

# PHÁT HIỆN VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI* GÂY BỆNH MỦ GAN TRÊN CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>1</sup> và Nguyễn Trúc Phương<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Edwardsiella ictaluri*, the causative agent of disease showing white spots in the internal organs of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), is responsible for most economic loss in the productivity. One of the most important reasons for ineffective treatment of the disease is due to diagnosis procedure that is slow, inaccurate and costly conventional bacterial culture. To overcome this matter, a polymerase chain reaction (PCR) technique using a primer pair EiFd-1 and EiRs to detect *E. ictaluri* in channel catfish (Panangala et al., 2007) was employed for detection of *E. ictaluri* bacteria in striped catfish (PCR products is 407 bp for *E. ictaluri*). The same PCR result was obtained either using template in form of DNA extracted from bacteria culture overnight in normal broth medium, DNA extracted from bacteria colonies dissolved in physiological saline water (0.85% NaCl). PCR protocol could perform an early and accurate diagnosis the causative agent. In addition, the time to diagnose using PCR is shorter than conventional bio-chemical method (1/4 time). The result of study has good value for the rapid, accurate and less expensive diagnosis of *E. ictaluri* in striped catfish. It can also be a useful basis for prevention and treatment in catfish farming.

**Keywords:** *Edwardsiella ictaluri*, *Pangasianodon hypophthalmus*, PCR, diagnosis

**Title:** Detection of *Edwardsiella ictaluri* causing white spots in the internal organs of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* by using polymerase chain reaction technique

## TÓM TẮT

Bệnh mủ gan do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* đã và đang gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và sản lượng cá tra nuôi ở đồng bằng sông Cửu Long. Một trong những nguyên nhân ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả điều trị là do xác định tác nhân gây bệnh chậm, thiếu chính xác và tốn kém. Để khắc phục tình trạng này, quy trình PCR sử dụng hai đoạn mồi EiFd-1 và EiRs phát hiện *E. ictaluri* trên cá nheo mỹ (theo Panangala et al., 2007) được thực hiện phát triển để chẩn đoán nhanh *E. ictaluri* gây bệnh mủ gan trên cá tra. Quy trình cho kết quả phát hiện sản phẩm PCR là 407 bp khi sử dụng mạch khuôn là DNA ly trích từ dịch treo vi khuẩn nuôi tăng sinh qua đêm trong môi trường nutrient broth hoặc DNA ly trích từ dịch treo vi khuẩn chuẩn bị bằng cách lấy trực tiếp khuẩn lạc cho vào dung dịch 0.85% NaCl. Kết quả cho thấy quy trình có thể được sử dụng để phát hiện sớm và chính xác tác nhân gây bệnh mủ gan ở cá tra. Thời gian chẩn đoán bằng phương pháp PCR được rút ngắn đi rất nhiều (1/4 lần) so với phương pháp sinh hóa. Quy trình có giá trị ứng dụng tốt trong việc xác định nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh ở cá tra nhằm làm cơ sở cho việc đề xuất giải pháp hiệu quả trong phòng và trị bệnh mủ gan ở cá tra.

**Từ khoá:** *Edwardsiella ictaluri*, *Pangasianodon hypophthalmus*, PCR, diagnosis

<sup>1</sup> Bộ môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

## 1 GIỚI THIỆU

Cá tra là đối tượng dễ nuôi, mau lớn, chất lượng thịt ngon, có khả năng thích ứng cao với điều kiện môi trường khắc nghiệt. Trong những năm gần đây phong trào nuôi cá tra được phát triển mạnh đã đóng góp đáng kể vào kim ngạch xuất khẩu ở Việt Nam, tạo công ăn, việc làm, tăng thu nhập, góp phần xóa đói giảm nghèo cho các vùng nông thôn. Tuy nhiên khi diện tích nuôi được mở rộng nhất là nuôi với mật độ cao thì vấn đề dịch bệnh xảy ra thường xuyên hơn và gây thiệt hại cũng nhiều hơn. Trong đó nổi bật là bệnh mủ gan hay còn gọi là bệnh đốm trắng trên gan. Các kết quả nghiên cứu gần đây xác định bệnh mủ gan là do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra, bệnh xảy ra trên cá tra nuôi ở tất cả các giai đoạn, tỉ lệ hao hụt có thể lên đến 90% (Nguyễn Quốc Thịnh và ctv, 2003; Từ Thanh Dung và ctv, 2004). Tuy nhiên, từ trước đến nay việc định danh *E. ictaluri* từ cá tra phần lớn sử dụng phương pháp sinh hóa truyền thống hoặc sử dụng bộ kit API 20E (bioMerieux). Do vi khuẩn này phát triển chậm trên môi trường nuôi cấy tổng hợp (khoảng 48 giờ ở nhiệt độ 28°C) (Ferguson *et al.*, 2002; Từ Thanh Dung và ctv, 2002) nên thời gian phân lập, nuôi cấy và định danh thường kéo dài từ 4-7 ngày. Thời gian chẩn đoán dài như vậy thường là quá trễ không thể đáp ứng nhu cầu đề xuất giải pháp trị bệnh cho các ao cá nuôi đang bị bệnh. Để khắc phục vấn đề này, phương pháp PCR chẩn đoán *E. ictaluri* gây bệnh mủ gan trên cá tra được thực hiện và ứng dụng dựa trên qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri* trên cá nheo mỹ của Panangala *et al.*, (2007). Qui trình có giá trị ứng dụng tốt trong việc xác định nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh mủ gan ở cá tra nhằm làm cơ sở cho việc đề xuất giải pháp phòng và trị bệnh hiệu quả.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ cá tra có dấu hiệu bệnh mủ gan từ nhiều nguồn khác nhau gồm các chủng CAF255, CAF258, 2B1, 3B3, C1 và C2, sau khi phân lập được nuôi trong môi trường nutrient broth (NB) có bổ sung 25% glycerol và giữ ở -80°C.

### 2.2 Phương pháp phục hồi, nuôi tăng sinh và kiểm tra các chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn

Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường TSA (Trypton soya agar) và ủ ở 28°C, kiểm tra kết quả sau 24-48 giờ. Sau đó chọn một khuẩn lạc rời từ đĩa cấy thuần cấy lên môi trường EIA (edwardsiella ictaluri agar), ủ cùng thời gian và nhiệt độ như trên rồi tiến hành nuôi tăng sinh trong môi trường NB. Kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản gồm nhuộm gram, di động, oxidase, catalase, O/F (theo phương pháp của Barrow và Feltham, 1993). Đồng thời một số chỉ tiêu sinh hóa cũng được kiểm tra bằng phương pháp sinh hoá truyền thống và bằng bộ kit API 20E (bioMerieux). Mỗi chỉ tiêu sử dụng cho 2 phương pháp trên được thực hiện lặp lại 3 lần, kết quả ghi nhận là kết quả có ít nhất hai lần lặp lại.

### 2.3 Gây cảm nhiễm *E. ictaluri* trên cá tra

Thí nghiệm gây cảm nhiễm được bố trí trong bể composite (100L), các dụng cụ được khử trùng bằng chlorine, xà phòng, rửa lại bằng nước sạch. Sau đó cho nước vào bể và lắp hệ thống sục khí liên tục 3 ngày để loại hết chlorine. Cá tra có trọng lượng 50-60g/con, màu sắc tươi sáng, phản ứng linh hoạt được chọn và bố trí ngẫu nhiên 6con/bể. Để vài ngày cho cá quen dần với môi trường nước bể thí nghiệm và cho cá ăn thức ăn viên theo nhu cầu bắt mồi của cá. Trước khi gây cảm nhiễm, bắt ngẫu nhiên 5 con cá, giải phẫu kiểm tra ký sinh trùng và phân lập vi khuẩn để khẳng định cá khoẻ và không bị nhiễm bệnh.

Vi khuẩn sau khi phục hồi trên môi trường TSA, giữ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp, sau đó chọn một khuẩn lạc nuôi tăng sinh trong môi trường NB trong 24 giờ, ly tâm 15 phút (4000 vòng/phút), rửa bằng nước muối sinh lý (0.85% NaCl). Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 650 nm, xác định OD = 1 (tương đương  $10^9$  tế bào/ml). Sau đó mật độ được tính lại bằng cách cho 10 $\mu$ l dung dịch lên môi trường TSA đếm và xác định số khuẩn lạc. Cá thí nghiệm được tiêm 0.2 ml/cá tại gốc vi ngực. Sau khi tiêm theo dõi liên tục biểu hiện của cá trong 10 ngày, chọn những cá có dấu hiệu lơ đờ, bơi lội kém linh hoạt để giải phẫu và phân lập lấy mẫu vi sinh ở thận, tỳ tạng và máu. Theo dõi và ghi nhận sự phát triển của vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn tái phân lập từ cá bị bệnh mổ gan qua cảm nhiễm nhân tạo được tái xác định các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hoá (bằng phương pháp sinh hóa truyền thống và bằng bộ kit API 20E). Đồng thời các chủng này cũng được tái xác định bằng phương pháp PCR.

### 2.4 Phương pháp PCR

#### 2.4.1 Chiết tách Acid nucleic

Vi khuẩn được nuôi tăng sinh (24 giờ) trong ống nghiệm có chứa 5ml môi trường LB (Bartie *et al.*, 2006) hoặc lấy tất cả các khuẩn lạc từ đĩa cấy thuần cho vào ống eppendorf chứa 1.5ml dung dịch 0.85% NaCl. Chuyển 1.5ml dung dịch vi khuẩn sang ống eppendorf và thêm vào 100 $\mu$ l dung dịch TE (10mM Tris HCl và 1mM EDTA). Đun ở 95°C trong vòng 15 phút. Làm lạnh trong nước đá. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 2 phút. Rút phần dung dịch ở trên và đo và xác định hàm lượng DNA bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 260 nm theo công thức:

$$\text{Hàm lượng DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Giá trị đo ở } 260 \text{ nm} \times 50 \times \text{độ pha loãng}$$

#### 2.4.2 Khuếch đại DNA (theo Panangala *et al.*, 2007, có điều chỉnh)

Thành phần hoá chất thực hiện phản ứng PCR gồm 10 X PCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ M dNTPs, 5U *Taq* DNA polymerase, 0.4  $\mu$ M mồi EiFd-1, 0.4  $\mu$ M mồi EiRs-1, 20 ng DNA mẫu và nước. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút, 90°C trong 30 giây, 53°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây lặp lại chu kỳ trên 30 lần, 72°C trong 10 phút.

#### 2.4.3 Đọc kết quả

Quá trình điện di được thực hiện với dung dịch TAE 0,5X và bản thạch chứa 1.5% agarose (Promega). Đọc kết quả dựa vào thang DNA 1 kb plus (Invitrogen) để

xác định trọng lượng phân tử. Trọng lượng phân tử đoạn DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* cần phát hiện là 407 bp.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng *E. ictaluri*

Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa của *E. ictaluri* theo phương pháp sinh hóa truyền thống được trình bày ở bảng 1. Các chủng đều có hình que, Gram âm, phản ứng oxidase âm tính, phản ứng catalase dương tính, phát triển được trên môi trường EIA sau 24-48 giờ ở nhiệt độ 28°C tạo thành các khuẩn lạc nhỏ, không nhân. Ngoài ra chúng có khả năng lên men và oxi hóa đường glucose, không có khả năng sinh khí H<sub>2</sub>S và không sinh indole trong môi trường NB. Tuy nhiên tất cả các chủng đều có khả năng thủy phân lysine và ornithine.

**Bảng 1: Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa các chủng vi khuẩn bằng phương pháp sinh hóa truyền thống**

Chỉ tiêu	CAF255	CAF258	2B1	3B3	C1	C2	Chủng chuẩn Hawke (1979)
Di động	+	+	+	+	+	+	+
Nhuộm Gram	-	-	-	-	-	-	-
Hình dạng	que	que	que	que	que	que	que
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
O/F	+	+	+	+	+	+	+
Sinh indole	-	-	-	-	-	-	-
Sinh H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-
Sử dụng Urea	-	-	-	-	-	-	-
Sử dụng amino acid							
Arginine	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine	+	+	+	+	+	+	-
Phản ứng VP	-	-	-	-	-	-	-
Sử dụng Citrate	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-
Tạo acid từ							
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-): âm tính; (+) dương tính

Kết quả phân tích các chỉ tiêu sinh hóa của *E. ictaluri* bằng kit API 20E được trình bày ở bảng 2. Kết quả cũng cho các chỉ tiêu đều âm tính trừ glucose và lysine.

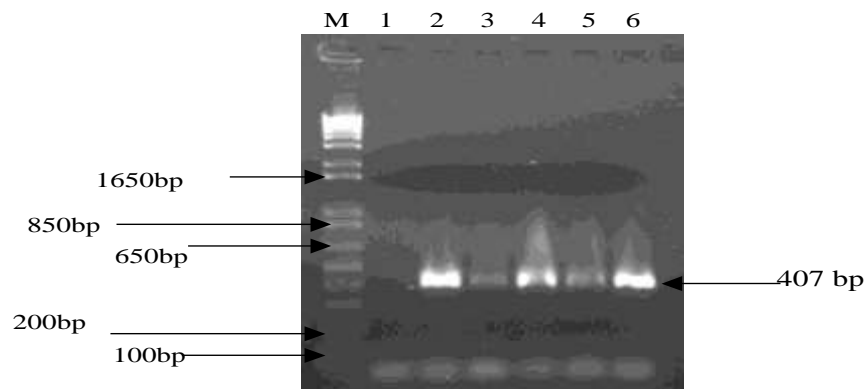
**Bảng 2: Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa (bằng bộ kit API 20E) các chủng vi khuẩn *E. ictaluri***

Chỉ tiêu	CAF255	CAF258	2B1	3B3	C1	C2
Di động	+	+	+	+	+	+
Nhuộm Gram	-	-	-	-	-	-
Hình dạng	que	que	que	que	que	que
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
O/F	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
UREA	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+
MAN	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-) âm tính; (+) dương tính; ONPG: beta galactosidase; ADH: arginine decarboxylase; LDC: lysine decarboxylase; ODC: ornithine decarboxylase; CIT: citrate; H<sub>2</sub>S: H<sub>2</sub>S production; UREA: ure; IND: indole; VP: phản ứng voges-proskauer; GLU: glucose; MAN: mannitol; INO: inositol; SOR: sorbitol; RHA: rhamnose; ARA: arabinose; SAC: sucrose.

### 3.2 Kết quả PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR 5 chủng *E. ictaluri* được trình bày ở hình 1. Sản phẩm PCR đều hiện vạch tại vị trí 407 bp chứng tỏ có sự hiện diện của *E. ictaluri* tương tự như kết quả của Panangala *et al.*, (2007).

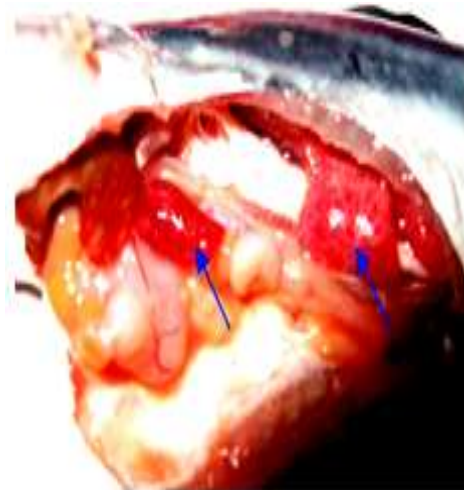


**Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR các chủng *E. ictaluri*. Giếng M: thang đo DNA (1 kb plus Invitrogen); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2: chủng CAF255; Giếng 3: chủng 258; Giếng 4: chủng 3B3; Giếng 5: chủng C1; Giếng 6: chủng C2**

Kết quả PCR DNA vi khuẩn chiết tách từ dung dịch nuôi trong NB hoặc pha trực tiếp trong dung dịch 0.85% NaCl đều cho kết quả như nhau. Kết quả thực hiện qui trình PCR cho thấy qui trình này có thể sử dụng tốt để phát hiện *E. ictaluri*.

### 3.3 Kết quả gây cảm nhiễm và tái định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được gây cảm nhiễm trên cá khỏe để xác định khả năng gây bệnh mủ gan, sau đó tái phân lập và tái định danh vi khuẩn từ thận, tỳ tạng và máu. Các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn trước và sau khi gây cảm nhiễm được so sánh nhằm khẳng định tác nhân gây bệnh mủ gan là vi khuẩn *E. ictaluri*. Mật độ vi khuẩn gây cảm nhiễm dao động từ  $0.7-1.5 \times 10^7$  CFU/ml. Sau 2 ngày theo dõi liên tục, cá ở các bể tiêm vi khuẩn chủng CAF258, C1 và C2 bắt đầu có biểu hiện bệnh lý như bơi lội lờ đờ, kém linh hoạt được giải phẫu quan sát nội quan và lấy mẫu vi sinh ở thận, tỳ tạng và máu. Kết quả cho thấy bể tiêm vi khuẩn chủng CAF258 có tỷ lệ cá chết là 4/6 con, bể C1 có tỷ lệ cá chết là 3/6 và bể C2 có tỉ lệ cá chết là 4/6. Thận cá có những đốm trắng nhỏ li ti (Hình 2).



**Hình 2: Thận cá tra gây cảm nhiễm đồng vi khuẩn CAF258 (mũi tên chỉ các đốm trắng)**

Kết quả tái phân lập vi khuẩn ở thận, tỳ tạng và máu (môi trường TSA, sau đó ủ ở 28°C trong thời gian 24-48 giờ) xuất hiện các khuẩn lạc nhỏ, tròn, trắng đục, không nhân. Kết quả tái xác định các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa bằng phương pháp sinh hóa được trình bày ở bảng 3 và bảng 4. Các chủng vi khuẩn tái phân lập từ cá tra thí nghiệm đều có hình que, Gram âm, di động yếu, phản ứng oxidase âm tính, phản ứng catalase dương tính, tất cả đều có khả năng lên men O/F trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí qua hai phương pháp sinh hóa đồng thời cũng cho kết quả PCR giống nhau (hiện vạch 407 bp). Nhìn chung tất cả các chỉ tiêu ở 3 chủng vi khuẩn trước và sau khi gây cảm nhiễm đều có kết quả giống nhau ở cả 3 phương pháp: (1) sinh hóa truyền thống; (2) sử dụng kit API 20E và (3) PCR.

**Bảng 3: Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa các chủng vi khuẩn tái phân lập từ thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp sinh hóa truyền thống**

Chỉ tiêu	CAF258		C1		C2	
	TCN	SCN	TCN	SCN	TCN	SCN
Di động	+	+	+	+	+	+
Nhuộm Gram	-	-	-	-	-	-
Hình dạng	que	que	que	que	que	que
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
O/F	+	+	+	+	+	+
Sinh Indole	-	-	-	-	-	-
Sinh H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
Sinh Urea	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+	+	+
Ornithine	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Innositol	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: TCN: trước khi gây cảm nhiễm; SCN: sau khi gây cảm nhiễm

**Bảng 4: Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa các chủng vi khuẩn tái phân lập từ thí nghiệm cảm nhiễm bằng bộ kit API 20E**

Chỉ tiêu	CAF258		C1		C2	
	TCN	SCN	TCN	SCN	TCN	SCN
Di động	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-
Hình dạng	que	que	que	que	que	que
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
O/F	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
UREA	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+
MAN	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: ONPG: beta galactosidase; ADH: arginine decarboxylase; LDC: lysine decarboxylase; ODC: ornithine decarboxylase; CIT: citrate; H<sub>2</sub>S: H<sub>2</sub>S production; UREA: ure; IND: indole; VP: phản ứng voges-proskauer; GLU: glucose; MAN: mannitol; INO: inositol; SOR: sorbitol; RHA: rhamnose; ARA: arabinose; SAC: sucrose; TCN: trước khi gây cảm nhiễm; SCN: sau khi gây cảm nhiễm.

Với phương pháp sinh hóa truyền thống và sử dụng kit API 20E, dùng phương pháp nào cũng định danh được loài *E. ictaluri*. Tuy nhiên, phương pháp PCR phát hiện nhanh *E. ictaluri* (hiện vạch tại vị trí 407 bp) cũng có thể được ứng dụng. Việc ly trích DNA từ dung dịch vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong LB sẽ mất hơn 1 ngày, trong khi ly trích DNA từ vi khuẩn hòa tan trong dung dịch 0.85% NaCl thì thời gian sẽ giảm đi rất nhiều (1/4) so với phương pháp truyền thống mà cho kết quả như nhau. Với cách làm này sẽ tiết kiệm được nhiều thời gian và chi phí, đồng thời cho phép phát hiện nhanh và sớm các mầm bệnh ở dạng tiềm ẩn. Đây sẽ là hướng đi mới trong việc chẩn đoán nhanh bệnh mù gan ở cá tra nuôi, nếu nghi ngờ ao nuôi nhiễm bệnh thì không phải đợi đến khi bệnh bộc phát mà vẫn có thể chẩn đoán sớm để kịp thời chữa trị. Nếu dùng phương pháp sinh hóa truyền thống để xác định *E. ictaluri* thì sẽ mất khoảng 3-4 ngày, sử dụng kit API 20E thì cần khoảng 2-3 ngày, trong khi phương pháp PCR chỉ cần khoảng 6-7 giờ cho việc ly trích DNA, khuếch đại và điện di.

#### 4 KẾT LUẬN

Qui trình PCR phát hiện nhanh vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra nuôi được thực hiện và chuẩn hoá. Sản phẩm PCR có kích thước 407 bp. Thành phần phản ứng PCR gồm: 10 X PCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM dNTPs, 5U *Taq* DNA polymerase, 0,4 µM mỗi EiFd-1, 0,4 µM mỗi EiRs-1, 20 ng DNA mẫu, nước. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút, 90°C trong 30 giây, 53°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây lặp lại chu kỳ trên 30 lần, 72°C trong 10 phút. So sánh với phương pháp sinh hóa truyền thống và sử dụng kit API 20E thì phương pháp PCR có thể được sử dụng để phát hiện sớm và chính xác tác nhân gây bệnh mù gan ở cá tra. Mặt khác, thời gian chẩn đoán bệnh bằng phương pháp PCR được rút ngắn đi rất nhiều so với phương pháp truyền thống.

#### LỜI CẢM TẠ

Các nội dung nghiên cứu trong báo cáo này được thực hiện từ nguồn kinh phí nghiên cứu khoa học của Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barrow, G. I. and R. K. A. Feltham. 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge. 262.
- Bartie, K., Đ. T. H. Oanh, G. Huy, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, N. T. Phuong, A. Teale. 2006. Tạp chí Công nghệ Sinh học 4 (1): p31-40.
- Dung T.T, M. Crumlish, J F Turnbull, N.T.N.Ngoc and H W Ferguson, 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong delta, VietNam. Journal of fish diseases, 25, 733-736.
- Dung T.T, M. Crumlish, N.T.N.Ngoc, N.Q.Thịnh & Đ.T.M Thy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 2004.



- Ferguson, H.W, JF Turnbull, A Shinn, K.Thomson, TT Dung and M.Crumlish, 2001, Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong delta, VietNam. Journal of fish disease 2001, 24, page 509-513.
- Hawke, J.P, 1979. A bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 36: 1508-1512.
- Nguyễn Quốc Thịnh, Từ Thanh Dung, Ferguson H.W, 2003. Nghiên cứu mô bệnh học cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bị bệnh trắng gan. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, chuyên ngành thủy sản, 2004, 120-125.
- Panangala V. S. , Craig A. Shoemaker, Vicky L. van Santen, Kevin Dybvig, Phillip H. Klesius, 2007, multiplex- PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophyla*. Diseases of aquatic organisms, 74: 199- 208.