kiểm tra khng sinh ồ thì vi khuẩn E. ictaluri ˜ khng florfenicol với tỉ lệ 45% ở Vĩnh Long v 30% ở An Giang.

Theo kết quả của Hồ Thị Kiều Nga (2009) khi kiểm tra khng sinh ồ của thuốc khng sinh florfenicol ln 10 chủng vi khuẩn có ường kính vô trng dao ộng từ (9-49 mm) trong 10 chủng trn ˜ có 5 chủng khng với florfenicol. Từ những kết quả trn cho thấy kết quả thu ược hon ton hợp lý. Đến nay theo kết quả kiểm tra cho thấy việc iều trị bằng thuốc khng

florfenicol ngy cng giảm hiệu quả do thời gian sử dụng thuốc khng sinh di hơn ˜ tạo nn dòng vi khuẩn khng thuốc ngy cng cao.

Như vậy, từ kết quả thu ược thì ở nồng ộ 30 µg có 3 mẫu trong 10 mẫu thí nghiệm có ường kính vô trng >20 mm, iều ny chứng tỏ florfenicol vẫn còn hiệu quả, nhưng tỉ lệ 30% l thấp. Vì thế, khi dng florfenicol ể iều trị ở nồng ộ thấp l không an ton ối với những vng nuôi ˜ có hiện tượng khng thuốc chính vì lý do ny, cần phải thận trọng trước khi dng thuốc trị bệnh cho c. Đối với những vng khc nhau việc sử dụng thuốc cũng khc. Vì vậy, tỉ lệ chủng vi khuẩn thể hiện tính nhạy ối với thuốc giữa hai tỉnh Đồng Thp v An Giang cũng khc nhau iều ny ược giải thích như sau: do cc chủng vi khuẩn phn lập ở cc vng khc, có thể những nơi khng thuốc do người nuôi c ở ˆy ˜ nuôi nhiều năm thời gian sử dụng khng sinh ở những nơi ĩ kh di gy ra hiện tượng khng thuốc v hình thnh cc chủng vi khuẩn khng khc nhau giữa cc vng.



Hình 4.5: Kết quả khng sinh ồ của florfenicol ở nồng ộ 30 µg, 70 µg, 90 µg v 110 µg ln chủng vi khuẩn E10068.

Vì vậy, ể xc ịnh ² ng thuốc iều trị bệnh l rất cần thiết. Mỗi vng nuôi khc nhau thì hiệu quả sử dụng khng sinh khc nhau dẫn ến sự sai khc về ộ nhạy cảm của thuốc khng trong kết quả thu ược. Do ĩ, trong nghin cứu trị bệnh ộng vật thủy sản thì việc kiểm tra khng sinh ồ ể tìm ra loại thuốc trị có ộ nhạy cảm cao l rất cần thiết, ngoi ra còn gip cho người dn ít tốn chi phí cho việc iều trị không ² ng thuốc dẫn ến dư lượng khng sinh trong nuôi trồng thủy sản v ảnh hưởng tới sản phẩm thủy sản.

4.4 Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của khng sinh ln vi khuẩn E. ictaluri

Xc ịnh nồng ộ ức chế tối thiểu của thuốc khng sinh ln vi khuẩn l xc ịnh ở tại nồng ộ thuốc khng sinh thấp nhất m tại nồng ộ ĩ vi khuẩn bị ức chế hon tòan hoặc hơn 80% bị tiu diệt. Việc sử dụng thuốc v hóa chất trị bệnh cho ộng vật thủy sản nói chung v ặc biệt l thuốc khng sinh nói rng sẽ ạt hiệu quả cao nếu sớm pht hiện giai oạn chớm bệnh của vật nuôi. Xc ịnh nồng ộ MIC của thuốc khng sinh ln vi khuẩn gip cho việc sử dụng ̉ng liều sẽ góp phần nng cao hiệu quả iều trị v giảm khả năng khng thuốc của vi khuẩn.

Gía trị MIC chuẩn của thuốc khng sinh florfenicol theo tiu chuẩn của CLSI (2006) Gi trị MIC nhạy: ≤ 2 µg/ml, gi trị MIC khng: ≥ 8 µg/ml.

Bảng 4.5 : Gi trị MIC của 10 chủng vi khuẩn E. ictaluri

Nồng độ thuốc kháng sinh (ppm)	Số chủng vi khuẩn	% chủng vi khuẩn
1	0	0
2	3	30
4	0	30
8	0	30
16	0	30
32	3	60
64	3	90
128	1	100
256	0	100
1024	0	100

Gi trị MIC của 10 chủng vi khuẩn qua kết quả trn cho thấy nồng ộ ức chế tối thiểu của khng sinh florfenicol ln c chủng vi khuẩn cũng giống như kết quả khng sinh ồ a số ̃ khng với thuốc khng sinh ny. Chỉ còn 3 chủng vi khuẩn E10058, E10059 v E10066 l nhạy ở nồng ộ 2 µg/ml, c chủng còn lại ̃ khng ở nồng ộ cao từ 32 ến 128 µg/ml.

Hình 4.6: Kết qủa giá trị MIC của thuốc florfenicol ln chủng vi khuẩn E10077

Sau khi khng sinh chloramphenicol ã bị cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, 1 dẫn xuất mới của chloramphenicol ã l florfenicol ã thay thế v khng sinh ny nhanh chống ược sử dụng rộng ri trong chăn nuôi v thực phẩm, bao gồm ngnh thủy sản (Dowling 2006; Michel et al, 2003; Wrzsinsk et al, 2005). Theo Fukui et al (1987) (ược trích bởi Michel et al, 2003) thì florfenicol ược xc ịnh l iều trị rất hiệu quả trn ộng vật thủy sản ở Nhật Bản, ở Ireland florfenicol cũng ược khuyến co sử dụng ể iều trị bệnh lở lot trn c da trơn (ESC). Loại khng sinh ny cũng nhanh chóng ứng dụng rộng ri trong iều trị bệnh gan thận mủ trn c tra (Trần Duy Phương, 2009).

Theo Từ Thanh Dung v ctv (2008) xc nh gi tr MIC b ng ph ng php ph ng php pha long thu c khng sinh trong môi tr ng th ch Mueller-Hinton II. K t qu không có chu ng E. ictaluri phn l p t c tra b nh gan th n m khng v i nhóm khng sinh ny v có gi tr MIC r t th p (0,25 g/ml), nh ng n th i i m ny gi tr MIC ln n 128 g/ml. K t qu c nh bo r ng ching ta th n tr ng khi s d ng thu c khng sinh florfenicol trong th y s n.

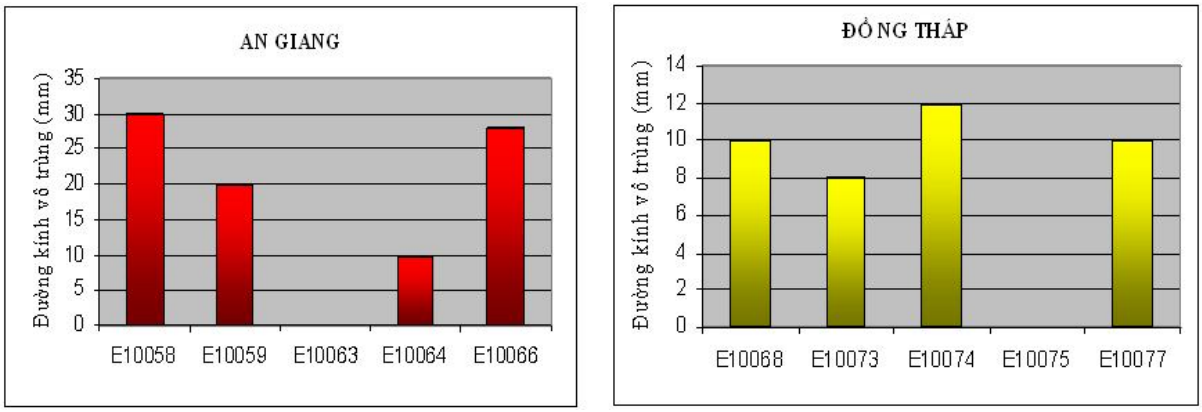
Theo iều tra mới ^y của Đỗ Tiến Hảo (2009) tỉ lệ sử dụng khng sinh florfenicol ở c hộ nuôi c tra l Vĩnh Long (80%), Đồng Thp (80%), An Giang (50%). Sau thời gian pht triển nghề nuôi dịch bệnh thường xuyn xảy ra người nuôi c ã sử dụng nhiều loại khng sinh. Qua

kết quả điều tra trên thì số người nuôi cá tra ở ^y sử dụng florfenicol để trị bệnh cho cá khá cao nên đến nay ˜ dẫn đến hình thành các chủng vi khuẩn kháng với thuốc florfenicol không đến 70%.

Qua kết quả kháng sinh đồ và xác định nồng độ ức chế (MIC) nhận thấy rằng ngày càng hình thành nhiều chủng vi khuẩn Edwardsiella ictaluri kháng thuốc florfenicol càng nhiều. Do mỗi vùng nuôi sử dụng thuốc với liều lượng và thời gian dùng thuốc của mỗi vùng khác nhau. Vì vậy cùng một loài vi khuẩn E. ictaluri nhưng ở địa điểm thu mẫu khác nhau vi khuẩn hình thành vòng kháng khác nhau. Trước tình hình ngày càng giảm tính nhạy cảm của kháng sinh florfenicol với chủng vi khuẩn này phải có cách khắc phục khuyến cáo người nuôi cá sử dụng ² ng thuốc và liều lượng trình sử dụng thuốc theo kinh nghiệm theo bản thân mà không biết rõ tác nhân kháng thuốc hay tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn.

4.5 So sánh tính nhạy của vi khuẩn E. ictaluri ở hai tỉnh An Giang và Đồng Tháp

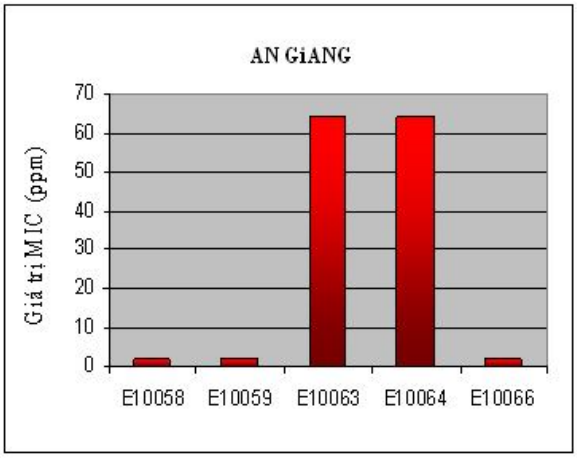
Kết quả so sánh đường kính vô trùng (Hình 4.7) và giá trị MIC (Hình 4.8) của các chủng vi khuẩn E. ictaluri phân lập ở hai tỉnh An Giang và Đồng Tháp được thể hiện lần lượt qua Hình 4.7 và Hình 4.8.

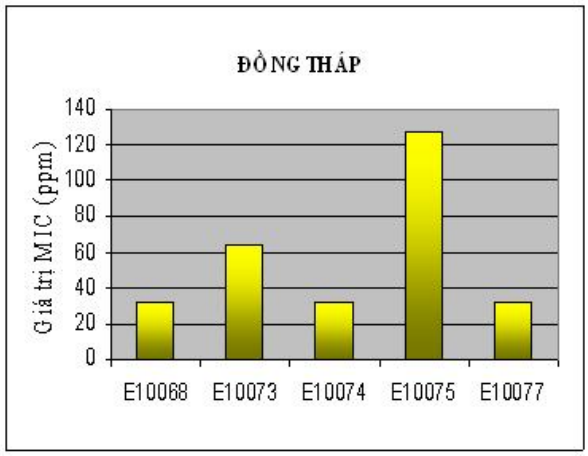


A B

Hình 4.7: Đường kính vô trùng (mm) của vi khuẩn E. ictaluri phân lập ở An Giang (A) và Đồng Tháp (B) với đĩa kháng sinh florfenicol thương mại (30µg)

Với kết quả trên ta thấy các chủng vi khuẩn E. ictaluri ở Đồng tháp ˜ thể hiện tính kháng với florfenicol (30µg) rất rõ, 100% chủng đều kháng với đường kính vô trùng trung bình là 8 mm. Đối với các chủng vi khuẩn E. ictaluri ở An Giang có 3 chủng còn nhạy với florfenicol, và đường kính vô trùng trung bình của 5 chủng là 17,6 mm. Kết quả này hoàn toàn trùng hợp với kết quả MIC các chủng vi khuẩn nhạy có đường kính vô trùng càng thì giá trị MIC càng thấp và ngược lại (Hình 4.8).





A B

Hình 4.8: Giá trị MIC của vi khuẩn E. ictaluri phân lập ở An Giang (A) và Đồng Tháp (B).

Tương tự kết quả kháng sinh đồ trên, thì vi khuẩn E. ictaluri phân lập ở An Giang thể hiện tính kháng với florfenicol thấp hơn các chủng phân lập ở Đồng Tháp. Với 3 chủng ở An Giang E10058, E10059 và E10066 nhạy với florfenicol có cùng giá trị MIC thấp 2 µg/ml và trung bình của 5 chủng là 26,8 µg/ml. Trong khi ở 5 chủng vi khuẩn E. ictaluri kháng với florfenicol ở Đồng Tháp có giá trị MIC trung bình là 57,6 µg/ml. Qua kết quả kháng sinh đồ và MIC trên cho thấy ở An Giang còn 3 chủng nhạy với florfenicol. Tuy nhiên, với giá trị MIC trung bình là 26,8 µg/ml là cao so với tiêu chuẩn của CLSI 2006 (MIC kháng >= 8 µg/ml). Với kết quả này cho thấy các chủng vi khuẩn E. ictaluri ở An Giang đã xuất hiện hiện tượng kháng với thuốc kháng sinh florfenicol. Vì vậy, hết sức thận trọng khi sử dụng thuốc kháng sinh trong việc trị bệnh gan thận mủ.

CHƯƠNG 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 Kết luận

Phân lập và định danh được 10 chủng vi khuẩn Ewardsiella ictaluri trên cá tra có dấu hiệu bệnh gan thận mủ tại 2 tỉnh Đồng Tháp, An Giang.

Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ có 30% số chủng vi khuẩn còn nhạy ở nồng độ 30µg (ãa kháng sinh thương mại).

Khảo sát tính nhạy của các chủng E. ictaluri với các ãa florfenicol tự tạo ở các nồng độ (50 µg, 70 µg, 90 µg, 110 µg, 130 µg, 150 µg) cho thấy có 90% chủng vi khuẩn E. ictaluri nhạy ở nồng độ 110 µg.

Kết quả giá trị MIC là 30% nhạy ở 2 µg/ml, 60% nhạy ở 32 µg/ml và 100% nhạy ở 128 µg/ml

Vì vậy nếu sử dụng florfenicol điều trị ở nồng độ thấp mà chưa kiểm tra kháng sinh đồ là không an toàn.

5.2 Đề xuất

Nghiên cứu mở rộng hơn trong việc điều trị bệnh gan thận mủ từ kết quả giá trị MIC xác định được.

Nghiên cứu sự thay đổi sinh học khi dùng florfenicol ở liều điều trị cao lên cá tra bệnh gan thận mủ.

Đánh giá hiệu quả kinh tế khi dùng florfenicol ở liều lượng cao.

Bố trí thí nghiệm ở quy mô rộng hơn và thời gian dài hơn nhằm so sánh được tính kháng thuốc của vi khuẩn Ewardsiella ictaluri ở các vùng nuôi khác nhau.

TI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

Bo co tổng kết tình hình sử dụng thuốc khng sinh ở Thnh Phố Cần Thơ năm 2009. Phòng thí nghiệm Chi Cục Thủy Sản Thnh Phố Cần Thơ.

Bi Kim Tng, 2001. Thuốc khng sinh. Sở KHCN vi môi trường tỉnh Bi Rịa Vũng Tu, 225 trang.

Bi Thị Tho, 2003. Thuốc khng sinh vi nguyn tắc sử dụng trong chăn nuôi. NXB Hi Nội, 323 trang.

Chu Hồng Thy, 2008. Khảo st tình hình xuất hiện bệnh gan thận mủ do vi khuẩn Edwardsilla ictaluri gy bệnh trn ci tra nuôi thm canh ở tỉnh Tri Vinh, Luận văn cao học - Khoa Thủy Sản - trường Đại học Cần Thơ.

Dương Nhựt Long, 2003. Kỹ thuật nuôi ci nước ngọt. Khoa Thủy sản trường ĐHCT. Das. P. C, S. Ayyappan, J.K, Jena, B. K Das. 2004. Nitrite toxicity in Cirrhius mrigala (Hamilton): acute toxicity and sublethal effect to selected hematological parameter. Aquaculture 235, page 633 – 644.

Đỗ Hải Linh, 2009. Pht triển nuôi trồng thuỷ sản bền vững cc tỉnh phía Nam. http://www.thiennhien.net/news/160/ARTICLE/10278/2009-12-31.html , 29/12/2009

Đỗ Thị Hòa, Bi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội, 2004. Bệnh học thủy sản. Nhi xuất bản nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh, 413 trang.

Đỗ Tiến Hảo, 2009. Tình hình xuất hiện bệnh gan thận mủ trn ci tra (Pangasianodon hypophthalmus) nuôi thm canh ở một số tỉnh Đồng Bằng Sông Cửu Long. Luận văn ại học, Khoa Thủy Sản, Đại Học Cần Thơ.

Hồ Thị Kiều Nga, 2009. Nghin cứu kiều plasmaid vi tính khng thuốc khng sinh của vi khuẩn Edwardsilla ictaluri gy bệnh mủ gan trn ci tra (Pangasianodon hypophthalmus(Pangasianodon hypophthalmus). Luận văn ại học, Khoa Thủy Sản, Đại Học Cần Thơ.

Li Thị Cẩm Ti, 2009. Khảo st ảnh hưởng của flofernicol ln một số chỉ tiu huyết học của ci tra (Pangasianodon hypophthalmus) giống nuôi trn bi. Luận văn ại học, Khoa Thủy Sản, Đại Học Cần Thơ.

Lương Trần Thục Đoan, 2006. khảo st sự xm nhập của vi khuẩn gy bệnh mủ gan (Edwardsiella ictaluri) trn cc cơ quan khc nhau của ci tra (Pangasius hypophthalmus). Luận văn ại học, Khoa Thủy Sản, Đại Học Cần Thơ.

Nguyễn Chính, 2005. Đnh gi tình hình sử dụng thuốc thi y trong nuôi ci tra (Pangasius hypthalmus Sauvage, 1878) thm canh ở An Giang vi Cần Thơ. Luận văn cao học, khoa thủy sản, trường Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Hữu Thịnh, Trương Thanh Loan, 2007. Phân lập và khảo sát đặc điểm kháng kháng sinh của Edwardsilla ictaluri gây bệnh gan thận mủ trên cá tra, Pagasius hypophthalmus, nuôi thâm canh. Nghiên cứu khoa học kỹ thuật. ĐH Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, 175-179.

Nguyễn Quốc Thịnh, 2006. Điều tra ước lượng ảnh hưởng việc sử dụng thuốc và hóa chất trong quá trình nuôi đến tình hình bệnh trên cá tra (Pangasianodon hypophthalmus) nuôi bè. Báo cáo khoa học, Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Quốc Thịnh, Từ Thanh Dung, Ferguson H.W, 2004. Nghiên cứu mô bệnh học trên cá tra (Pangasius hypophthalmus) bệnh trắng gan. Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ, 120-125.

Nguyễn Tấn Duy Phong, 2008. Điều tra hiện trạng nuôi, bệnh và tình hình sử dụng thuốc hóa chất trong nuôi thâm canh cá tra ao (*Pangasianodon hypophthamu*) Luận văn đại học 2008, Khoa Thủy Sản, Đại Học Cần Thơ.

Nguyễn Văn Cảnh, 2004. Công nghệ lên men các chất kháng sinh. Nhà xuất bản khoa hoc và kỹ thuật Hà Nội.

Nguyễn Văn Thường, 2008. Tổng quan định loại cá tra (Pangasianodon hypophthalmus) phân bố ở vùng hạ lưu sông Mekong. Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ, 81-89.

Trần Anh Dũng, 2005. Khảo sát các tác nhân bệnh trong nuôi cá tra (Pangasius hypophthalmus) thâm canh ở tỉnh An Giang. Luận văn cao học, khoa thủy sản, Đại học Cần Thơ.

Từ Thanh Dung, M. Crumlish, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Quốc Thịnh và Đặng Thị Mai Thy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra (Pangasianodon hypophthalmus). Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ, 137-142

Tiếng Anh

Austin, B & D.A Austin, 1999. Enterobacteriaceae representatives In: Bacterial fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish. 3rd Edition, 81-84, springer praxis publishing chichester.

Clinical and Laboratory Standards Institure (CLSI), 2006b. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolate from aquatic animals; informational supplement, M49-A. Clinical and Laboratory Standards Institure, Wayne, NJ.

Crumlish, Từ Thanh Dung, J. F. Turnbull, Nguyễn Thị Như Ngọc và W Ferguson, 2002. Identification of E. Ictaluri from diseased freshwater catfish, Pangasius Hypophthalmus cultured in the Mekong Delta Viet Nam. Journal of fish disease. 25, 733-736.

Dowling, P.M, 2006. Chloramfenicol, thiamphenicol and flofenicol. In:s. Giguere, J.F.Prescott, D Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling (ed), Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Backwel Publishing Ltd, Oxflord, pp.241-248.

Dung, T.T., Freddy Haesebrouck, Nguyen Anh Tuan, Patrick sorgeloos, Margo Baele, and Annemie Decostere, 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of Edwarsiella ictaluri

isolate from natural outbreaks of bacillary necrosis of Pangasianodon hypophthalmus in Vietnam. Microbial Drug Resistance. December 2008, 14(4) p: 311-316.

Gaunt P.A, Anissa L. Mcginnis, Timothy D. Santucci, Jean Cao, Peter Waeger, Richard G. Endric, 2006. Field efficacy of florfenicol for comtrol of mortality in channel catfish Intaluri punctatus (Rafinesque) infection with Edwardsiella ictaluri Journal of the world aquaculture society, vol. 37. no. 1.

Gaunt P.A, Richard G Endric, Lester Khoo, Rebeca Howard, Anissa L. Mcginnis, Timothy D. Santucci, Terry Katz, 2004. Determination of dose rate of floefenicol in feed for comtrol of mortality in channel catfish Ctaluri punctatus (Rafinesque) infection with Edwardsiella ictaluri, etiologycal agent ofenteric septicamia. Journal of the world aquaculture society, vol. 35, no. 2.

Geert Huys, 2002. Antibiotic susceptibity testing of aquaculture associated bacteria with the borth macrodilution method (MIC determination), Laboratory of Microbiology, M.L. Ledeganckstr. 35 B9000 Gent (BELGIUM).

Hawker, J.P., A.C.Mc Whorter, A.G. Steigerwlt & D.J. Brenner, 1981. Edwardsiella ictaluri sp. Nov., thecausative agent of enteric septicaemia of catfish. International journal of systematic Bacteriology 31, 396-400.

Hawker, J.P, 1979. A bacterium asociated with disease of pond cultured channel catfish. Joural of the Fisheries Research Board of Canada, 36:1508-1512.

Kasornchndra J., W. Rogers & J.A. Plumb, 1987. Edwardsiella ictaluri from walking catfish, clarias batrachus L., in Thailand. Journal of fish disease 1987, 10, 137-138.

Kenilworth, NJ. 2004. Aquaflor R 50% type A M edicate acticate for catfish. Schering plough animal health corp. Page 0023-0092.

Michel, C., B. Kerouault, and C. Martin, 2003. Chlormphenicol and florfenicol susceptibility of fish pathogenic bacteria isolated in France: comparision of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacterua. J. Appl. Microbio. 95: 1008-1015.

Perguson H W,.J F Turnbull,.A Shinn,. K Thomposon,. Từ Thanh Dung and M Crumlish, 2001. Bacillary necrosis in farmed Pangasius hypophthalmus (sauvage) from the Mekong Delta , Viet Nam. Journal of fish Disease. 24:509-513.

Plumb, J.A, and Vinitnatharat, S. 1993. Vaccination of channel catfish, Ictalurus puntatus (Rafinesque), by immersion and oral booster against Edwardsiella ictaluri. Journal of Fish disease. 16: 65-71.

Prescott, J.F., 2000. Antimicrobial drug resistane and its epidemiology. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Lowa State University press/Ame pp 27-48 (796 p)

Rainboth W. J, 1996 Fishes of the Combodian Mekong, Fao, Rome, 1996. 265pp

Shotts, E.B, and Teska, J.D. 1986. Bacterial pathogens of aquatic vertebrates. In Austin, E.B, and Austin, D.A. Methods for the Microbiologycal Examination of Fish and Shellfish. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 164-186.

The Aquatic Animal Health Research Institute department of fisheries Kasetsart University Campus, jatojak, 1993. Bangkok 10900 ThaiLand. Diagnótic Bacteriology, 106p.

Wrzesinsk, C., L. Crouch, P. Gaunt, D. Holifield, N. Bertrand, and R. Endris, 2005. Florfenicol residue depletion in channel catfish. Ictalurus punctatus (Rafinesque). Aquaculture. 253:309-316.

Yuasa K., E.B. kholidin, N. Panigoro and K. Hatai, 2003. First isolation of Edwardsiella ictaluri from cultured triped catfish Pangasius hypophthalmus in Indonesia. Fish Pathology 38 (4): 181-183.