

CHUẨN HÓA QUI TRÌNH PCR PHÁT HIỆN VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI*, *AEROMONAS HYDROPHILA* VÀ *FLAVOBACTERIUM COLUMNARE* TỪ MÁU CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPHthalmus*)

Trần Nguyễn Diễm Tú¹ và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

ABSTRACT

Protocol for DNA extraction from blood of stripped catfish and PCR protocols for detection of Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila and Flavobacterium columnare bacteria were optimized and applied. The optimized PCR protocol for detection of E. ictaluri bacteria gave a PCR product of 407 bp and detection sensitivity was 4.5×10^4 CFU/ml of bacteria in 100 μ l catfish blood. The optimized PCR protocol for detection of A. hydrophila bacteria gave a PCR product of 209 bp and detection sensitivity was 4.5×10^6 CFU/ml of bacteria in 100 μ l catfish blood. The optimized PCR protocol for detection of F. columnare bacteria gave a PCR product of 504 bp and detection sensitivity was 4.5×10^3 CFU/ml of bacteria in 100 μ l catfish blood. These PCR protocols were used to detect respective bacteria in blood samples of experimental injection catfish. The obtained results showed that optimized PCR protocols can be used as a non destructive methods for rapid, sensitive and specific detection of bacterial infection in catfish.

Keywords: *Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila, Flavobacterium columnare, PCR. Fish blood*

Title: *Optimization of PCR protocols for detection of Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila and Flavobacterium columnare bacteria from stripped catfish blood*

TÓM TẮT

Qui trình chiết tách DNA từ máu cá tra và các qui trình PCR phát hiện các loài vi khuẩn Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila và Flavobacterium columnare được chuẩn hóa và ứng dụng. Qui trình PCR phát hiện E. ictaluri cho sản phẩm PCR đặc hiệu là 407 bp với độ nhạy phát hiện là 4.5×10^4 CFU/ml vi khuẩn trong 100 μ l máu cá. Qui trình PCR phát hiện A. hydrophila cho sản phẩm PCR đặc hiệu là 209 bp với độ nhạy phát hiện là 4.5×10^6 CFU/ml vi khuẩn trong 100 μ l máu cá. Qui trình PCR phát hiện F. columnare cho sản phẩm PCR đặc hiệu là 504 bp với độ nhạy phát hiện là 4.5×10^3 CFU/ml vi khuẩn trong 100 μ l máu cá. Các qui trình trên được sử dụng để phát hiện các vi khuẩn tương ứng trong mẫu máu cá cảm nhiễm vi khuẩn. Kết quả cho thấy các qui trình có thể phát hiện nhanh, nhạy và đặc hiệu mẫu máu cá tra nhiễm khuẩn nhưng vẫn giữ sống mẫu xét nghiệm.

Từ khoá: *Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila, Flavobacterium columnare, Pangasianodon hypophthalmus, PCR, máu cá*

1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây nghề nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Việt Nam phát triển rất nhanh, đặc biệt là nuôi thâm canh hóa với mật độ cao nên

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

vấn đề dịch bệnh xảy ra thường xuyên và gây thiệt hại nặng nề hơn. Dịch bệnh do các bệnh truyền nhiễm đã và đang gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và sản lượng cá nuôi trong đó có bệnh mũ gan do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây ra. Ngoài ra còn có bệnh trắng da do vi khuẩn *Flavobacterium columnare* cũng gây nhiều thiệt hại. Quản lý dịch bệnh ao nuôi cá tra sao cho hiệu quả là vấn đề quan tâm hàng đầu của người nuôi cá. Một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sức khỏe ao nuôi cá tra đó là chọn cá bố mẹ để cho sinh sản và cá giống sạch bệnh để phòng ngừa khả năng bộc phát và lây lan bệnh. Hiện nay PCR là phương pháp chủ yếu được sử dụng để phát hiện nhanh và chính xác mầm bệnh vi khuẩn ở thủy sản. Gần đây phương pháp PCR đã được ứng dụng để phát hiện vi khuẩn từ thận cá tra như vi khuẩn *E. ictaluri* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy, 2009), *A. hydrophila* (Nguyễn Hà Giang *et al.*, 2009, 2010) đã rút ngắn rất nhiều thời gian và giảm chi phí phân tích. Tuy nhiên việc chẩn đoán bệnh cá từ thận phải làm chết cá nên không đáp ứng nhu cầu xét nghiệm ở cá bố mẹ hoặc trong trường hợp cần giữ sống mẫu. Trong bài báo này chúng tôi trình bày các qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* từ máu cá tra để phát hiện nhanh và nhạy ba loại vi khuẩn nêu trên nhằm ứng dụng vào xét nghiệm bệnh vi khuẩn ở cá tra nhưng không làm chết cá nhất là đối với cá bố mẹ cho sinh sản.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá tra giống có khối lượng khoảng 20-25g/con, da sáng, phản ứng linh hoạt. Các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (Eic-CA3.1G), *A. hydrophila* (Ahy-CA1.2T) và *F. columnare* (CAF-09-Fcol-M1) từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Các chủng được phục hồi và nuôi tăng sinh trong môi trường NB (nutrient broth) đối với *E. ictaluri* và *A. hydrophila* và môi trường CB (cytopha broth) đối với *F. columnare* từ 24-48 giờ ở 28°C tùy theo loài vi khuẩn. Sau khi nuôi tăng sinh, mật độ vi khuẩn được đo bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 540 nm. Mật độ *F. columnare* là 10^9 CFU/ml khi OD=0.7 ± 0.02, mật độ *E. ictaluri* và *A. hydrophila* là 10^9 CFU/ml với OD=1 ± 0.02.

Phương pháp chiết tách DNA từ máu cá được thực hiện theo Bilodeau *et al.* (2005). Máu cá được lấy bằng kim tiêm 1 ml có sử dụng heparin (Leal-Klevezas *et al.*, 1995). 100 µl mẫu máu được ly tâm ở 4000xg trong 3 phút. Phần viên sau khi ly tâm được hòa tan trong 250 µl dung dịch lysis erythrocyte (155mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 100mM EDTA), sau đó ly tâm 4000xg trong 3 phút. Quá trình này được lặp lại cho đến khi thu được phần viên không màu. Sau đó 200 µl dung dịch lysis buffer (10 mM Tris-HCL có pH=8, 0,5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS) và 2 µl proteinase K (5 mg/µl) được thêm vào phần viên và ủ ở 50°C trong 30 phút. Tiếp đến, 400 µl dung dịch phenol bão hòa (pH=8) được thêm vào, lắc kỹ và ly tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch phía trên được chuyển sang ống tuýp mới, sau đó thêm 400 µl chloroform:isoamylalcohol (24:1) và ly tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch ở trên được chuyển sang ống tít mới có chứa 200 µl NH₄Oac

(7,5 M), giữ lạnh bằng nước đá trong 10 phút sau đó ly tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch ở trên lại được chuyển sang ống típ mới có chứa ethanol (95%) với tỉ lệ 1 mẫu và 2 ethanol rồi ủ ở -80°C, ly tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch nổi được bỏ đi và phần viên được rửa trong 1ml ethanol (70%). Sau đó phần còn được loại bỏ và phần viên được làm khô rồi hòa tan bằng 15 µl H₂O và trữ ở -20°C.

Thành phần phản ứng PCR phát hiện *E. ictaluri* được thực hiện dựa theo qui trình của Panangala *et al.* (2007) (có điều chỉnh theo Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010) gồm 1X dung dịch đệm 10X; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 2.5U *Taq* DNA polymerase; 0.4 µM mỗi xuôi (EiFd-1); 0.4 µM mỗi ngược (EiRs-1) và 500 ng mẫu DNA chiết tách từ máu cá có trộn vi khuẩn *E.ictaluri*. Chu kì nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây; 55°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 30 lần; 72°C trong 10 phút.

Thành phần phản ứng PCR phát hiện *A. hydrophila* được thực hiện dựa theo qui trình của Panangala *et al.* (2007) (có điều chỉnh theo Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010) có điều chỉnh gồm 1X dung dịch đệm 10X; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 2.5 U *Taq* DNA polymerase; 0.5 µM mỗi xuôi (AeroFd); 0.5 µM mỗi ngược (AeroRs) và 500 ng mẫu DNA chiết tách từ máu cá có trộn vi khuẩn *A. hydrophila*. Chu kì nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây; 60°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 30 lần; 72°C trong 10 phút.

Thành phần phản ứng PCR phát hiện *F. columnare* được thực hiện dựa theo qui trình của Panangala *et al.* (2007) có điều chỉnh gồm 1X dung dịch đệm 10X; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 2,5 U *Taq* DNA polymerase; 0.6 µM mỗi xuôi (FcFd); 0.6 µM mỗi ngược (FcRs) và 500 ng mẫu DNA chiết tách từ máu cá có trộn vi khuẩn *F. columnare*. Chu kì nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây; 58°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 30 lần; 72°C trong 10 phút

Thí nghiệm xác định độ nhạy của phản ứng PCR được thực hiện bằng cách pha loãng vi khuẩn từ 10⁹ đến 10¹ CFU/ml. Sau đó ly tâm 450 µl vi khuẩn để lấy phần viên rồi trộn với 100 µl máu và chiết tách DNA. DNA sau khi chiết tách được đo hàm lượng và pha loãng ở hàm lượng 500 ng/µl.

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel 1% agarose (Abgene, UK) trong dung dịch đệm TAE 0.5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0.1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng bàn đọc UV. Căn cứ vào thang DNA chuẩn để xác định trọng lượng phân tử. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* là 407 bp, *A. hydrophila* là 209 bp và *F. columnare* là 504 bp.

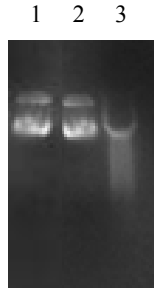
Thí nghiệm cảm nhiễm trên cá tra giống có khối lượng khoảng 20-25g/con, da sáng, phản ứng linh hoạt, được kiểm tra ký sinh trùng và vi khuẩn tiến hành bố trí thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí 4 bể: bể 1 tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* (10⁶ CFU/ml), bể 2 tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* (10⁶ CFU/ml), bể 3 tiêm vi khuẩn *F. columnare* (10⁶ CFU/ml). Bể 4 tiêm 3 vi khuẩn (Trộn 3 vi khuẩn *E. ictaluri* (10⁶ CFU/ml), *A. hydrophila* (10⁶ CFU/ml) và *F. columnare* (10⁶ CFU/ml) với tỉ lệ 1:1:1). Cá được bố trí vào bể nhựa (thể tích 60L được chứa nước 2/3 thể tích bể) với mật độ 5 con /bể. Vi khuẩn được tiêm ở gốc vi ngực với liều lượng 100 µl/cá.

Cá có dấu hiệu bệnh lý hoặc cá lờ đờ được tái phân lập vi khuẩn, lấy mẫu máu để phân tích PCR.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

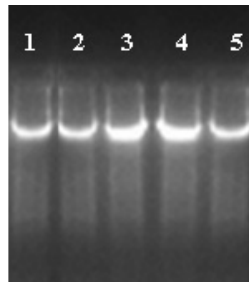
3.1 Quy trình chiết tách DNA từ máu cá

Quy trình chiết tách DNA từ máu cá được thực hiện theo Bilodeau *et al.* (2005) cho kết quả chiết tách DNA không ổn định, lượng DNA không tinh sạch với tỉ lệ 260/280=1,1 (tỉ lệ 260/280 = 1,8-2 là thích hợp) (Hình 1) và tốn nhiều thời gian.



Hình 1: Kết quả điện DNA chiết tách từ máu cá theo Bilodeau *et al.* (2005). Giếng 1, 2, 3: DNA chiết tách từ máu cá

Trong quá trình chiết tách DNA sau khi thêm 400 µl dung dịch phenol bão hòa và ly tâm 8000xg trong 5 phút thì thu được phần dịch trong phía trên rất ít. Quy trình được chuẩn hóa bằng cách tăng hàm lượng dung dịch lysis buffer lên 400 µl (gấp đôi so với qui trình gốc), tăng hàm lượng proteinase K lên 4 µl (gấp đôi) và bỏ qua giai đoạn ủ ở -80°C rồi tiến hành chiết tách DNA. Kết quả cho thấy qui trình chiết tách DNA sau khi điều chỉnh cho kết quả chiết tách ổn định (Hình 2) và ít tốn thời gian hơn (tiết kiệm được 30 phút so với qui trình gốc). Quy trình có thể được ứng dụng để chiết tách DNA từ máu cá.

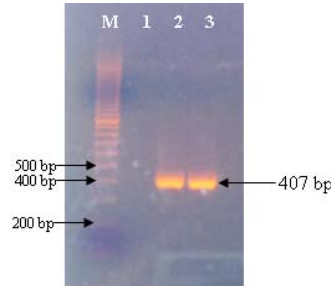


Hình 2: Kết quả điện di DNA chiết tách từ máu cá (quy trình có điều chỉnh). Giếng 1, 2, 3, 4, 5: DNA chiết tách từ máu cá

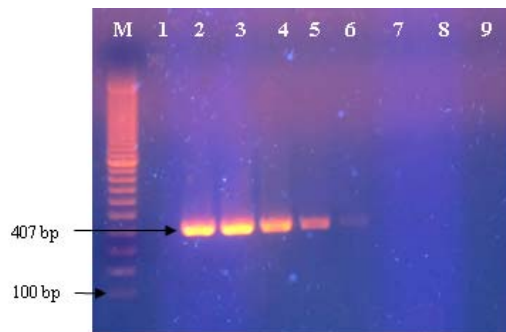
3.2 Quy trình PCR phát hiện *E. ictaluri* từ máu cá

Kết quả điện di sản phẩm PCR mẫu DNA chiết tách từ máu cá trộn với vi khuẩn *E. ictaluri* sử dụng qui trình của Panangala *et al.* (2007) (có điều chỉnh theo Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010) hiện vạch 407 bp đặc hiệu của *E. ictaluri* (Hình 3) và không phát hiện sản phẩm không đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri* cho thấy qui trình có thể phát hiện được vi khuẩn *E. ictaluri* ở với mật độ thấp nhất là 4.5×10^4

CFU/ml trong 100 µl máu cá (giếng 6, Hình 4). So với các qui trình phát hiện *E. ictaluri* đã được công bố (Bilodeau *et al.*, 2005; Panangala *et al.*, 2007; Takamitsu *et al.*, 2011) thì qui trình trên có độ nhạy thấp hơn. Tuy nhiên, Bilodeau *et al.* (2005) sử dụng phương pháp realtime PCR có độ nhạy rất cao nên khả năng phát hiện 2.5 tế bào vi khuẩn. Panangala *et al.* (2007) và Takamitsu *et al.* (2011) sử dụng DNA làm mạch khuôn được chiết tách từ vi khuẩn nên cũng có độ nhạy cao. Hơn nữa các qui trình trên đều được thực hiện trên cá nheo mỹ. Mặc dù có độ nhạy thấp hơn nhưng qui trình chúng tôi tối ưu hóa vẫn có ứng dụng tốt để phát hiện *E. ictaluri* từ máu cá tra.



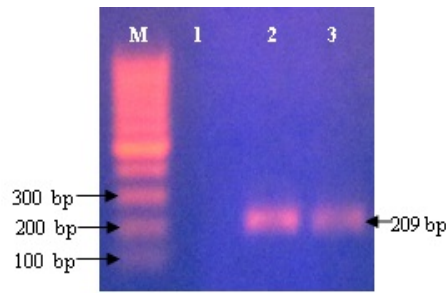
Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Bio-rad); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2 và 3: mẫu DNA chiết tách từ máu có trộn với vi khuẩn *E. ictaluri*



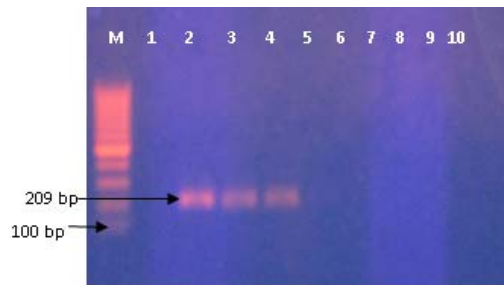
Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Bio-rad); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-9: DNA chiết tách từ 100µl với mật độ vi khuẩn lần lượt là 4.5×10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 và 10^1 CFU/ml

3.3 Qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* từ máu cá

Kết quả điện di sản phẩm PCR mẫu DNA chiết tách từ máu cá trộn với vi khuẩn *A. hydrophila* sử dụng qui trình của Panangala *et al.* (2007) (có điều chỉnh theo Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010) hiện vạch 209 bp đặc hiệu của *A. hydrophila* (Hình 5) và không phát hiện sản phẩm không đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* cho thấy qui trình có thể phát hiện được vi khuẩn *A. hydrophila* ở với mật độ thấp nhất là 4.5×10^5 CFU/ml trong 100 µl máu cá (giếng 5, Hình 6).



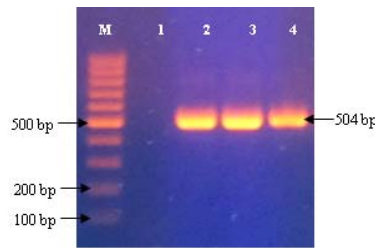
Hình 5: Kết quả điện di sản phẩm qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2 và 3: mẫu DNA chiết tách từ máu có trộn với vi khuẩn *A. Hydrophila*



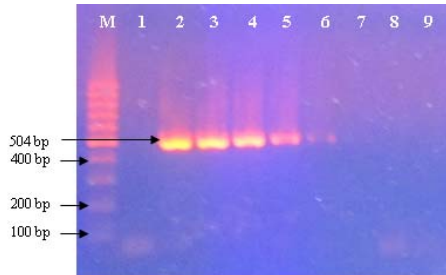
Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Bio-rad); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-9: DNA chiết tách từ 100µl với mật độ vi khuẩn lần lượt là 4.5×10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 và 10^1 CFU/ml

3.4 Qui trình PCR phát hiện *F. columnare* từ máu cá

Kết quả điện di sản phẩm PCR mẫu DNA chiết tách từ máu cá trộn với vi khuẩn *F. columnare* sử dụng qui trình của Panangala *et al.* (2007) (có điều chỉnh theo Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010) hiện vạch 504 bp đặc hiệu của *F. columnare* (Hình 7) và không phát hiện sản phẩm không đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *F. columnare* cho thấy qui trình có thể phát hiện được vi khuẩn *F. columnare* ở với mật độ thấp nhất là 4.5×10^3 CFU/ml trong 100 µl máu cá (giếng 7, Hình 8). Độ nhạy của qui trình thấp hơn so thí nghiệm xác định độ nhạy qui trình PCR phát hiện *F. columnare* của Welker (2005) (phát hiện ở mức 7 CFU/ml) là do qui trình của tác giả sử dụng DNA trực tiếp từ vi khuẩn. Vì qui trình chiết tách DNA trực tiếp từ máu cá có vi khuẩn nên DNA thu được sẽ bao gồm DNA của máu cá và DNA của vi khuẩn, trong đó hàm lượng DNA của vi khuẩn chiết tách là rất ít. Mặc dù vậy, khả năng phát hiện *F. Columnare* ở mật độ 4.5×10^3 CFU/ml trong 100 µl máu cá tra của qui trình vẫn có ứng dụng tốt trong xét nghiệm bệnh vi khuẩn ở cá.



Hình 7: Kết quả điện di sản phẩm qui trình PCR phát hiện *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2, 3 và 4: mẫu DNA chiết tách từ máu có trộn với vi khuẩn *F. Columnare*



Hình 8: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Bio-rad); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-9: DNA chiết tách từ 100µl với mật độ vi khuẩn lần lượt là 4.5×10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 và 10^1 CFU/ml

3.5 Ứng dụng qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ máu cá cảm nhiễm vi khuẩn

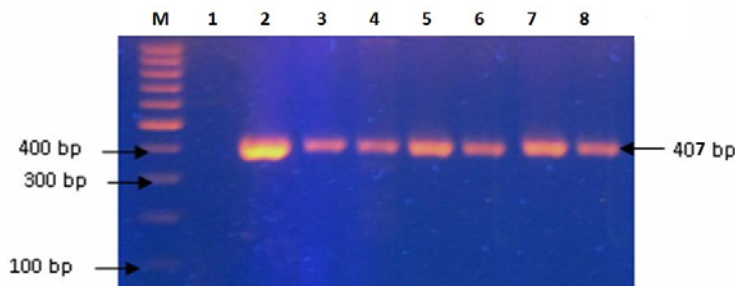
Cá sau khi cảm nhiễm có dấu hiệu bệnh lý hoặc cá lờ đờ được thu để tái phân lập vi khuẩn và lấy máu để chiết tách DNA dùng để thực hiện qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri*, *F. columnare* và *A. hydrophila*. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy mẫu máu thu từ cá ở bể tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* (giếng 3, 4 và 5) và bể tiêm 3 vi khuẩn (giếng 6, 7 và 8) đều hiện vạch 407 bp (vạch đặc hiệu của vi khuẩn *E. ictaluri*). Các mẫu vi khuẩn tái phân lập được xác định đặc tính sinh hóa và cho kết quả định danh là vi khuẩn *E. ictaluri*.

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy mẫu máu thu từ cá ở bể tiêm vi khuẩn *F. columnare* (giếng 3, 4, 5, 6) và bể tiêm 3 vi khuẩn (giếng 7, 8, 9) có những mẫu F1, F4, M1 và M2 có sự hiện diện của *F. columnare* (giếng 3, giếng 6, giếng 7, giếng 8; hình 10) những mẫu còn lại (F2, F3 và M3) không hiện vạch.

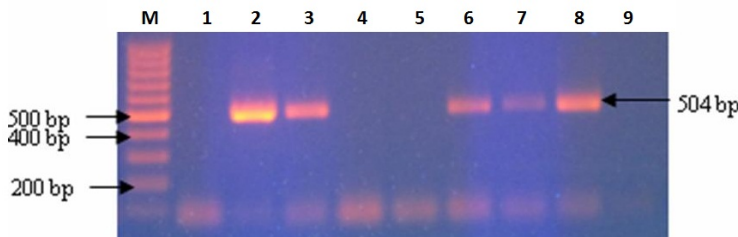
Tương tự, kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy mẫu máu thu từ cá ở bể tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* (giếng 3, 4, 5, 6) và bể tiêm 3 vi khuẩn (giếng 7, 8, 9) có những mẫu A3, A4, M1 và M2 có sự hiện diện của *A. hydrophila* (giếng 5, giếng 6, giếng 7, giếng 8; hình 11) những mẫu còn lại (A1, A2 và M3) không hiện vạch.

Sau khi thực hiện các qui trình PCR sử dụng mẫu máu từ cá cảm nhiễm vi khuẩn cho thấy các qui trình đều cho kết quả phát hiện tốt. Những mẫu có sự hiện diện của vi khuẩn qua kết quả phân lập đều cho kết quả PCR dương tính, những mẫu không có sự hiện diện của vi khuẩn khi tái phân lập thì cho kết quả âm tính. Mặc

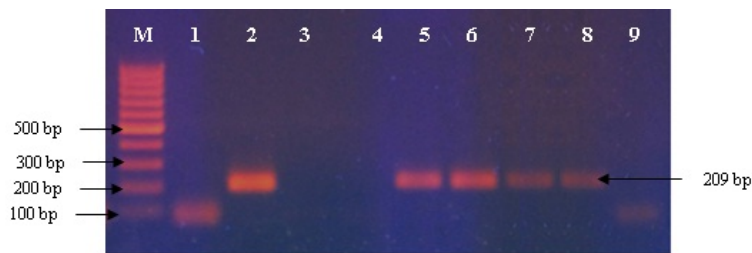
khác cũng có khả năng số lượng vi khuẩn có trong mẫu máu thấp hơn giới hạn phát hiện của qui trình PCR nên cho kết quả âm tính.



Hình 9: Kết quả điện di sản phẩm PCR ứng dụng qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri* sử dụng DNA chiết tách từ máu cá tra cảm nhiễm vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm; Giếng 2: đối chứng dương; Giếng 3-5: bể tiêm *E. ictaluri*: mẫu E2, E3 và E4; Giếng 6-8: bể tiêm 3 vi khuẩn: mẫu M1, M2 và M3



Hình 10: Kết quả điện di sản phẩm PCR ứng dụng qui trình PCR phát hiện *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ máu cá tra cảm nhiễm vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm; Giếng 2: đối chứng dương; Giếng 3-6: bể tiêm *F. columnare*: mẫu F1, F2, F3 và F4; Giếng 7-9: bể tiêm 3 vi khuẩn: mẫu M1, M2 và M3



Hình 11: Kết quả điện di sản phẩm PCR ứng dụng qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ máu cá tra cảm nhiễm vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm; Giếng 2: đối chứng dương; Giếng 3-6: bể tiêm *A. hydrophila*: mẫu A1, A2, A3 và A4; Giếng 7-9: bể tiêm 3 vi khuẩn: mẫu M1, M2 và M3

4 KẾT LUẬN

Các qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ máu cá tra với thời gian chẩn đoán ngắn, độ nhạy cao và không gây chết cá có thể ứng dụng để xét nghiệm/chẩn đoán bệnh vi khuẩn trên cá tra, đặc biệt là cá bố mẹ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bilodeau A. L., G. C. Waldbieser, J. S. Terhune, D. J. Wise and W. R. Wolters. (2003). A real time polymerase chain reaction assay of the bacterium *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*. 15: 80-86.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy. (2009). Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên thân cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Báo cáo hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Công nghệ sinh học phục vụ Nông-Lâm nghiệp, Thủy sản, Công nghiệp, Y-Dược và bảo vệ môi trường. Thái Nguyên, ngày 26-27 tháng 11, 2009. Mã số 04-09/DHTN-2009.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương. (2010). Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí khoa học. Đại học Cần Thơ*. 13: 151-159.
- Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh. (2010). Phân lập và xác định khả năng gây bệnh trắng da trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) của vi khuẩn *Flavobacterium columnare*. *Tạp chí khoa học. Đại học Cần Thơ*. 14: 211-220.
- Nguyễn Hà Giang, Trương Quỳnh Như, Lê Hữu Thôi và Đặng Thị Hoàng Oanh. (2010). Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên thân cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bệnh xuất huyết. *Tạp chí khoa học. Đại học Cần Thơ*. 16a:136-140.
- Panangala V. S., C. A. Shoemaker, V. L. V. Santen, D. Dybvig and P. H. Klesius. (2007). Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacteria fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of aquatic organisms*. 74: 199-208.
- Takamitsu, S., K. Yuasa, M. Sano and T. Iidai. (2009). Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by Species-Specific Polymerase Chain Reaction Targeted to the Upstream Region of the Fimbrial Gene. *Journal of Aquatic Animal Health*. 21: (2) 124-132.
- Taggart, J. B, R. A. Hynes, P. A. Podohl and A. Ferguson. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of fish Biology*. 40: 963-965.
- Welker T. L., C. A. Shoemaker, C. R. Arias and P. H. Klesius. (2005). Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 129-138.