

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG QUI TRÌNH mPCR CHẨN ĐOÁN ĐỒNG THỜI VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI* VÀ *AEROMONAS HYDROPHILA* TRÊN THẬN CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPTHALMUS*)

Lê Hữu Thôi, Trương Quỳnh Như, Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh

Bộ môn sinh học và bệnh thủy sản

Khoa Thủy Sản, Đại học Cần Thơ

thoi.3042415@student.ctu.edu.vn

tqnhu75@student.ctu.edu.vn

giang.3042342@student.ctu.edu.vn

dthoanh@ctu.edu.vn

ABSTRACT

A PCR protocol for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila* infection in kidney of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) was optimized. The forward primer EiFd-1 and reverse primer EiRs were used to amplify a unique sequence of 16S RNA gene of *E. ictaluri* with a PCR product of 407 bp (Panagala *et al.*, 2009). The forward primer AeroFd and reverse primer AeroRs were used to amplify Aerolysin gene of *A. hydrophila* with a PCR product of 209 bp (Panagala *et al.*, 2009). The lower detection limit was 100 pg for *E. ictaluri* and 1ng for *A. hydrophila* extracted DNA from striped catfish kidney. The diagnostic sensitivity and specificity of the PCR was evaluated with common bacterial isolates in aquaculture which are *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *A. sorbia*; *A. carviae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. The PCR appears to have good application for rapid, sensitive, specificity and low cost for detection of *E. ictaluri* *A. hydrophila* simultaneously in infected striped catfish.

TÓM TẮT

Qui trình PCR phát hiện đồng thời vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* nhiễm trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) được thực hiện và chuẩn hoá. Mỗi xuôi EiFd-1 và mỗi ngược EiRs được sử dụng để khuếch đại đoạn đặc hiệu trên gen 16S RNA của *E. ictaluri* với sản phẩm PCR là 407 bp (Panagala và *ctv.*, 2009). Mỗi xuôi AeroFd và mỗi ngược AeroRs được sử dụng để khuếch đại gen Aerolysin của *A. hydrophila* với sản phẩm PCR là 209 bp (Panagala và *ctv.*, 2009). Độ nhạy của qui trình là 100 pg DNA chiết tách từ thận cá tra cho *E. ictaluri* và 1ng cho *A. hydrophila*. Tính đặc hiệu của qui trình được kiểm tra với vi khuẩn phổ biến trong thủy sản là *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *A. sorbia*; *A. carviae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Qui trình có ứng dụng tốt để phát hiện nhanh, nhạy và đặc hiệu đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* nhiễm trên cá tra.

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây nghề nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) được thâm canh hóa đặc biệt là nuôi với mật độ cao nên vấn đề dịch bệnh xảy ra thường xuyên hơn và gây thiệt hại nặng nề hơn. Hai loại bệnh truyền nhiễm đã và đang gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và sản lượng cá nuôi là bệnh mù gan do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và bệnh xuất huyết do *Aeromonas hydrophila* gây nên. Việc quản lý dịch bệnh kém hiệu quả đang là vấn đề quan tâm hàng đầu của người nuôi cá. Một trong những nguyên nhân ảnh hưởng lớn nhất đó là xác định tác nhân gây bệnh chậm và kém chính xác, nhất là từ giai

đoạn cá giống. Hiện nay phương pháp phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ cá tra được sử dụng phổ biến là sử dụng phương pháp sinh hóa truyền thống hoặc sử dụng kit API 20E (BioMerieux). Đối với 2 phương pháp này cần có thời gian phân lập, nuôi cấy và định danh thường kéo dài từ 4-7 ngày (tùy loài). Thời gian chẩn đoán kéo dài như vậy thường không thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán bệnh trong nuôi cá tra hiện nay. Gần đây Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương (2009) đã ứng dụng phương pháp PCR để chẩn đoán nhanh vi khuẩn *E. ictaluri*, thời gian được rút ngắn $\frac{1}{4}$ lần so với phương pháp định danh *E. ictaluri* bằng phương pháp sinh hoá. Quy trình PCR phát hiện *E. ictaluri* từ thận cá tra (Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thuỵ Mai Thy, 2009) và quy trình PCR phát hiện *A. hydrophila* từ thận cá tra (Nguyễn Hà Giang và ctv, 2009) đã được ứng dụng trong chẩn đoán bệnh vi khuẩn ở cá tra. Trên cơ sở của hai quy trình trên, quy trình mPCR (multiplex PCR) phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên thận cá tra được phát triển và chuẩn hóa dựa nhằm rút ngắn thời gian chẩn đoán và chi phí phân tích. Quy trình có ứng dụng tốt trong chẩn đoán và nghiên cứu vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* nhất là trường hợp cá bị bội nhiễm 2 loại vi khuẩn với thời gian thực hiện chỉ khoảng 10 giờ.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Hai chủng vi khuẩn *E. ictaluri* CA3.1G và *A. hydrophila* CA1.2T được trữ ở -80°C tại khoa Thủy Sản, trường Đại học Cần Thơ được sử dụng để chiết tách DNA.

Thận cá tra bệnh mù gan và bệnh xuất huyết còn sống lơ lờ từ thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được thu và trữ trong ethanol (Merck) dùng để chiết tách DNA.

Phương pháp

Phương pháp chiết tách DNA từ vi khuẩn được thực hiện theo Bartie và ctv (2006). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh (16-18 giờ ở 28°C) trong 5 ml môi trường nutrient broth (NB) hoặc lấy vài khuẩn lạc từ đĩa cấy thuần cho vào ống eppendorf chứa 1.5 ml nước muối sinh lý. Chuyển 1.5 ml dung dịch vi khuẩn sang ống eppendorf mới và cho vào 100 µl dung dịch TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Hỗn hợp được đun nóng ở 95°C trong 15 phút rồi được làm lạnh nhanh trong nước đá. Ly tâm 2 phút với vận tốc 14.000 vòng/phút để tách dung dịch DNA và trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Phương pháp phenol chloroform (Taggart và ctv, 1992) được sử dụng để chiết tách DNA từ thận cá tra. Thận cá (50-100mg) được nghiền nát trong 600µl dung dịch Lysis buffer (0.5M NaCl, 0.001 EDTA, 1% SDS, 0.8% Triton, 0.1M Tris-HCl), 40µl SDS 10% và 2.5µl Proteinase K (40mg/ml). Chuyển động đảo lộn ống 25 lần. Ủ mẫu 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó cho vào 2.5µl RNase (2mg/ml). Chuyển động đảo ngược ống 25 lần. Ủ mẫu 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Cho vào 600µl chloroform - isoamyl (24:1) đảo và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C. Cẩn thận hút dung dịch phía trên chuyển sang 1 ống 1.5ml mới rồi cho vào 600µl phenol – chloroform - isoamyl (25:24:1) và đảo ngược ống. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Cẩn thận hút dung dịch phía trên chuyển sang 1 ống 1.5ml mới. Cho vào 600µl isopropanol lạnh. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Nhẹ nhàng loại bỏ dung dịch phía trên. Rửa DNA bằng 600µl cồn 70% lạnh. Dùng tay đánh nhẹ để rửa DNA. Nhẹ nhàng loại bỏ cồn phía trên. Lặp lại bước trên 1 lần nữa. Dùng micropipet loại bỏ cồn thật kỹ. Lật ngược và phơi ống trong vài giờ ở nhiệt độ phòng. Hòa tan

DNA bằng 50µl TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, có pH=7) và bảo quản ở -20°C. Hàm lượng DNA được xác định bằng máy so màu quang phổ với bước sóng 260nm.

Thành phần phản ứng PCR phát hiện *E. ictaluri* được thực hiện dựa theo qui trình của Panagala và ctv (2007) có điều chỉnh (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2009) 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) và 20ng mẫu DNA chiết tách từ 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 Panagala và ctv (2007) có điều chỉnh (Nguyễn Hà Giang và ctv, 2009) gồm 1X dung dịch đệm 10X; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 2.5U Taq DNA polymerase; 0.4 µM mỗi xuôi (AeroFd); 0.4 µM mỗi ngược (AeroRs) và 20ng mẫu DNA chiết tách từ 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.

Dựa theo hai qui trên thành phần phản ứng mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được thực hiện gồm dung dịch đệm 10X; MgCl₂; dNTPs; Taq DNA polymerase; mỗi xuôi (EiFd-1); mỗi ngược (EiRs); mỗi xuôi (AeroFd); mỗi ngược (AeroRs) và mẫu DNA vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

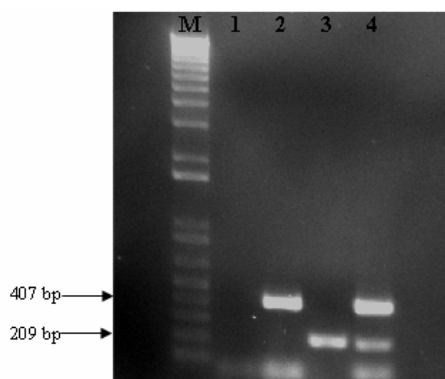
Thí nghiệm xác định độ nhạy của phản ứng PCR được thực hiện bằng cách pha loãng từ 10⁰ (100ng đối với DNA chiết tách từ vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*, 1000ng đối với mẫu chiết tách từ thận) đến 10⁻⁵. Thí nghiệm xác định tính đặc hiệu của qui trình PCR được thực hiện với các loài vi khuẩn phổ biến trong thủy sản là *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *A. sorbia*; *A. carviae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Sản phẩm PCR 10µl được chạy 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 Gel Doc XR System (Bio-Rad). Căn cứ vào thang DNA 1 kb plus (Invitrogen) để xác định trọng lượng phân tử. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* là 407 bp và *A. hydrophila* là 209 bp.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

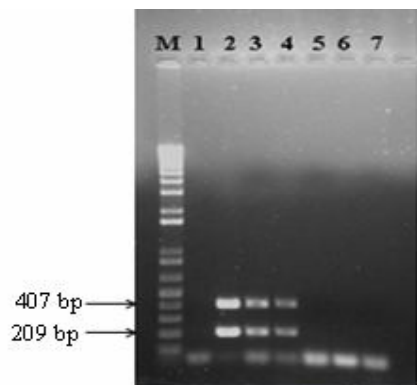
Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. Hydrophila*

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ vi khuẩn được thực hiện gồm 1X dung dịch đệm 10X; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 1.5U Taq DNA polymerase; 0.4 µM mỗi xuôi (EiFd-1); 0.4 µM mỗi ngược (EiRs); 0.4 µM mỗi xuôi (AeroFd); 0.4 µM mỗi ngược (AeroRs) và 20ng mẫu DNA chiết tách từ vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. 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. Kết quả điện di sản phẩm PCR ở giếng 4 hiện đồng thời 2 vạch 407 bp và 209 bp (hình 1).



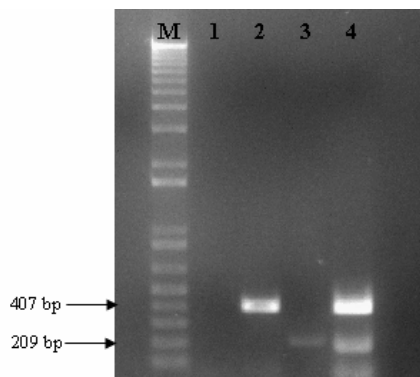
Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ vi khuẩn trữ ở -80°C . Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: mẫu phát hiện *E. ictaluri*; giếng 3: mẫu phát hiện *A. hydrophila*; giếng 4: mẫu phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila*.

Kết quả điện di sản phẩm mPCR với hàm lượng DNA từ 1pg đến 100ng chiết tách từ vi khuẩn cho thấy qui trình có thể phát hiện được *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đều ở hàm lượng DNA là 1ng (Giếng 4) (hình 2). Độ nhạy của qui trình thấp hơn so thí nghiệm xác định độ nhạy của Panangala và ctv (2007). Nhóm tác giả cũng thực qui trình mPCR phát hiện đồng thời *Flavobacterium columnare*, *E. ictaluri* và *A. hydrophila* với kết quả giới hạn phát hiện thấp nhất là 20 pg DNA. Sự sai khác này có thể do phương pháp chiết tách DNA được sử dụng khác nhau. DNA chiết tách bằng kit (Panangala và ctv, 2007) tinh sạch hơn qui trình phenol chloroform (Taggart và ctv, 1992). Tuy nhiên chiết tách DNA bằng kit sẽ tốn nhiều chi phí hơn.



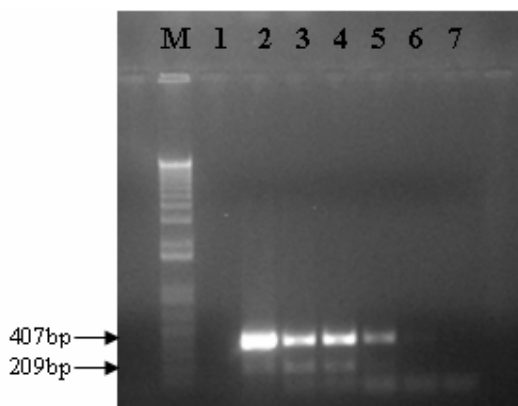
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. Ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: 100 ng DNA; giếng 3: 10 ng DNA; giếng 4: 1 ng DNA; giếng 5: 100 pg DNA; giếng 6: 10 pg DNA; giếng 7: 1 pg DNA.

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ thận cá tra được thực hiện gồm 1X dung dịch đệm 10X; 1.5mM MgCl_2 ; 200 μM dNTPs; 1.5U Taq DNA polymerase; 0.4 μM mồi xuôi (EiFd-1); 0.4 μM mồi ngược (EiRs); 0.4 μM mồi xuôi (AeroFd); 0.4 μM mồi ngược (AeroRs) và 20ng mẫu DNA chiết tách từ vi khuẩn *E. ictaluri* và *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. Kết quả điện di sản phẩm PCR ở giếng 4 hiện đồng thời 2 vạch 407 bp và 209 bp (hình 3).

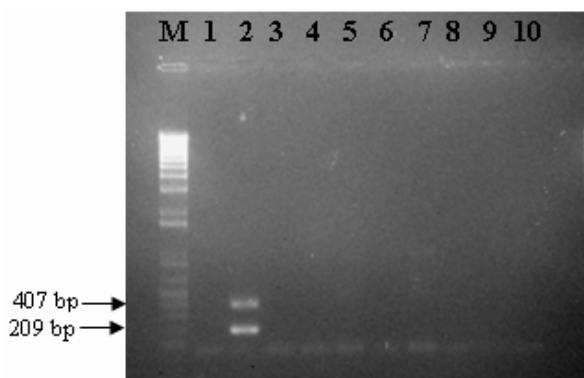


Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ thận. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); Giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: mẫu phát hiện *E. ictaluri*; giếng 3: mẫu phát hiện *A. hydrophila*; giếng 4: mẫu phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. Hydrophila*.

Kết quả PCR xác định độ nhạy của qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ thận cho thấy qui trình có độ nhạy rất cao, giới hạn phát hiện thấp nhất đối với *E. ictaluri* là 100 pg (giếng 6) và đối với *A. hydrophila* là 1 ng (giếng 5) (Hình 4).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ thận cá. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); Giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: 1000 ng DNA; giếng 3: 100 ng DNA; giếng 4: 10 ng DNA; giếng 5: 1 ng DNA; giếng 6: 100 pg DNA; giếng 7: 10 pg DNA.



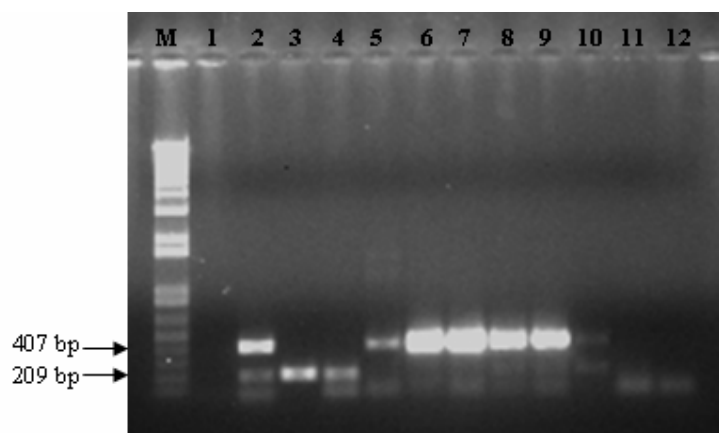
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định tính đặc hiệu của qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ các loài vi khuẩn thường gặp trong thủy sản. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: *E. ictaluri* và *A. hydrophila*; giếng 3: *Vibrio alginolyticus* LMG 4409; giếng 4: *V. anguillarum* LMG 4437; giếng 5: *V. harveyi*; giếng 6: *A. carviae* C-V-TN-A-4-O-1; giếng 7: *Pseudomonas putida* C-V-VL-A-3-S-4; giếng 8: *Escherichia coli* LMG 8223; giếng 9: *Bacillus subtilis* II-A3-9S; giếng 10: *Aeromonas sp* C-V-VL-A-4-O-1.

Kết quả xác định tính đặc hiệu của qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* với các chủng vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* LMG 4409, *V. anguillarum* LMG 4437, *V. harveyi*, *A. carviae* C-V-TN-A-4-O-1, *Pseudomonas putida* C-V-VL-A-3-S-4, *Escherichia coli* LMG 8223, *Bacillus subtilis* II-A3-9S và *Aeromonas sp* C-V-VL-A-4-O-1 cho thấy chỉ có mẫu *E. ictaluri* và *A. hydrophila* cho kết quả hiện vạch ở vị trí 407 bp và 209 bp (giếng 2 hình 5). Tất cả các mẫu còn lại (giếng 3-10) đều không xuất hiện vạch chứng tỏ

cặp mồi EiFd-1, EiRs đặc hiệu với gen 16S rRNA của vi khuẩn *E. ictaluri* và cặp mồi AeroFd, AeroRs đặc hiệu với gen Aerolysin của vi khuẩn *A. hydrophila*. Panangala và ctv (2007) cũng cho thấy qui trình mPCR phát hiện đồng thời *F. columnare*, *E. ictaluri* và *A. hydrophila* đặc hiệu với các chủng vi khuẩn *V. anguillarum*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. caviae*, *E. tarda*, *E. hoshinae*, *F. psychrophilum*, *Escherichia coli*, *Yersinia ruckeri*, *Enterobacter sakazakii*, *Streptococcus iniae* và *S. agalactiae*.

Ứng dụng qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ thận

Mẫu sử dụng để thử nghiệm khả năng ứng dụng của của qui trình là mẫu được thu từ thí nghiệm gây cảm nhiễm bao gồm cảm nhiễm đơn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và cảm nhiễm đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên 10 mẫu cá được trình bày ở hình 6 cho thấy qui trình có ứng dụng tốt để phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra.



Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR ứng dụng qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ thận 10 mẫu cá gây cảm nhiễm. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); Giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: đối chứng dương (DNA chiết tách từ thận cá dương tính với *E. ictaluri* và *A. hydrophila*); giếng 3: mẫu cảm nhiễm (tiêm *A. hydrophila*); giếng 4: mẫu cảm nhiễm (tiêm *A. hydrophila*); giếng 5: mẫu cảm nhiễm (tiêm *E. ictaluri*); giếng 6: mẫu cảm nhiễm (tiêm *E. ictaluri*); giếng 7: mẫu cảm nhiễm (tiêm *E. ictaluri*); giếng 8: mẫu cảm nhiễm (tiêm *E. ictaluri* + *A. hydrophila*); giếng 9: mẫu cảm nhiễm (tiêm *E. ictaluri* + *A. hydrophila*); giếng 10: mẫu cảm nhiễm (tiêm *E. ictaluri* + *A. hydrophila*); giếng 11: mẫu cảm nhiễm (tiêm NaCl); giếng 12: mẫu cảm nhiễm (tiêm NaCl).

KẾT LUẬN

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ thận cá tra với thời gian chẩn đoán ngắn, độ nhạy của qui trình cao và đặc hiệu với *E. ictaluri* và *A. hydrophila* giúp phát hiện và phân biệt mẫu nhiễm hai loài vi khuẩn này với các loài vi khuẩn phổ biến trong thủy sản. Qui trình có ứng dụng tốt trong chẩn đoán *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trên cá tra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bartie, K., D. T. H. Oanh, G. Huys, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, N. T. Phuong and A. Teale, 2006. Ứng dụng REP-PCR và PFGE để định tít vi khuẩn kháng chloramphenicol

phân lập tại các trại nuôi thủy sản ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. Tạp chí công nghệ sinh học. 4 (1): 31-40.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy. 2009. Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Kỷ yếu hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương. 2009. 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.

Nguyễn Hà Giang, Trương Quỳnh Như, Lê Hữu Thôi và Đặng Thị Hoàng Oanh. 2009. Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Hội nghị nuôi trồng thủy sản toàn quốc. Đại học Nông lâm, Thành phố Hồ Chí Minh.

Panangala V. S., Craig A. Shoemaker, Vicky L. Van Santen, Kevin Dybvig, Phillip H. Klesius, 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacteria fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. Disease of aquatic organisms 74: 199-208.

Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Podohl and A. Ferguson, 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolate from salmonid fishs. Journal of fish Biology 40: 963-965.