

## PHÁT HIỆN VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT PCR

Trần Thị Thanh Huyền<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Trung<sup>2</sup>, Trương Nam Hải<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Hiện nay, cá Tra và cá Basa bị nhiễm bệnh đốm trắng nội tạng đang trở nên phổ biến ở Việt nam. Vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* là một trong các tác nhân gây ra bệnh gan thận mù ở cá Tra. Tác nhân này đe dọa nghiêm trọng đến sự phát triển bền vững và giá trị kinh tế của ngành Thủy sản. Việc phát hiện ra vi khuẩn này sớm rất có ý nghĩa quan trọng trong việc quản lý bệnh cá Tra không chỉ ở Việt Nam mà cả ở các nước trên thế giới. Bài báo này đề cập đến phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) khuếch đại DNA với độ đặc hiệu và độ nhạy cao được ứng dụng để phát hiện nhanh vi khuẩn *E. ictaluri*. Các mẫu được thiết kế để khuếch đại đoạn gen *eip18* có kích thước khoảng 480 bp trong DNA genome của *E. ictaluri*. Các kết quả nhận được chỉ ra rằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi thiết kế đã khuếch đại đoạn DNA có kích thước khoảng 480 bp từ DNA genome vi khuẩn *E. ictaluri*, nhưng không khuếch đại đối với DNA genome của vi khuẩn *E. tadar* và một số tác nhân gây bệnh khác như: *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*. Kỹ thuật này có khả năng khuếch đại đoạn DNA khi mật độ *E. ictaluri* khoảng 3 cfu/ml. Như vậy, có thể sử dụng kỹ thuật PCR khuếch đại gen *eip18* để phát hiện nhanh *E. ictaluri*.

**Từ khóa:** cá Tra, *Edwardsiella ictaluri*, *eip18*, PCR

### MỞ ĐẦU

Cho đến nay, một số tác giả công bố các kết quả nghiên cứu về bệnh gan thận mù trên cá Tra và cá Basa đã kết luận rằng vi khuẩn *E. ictaluri* là một trong những tác nhân gây ra bệnh mù gen ở cá Tra và cá Basa Việt Nam. Vi khuẩn *E. ictaluri* (thuộc họ *Enterbacteriaceae*) là vi khuẩn gram âm, hình que, không sinh bào tử, yếm khí tùy tiện, phản ứng catalase dương tính, oxidase âm tính. Hiện nay, bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella* đã và đang gây thiệt hại lớn cho người nuôi cá thâm canh ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Tỷ lệ cá chết khi bị nhiễm bệnh gan thận mù có thể lên đến 90%. Việc tăng diện tích, mức độ thâm canh cao, không có biện pháp xử lý nguồn nước ao nuôi trước khi thải ra môi trường làm lây lan nhanh mầm bệnh. Việc phát hiện sớm cá, môi trường nước bị nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* là vô cùng cần thiết để từ đó có hướng xử lý kịp thời, tránh gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho người nuôi trồng thủy sản.

Thông thường, vi khuẩn có thể được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy và xác định các đặc tính sinh hóa trong phòng thí nghiệm nhưng phải mất ít nhất 3 tuần để kết luận tác nhân gây bệnh (Panangala et al., 2005). Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy (2009) công bố một quy trình PCR khuếch đại một đoạn DNA 407 bp nằm trong vùng 16S

rRNA để phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*. Do đó, việc phát hiện vi khuẩn này bằng kỹ thuật PCR được mô tả sau đây sẽ rất nhanh chóng và đặc hiệu, cho phép người nuôi cá có thể có hướng xử lý kịp thời khi phát hiện cá bị nhiễm khuẩn. Phản ứng khuếch đại gene (PCR) là một phương pháp cơ bản, nhanh và nhạy để phát hiện ra vi sinh vật trong mẫu bệnh phẩm cá và mẫu nước môi trường bị nhiễm mầm bệnh dựa trên việc khuếch đại gen *eip18* đặc trưng của vi khuẩn *E. ictaluri* bằng cặp mồi đặc hiệu.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Vi khuẩn *E. ictaluri* ATCC 33202, *E. tarda* ATCC 15469 mua từ Bảo tàng giống chuẩn của Đức. Vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập dựa vào phương pháp nuôi cấy truyền thống và các đặc điểm sinh hóa kí hiệu là E5, E7, E40 được sử dụng để làm đối chứng vi sinh *E. ictaluri* chủng Việt Nam. Vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *Proteus mirabilis* là chủng chủng thí nghiệm đang được sử dụng tại Phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ sinh học và một chủng E10 (được để làm đối chứng âm trong thí nghiệm xác định độ đặc hiệu của kỹ thuật).

**Phương pháp****Tách chiết DNA genome của vi khuẩn**

Vi khuẩn sau khi được nuôi trong môi trường BHIB ở 28°C trong 18 h, thu sinh khối. Chuyển 1,5 ml dịch nuôi cấy vào ống Eppendorf và ly tâm 5000 vòng/phút trong 7 phút thu tế bào. Tế bào được hòa tan trong 0,5 ml đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), ly tâm thu tế bào (Krystal *et al.*, 2003). Bổ sung 0,5 ml TE, 3 µl RNase, 2 µl lysozyme, trộn đều và để nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thêm 30 µl SDS 10%, 3 µl proteinase K trộn đều ở 37°C trong 60 phút. Bổ sung 180 µl 5 M NaCl, ủ 65°C trong 10 phút, ly tâm thu dịch nổi ở trên. Chiết DNA hai lần bằng hỗn hợp Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1), ly tâm thu pha trên. DNA genome được tủa trong 70% cồn ở -20°C trong 30 phút. Ly tâm thu tủa và làm khô, sau đó bổ sung 40 µl TE để hòa tan DNA genome. Điện di kiểm tra sản phẩm DNA genome sau tách chiết trên gel 0,8% agarose.

**Thu mẫu bệnh phẩm**

20 mẫu cá Tra có biểu hiện bệnh gan thận mủ, 20 mẫu cá bệnh trắng gan trắng mang và 10 mẫu cá khỏe mạnh thu trực tiếp từ các ao nuôi thuộc tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ, Đồng Tháp, An Giang được mổ trực tiếp trong điều kiện vô trùng. Các mẫu gan, thận, tỷ tạng có xuất hiện đốm trắng được bảo quản trong ethanol 100%.

25 mg mẫu mô nội tạng cá được bổ sung vào 200 µl dung dịch Chelex 5%, ủ ở 95°C trong 5 phút. 1 µl dịch sau ly tâm 8000 vòng/phút được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR.

**Phân lập vi khuẩn trên môi trường đặc hiệu**

Môi trường EIM (Bacto - tripton: 10 g; Cao men: 10 g; Phenylalanin: 1,25 g; Feryamonium citrat: 1,2 g; NaCl: 5 g; Bromo thymol Blue: 0.03g; Thạch: 17 g; H<sub>2</sub>O: 990 ml; pH : 7) đặc hiệu cho vi khuẩn *E. ictaluri* được bổ sung tím kết tinh, bacitracin... để hạn chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật không mong muốn. Sau 48 h ủ ở 30°C khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* sẽ có màu xanh, tròn đều, đường kính 0,2 - 0,5 mm.

**Kỹ thuật PCR**

Để có thể khuếch đại đoạn gen *eip18* bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi dựa trên trình tự đoạn gen *eip18* trên genome của vi khuẩn *E. ictaluri*. Cặp mồi được thiết kế có trình tự như sau:

Mồi xuôi: 5' gat ggg gaa tct act gat gc 3'; Mồi ngược: 5' taa gac tcc agc cct cgg 3'.

Thành phần phản ứng PCR (25 µl): 10x Taq polymerase buffer (Fermentas), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM dNTP, 100 µM mồi xuôi, 100 µM mồi ngược, 0,5 IU Taq polymerase, DNA, dH<sub>2</sub>O cho đến 25 µl.

Chu trình nhiệt: (1) Biến tính DNA ở nhiệt độ 94°C trong 4 phút. (2) Khuếch đại gen *eip18* trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: Biến tính sợi khuôn DNA ở 94°C trong 30 giây. Bước 2: Mồi bắt cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 45°C trong 40 giây. Bước 3: Tổng hợp kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 50 giây. (3) Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 5 phút 30 giây để tạo sợi DNA hoàn chỉnh và ủ mẫu ở 22°C.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN****Tách DNA genome của vi khuẩn *E. ictaluri***

Từ 1,5 ml dung dịch nuôi cấy đã tách được 40 µl dung dịch DNA genome với nồng độ 94 ng/ml, tỉ lệ giá trị OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> là 2,1. Sau khi xác định được nồng độ bằng phương pháp nano-drop, DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%. Kết hợp kết quả trên điện di đồ với kết quả xác định nồng độ và độ sạch của DNA thông qua phép đo độ hấp thụ quang cho thấy rằng DNA genome của chúng tôi tách chiết được là rất sạch, nồng độ cao, cần phải được pha loãng ra nhiều lần để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Thông thường tỉ số giá trị OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> lớn hơn giá trị 1,8 thì sản phẩm DNA được cho là sạch, không bị lẫn protein và các tạp chất khác. Sản phẩm DNA genome này được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm nhằm khuếch đại gen *eip18* đặc trưng của vi khuẩn *E. ictaluri*.

**Phân lập gen *eip18* của vi khuẩn *E. ictaluri* bằng kỹ thuật PCR**

Kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi được thiết kế đặc hiệu để khuếch đại gen *eip18* trên khuôn là DNA genome của vi khuẩn *E. ictaluri* tạo thành sản phẩm PCR là băng DNA có kích thước là 480 bp. Kích thước này tương ứng với kích thước băng DNA là sản phẩm PCR bằng cặp mồi đặc hiệu khuếch đại gen *eip18* từ DNA genome của vi khuẩn *E. ictaluri*. Do vậy có thể khẳng định được rằng chúng tôi đã khuếch đại thành công đoạn gen *eip18* bằng cặp mồi mà chúng tôi đã thiết kế (không dẫn hình).

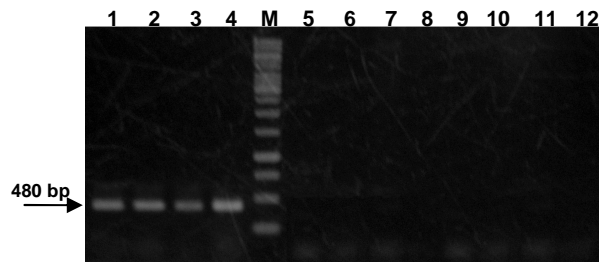
Trong thí nghiệm này chúng tôi đã sử dụng DNA genome tách chiết từ chủng *E. tarda* ATCC 15469 để làm đối chứng âm. Bởi vì, *E. tarda* và *E. ictaluri* đã được báo cáo là hai tác nhân gây bệnh trên cá da trơn gây thiệt hại lớn trong ngành nuôi trồng thủy sản ở nhiều nước trên thế giới (Panangala *et al.*, 2005; Nagla *et al.*, 2005). Giới hạn vật chủ của *E. ictaluri* hẹp hơn *E. tarda*. Trong phòng thí nghiệm hoàn toàn có thể phân biệt hai loại vi khuẩn này dựa vào các đặc tính sinh hóa song phải cần ít nhất 21 ngày mới cho kết quả. Sử dụng phương pháp PCR như mô tả ở đây kết hợp với cặp mồi đặc hiệu có thể xác định nhanh, chính xác tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *E. ictaluri*. Kết quả cho thấy, chúng tôi đã thiết kế được đoạn mồi đặc hiệu khuếch đại gen *eip18* đặc trưng của chủng vi khuẩn *E. ictaluri*.

### Độ đặc hiệu của kĩ thuật PCR

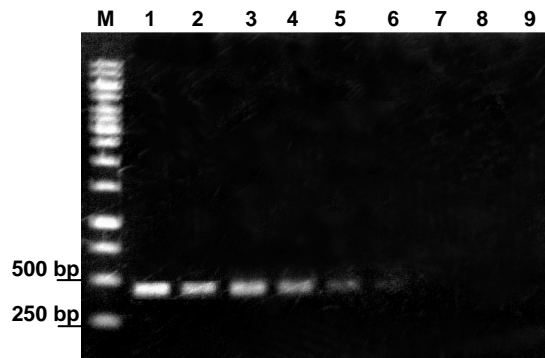
Để xác định độ đặc hiệu của kĩ thuật PCR sử dụng để phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*, chúng tôi đã tiến hành phản ứng PCR khuếch đại gen *eip18* dùng cặp mồi như đã thiết kế đối với DNA khuôn từ 03 chủng *E. ictaluri* phân lập ở Việt Nam, các DNA

khuôn từ các vi khuẩn khác như *E. tarda*, *E. coli* ATCC 11105, *Staphylococcus*, *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *Proteus*. Sản phẩm phản ứng được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,2% (Hình 1).

Kết quả ở hình 1 cho thấy, ở các đường chạy số 5 đến số 12 tương ứng với DNA khuôn từ các chủng vi khuẩn *E. tarda*, *E. coli* ATCC 11105, *Staphylococcus*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* ATCC 13076, *Proteus* đều không xuất hiện bất kỳ băng DNA nào trên các đường chạy tương ứng. Trong khi đó, sản phẩm PCR trên DNA khuôn từ các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (E5, E7, E40) đã xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 480 bp, tương ứng kích thước băng DNA ở DNA khuôn từ vi khuẩn *E. ictaluri* ATCC 33202. Điều đó chứng tỏ cặp mồi mà chúng tôi đã thiết kế khuếch đại đặc hiệu đoạn DNA kích thước 480 bp trên gen *eip18* từ DNA genome của vi khuẩn *E. ictaluri*. Các kết quả thu được giúp chúng tôi khẳng định rằng cặp mồi được thiết kế trong kĩ thuật PCR phát hiện *E. ictaluri* là đặc hiệu đối với đoạn gen *eip18* của chủng *E. ictaluri*.



Hình 1. Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen *eip18* của chủng *E. ictaluri*. 1: DNA khuôn từ chủng E5; 2: E7; 3: E40; 4: *E. ictaluri* ATCC 33202; 5: E10; 6: *E. tarda* ATCC 15469; 7: *E. coli* ATCC 11105; 8: Đối chứng âm không bổ sung DNA; 9: *S. Typhimurium*; 10: *S. Enteritidis* ATCC 13076; 11: *Staphylococcus aureus*; 12: *P. mirabilis*. M: DNA marker 1 kb (Fermentas).

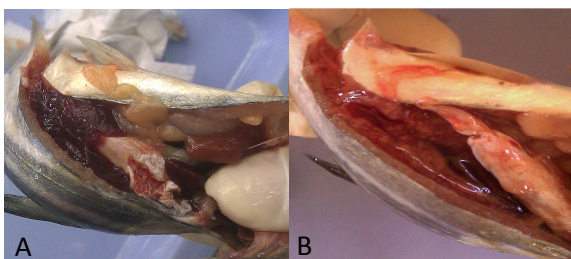


Hình 2. Sản phẩm PCR khuếch đại gen *eip18* của *E. ictaluri* đối với nồng độ DNA khuôn giảm dần. 1: nồng độ DNA khuôn là  $9,4 \times 10^9$  fg/ml; 2:  $9,4 \times 10^8$  fg/ml; 3:  $9,4 \times 10^7$  fg/ml; 4:  $9,4 \times 10^6$  fg/ml; 5:  $9,4 \times 10^5$  fg/ml; 6:  $9,4 \times 10^4$  fg/ml; 7: 9,4 fg/ml; 8:  $9,4 \times 10^{-1}$ ; 9: Đối chứng âm không bổ sung DNA khuôn; M: DNA Marker 1 kb (Fermentas).

### Độ nhạy của phản ứng PCR nhân gen *eip18*

Để xác định giới hạn phát hiện của kỹ thuật PCR khuếch đại gen *eip18*, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với nồng độ DNA khuôn giảm đi 10 lần cho mỗi thí nghiệm. Nồng độ DNA genome ban đầu được xác định thông qua đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 260 nm là 94 ng/μl. Các thí nghiệm được tiến hành với DNA khuôn giảm dần nồng độ theo cấp số 10, từ  $10^{-1}$  đến  $10^{-9}$ . Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 2 cho thấy, ở các đường chạy tương ứng với nồng độ DNA khuôn là  $9,4 \times 10^7$ ,  $9,4 \times 10^5$ ,  $9,4 \times 10^3$ ,  $9,4 \times 10^2$ . Đường chạy tương ứng với DNA khuôn là  $9,4 \times 10$  fg/ml vẫn thấy xuất hiện một băng. Với các giá trị nồng độ thấp hơn từ 9,4 fg/ml thì không phát hiện thấy băng DNA được khuếch đại. Như vậy, phương pháp PCR khuếch đại được gen *eip18* từ DNA genome của *E. ictaluri* với nồng độ 94 fg/ml. Số liệu này có thể quy đổi tương ứng với 25 cfu/ml theo cách tính của Yeh và đồng tác giả (2005) là 76 fg DNA genome của vi khuẩn *E. ictaluri* tương đương với 20 cfu) (Yeh *et al.*, 2005).

### Thử nghiệm



**Hình 3.** Giải phẫu thu mẫu mô cá Tra khỏe mạnh (A) và cá Tra bị bệnh gan thận mũ (B).

Tổng số 50 mẫu mô cá được dùng để tách DNA cho phản ứng PCR đồng thời vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm cũng được phân lập trên môi trường đặc hiệu EIM để so sánh.

Kết quả cho thấy, với các con cá có biểu hiện bệnh gan mũ rõ ràng, mô nội tạng xuất hiện các nốt trắng trên cả 3 cơ quan gan, thận, tỷ tạng thì khi kết quả phân lập trên môi trường đặc trưng EIM chỉ đạt 60% trong khi đó nếu sử dụng mẫu mô bệnh đó để tiến hành PCR bằng cặp mồi đặc trưng có thể phát hiện đến 95% dương tính với *E. ictaluri*. Nguyên nhân là do vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh sinh trưởng rất yếu và đòi hỏi môi trường có hàm lượng dinh dưỡng khá cao. Còn trong môi trường đặc hiệu cho vi khuẩn này thì ngoài các thành phần hữu cơ còn có các chất ức chế sinh trưởng của vi khuẩn Gram dương và nấm nên cũng hạn chế sự sinh trưởng của

*E. ictaluri*. Do đó, hầu hết các trường hợp mẫu mô không quan sát thấy nốt trắng hoặc số lượng nốt trắng nhỏ, ít thì việc phân lập vi khuẩn trên môi trường đặc hiệu thực sự không cho kết quả mong muốn.

Phát hiện 1 trong số 20 mẫu cá bệnh trắng gan trắng mang dương tính với vi khuẩn *E. ictaluri*, điều này được xác nhận lại vì trong số những mẫu cá này có 1 mẫu cá trắng gan trắng mang thu được tại phòng thí nghiệm khoa Bệnh học Thủy sản, trường Đại học Cần thơ theo quan sát ban đầu bị nghi ngờ nhiễm khuẩn *E. ictaluri* với các biểu hiện xuất huyết và hoại tử thận. Hoàn toàn không có phản ứng dương tính nào với các mẫu cá khỏe mạnh.

**Bảng 1.** Kết quả xác định vi khuẩn *E. ictaluri* bằng phương pháp PCR và phương pháp nuôi cấy.

Mẫu	Số mẫu	Số lượng mẫu dương tính	
		PCR	Nuôi cấy
Bệnh gan mũ	20	19	12
Trắng gan trắng mang	20	1	0
Cá khỏe	10	0	0

Như vậy, phương pháp PCR cho kết quả chính xác hơn, nhanh hơn chỉ trong khoảng 3 h ngay cả khi trong mẫu có lẫn vi khuẩn khác hoặc mô tế bào chủ. Độ nhạy của phản ứng PCR cao hơn nhiều lần so với các phương pháp vi sinh truyền thống.

### KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi được thiết kế trên đoạn gen *eip18* của vi khuẩn *E. ictaluri* có thể phát hiện được vi khuẩn *E. ictaluri*.

Cặp mồi được thiết kế có độ đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện bằng phương pháp PCR với cặp mồi này ở nồng độ DNA khuôn là 94 fg/ml cho thấy có thể ứng dụng phương pháp này để xác định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *E. ictaluri* một cách nhanh chóng và hiệu quả. Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn nhanh vi khuẩn *E. ictaluri* có thể được áp dụng trên các mẫu mô cá bệnh với mức độ chính xác lên tới 95% so với phương pháp nuôi cấy thông thường (60%).

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP để phát hiện bệnh gan thận mũ trên cá Tra. Công trình

có sử dụng Trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen (thuộc Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đặng Thị Hoàng Oanh, Đặng Thụy Mai Thy (2009), Nghiên cứu quy trình CPR chẩn đoán vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên thân cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2009: 289-292.

Krystal DB, Hemant MC, Roxanna S, Kevin RU (2003), Detection of *Edwardsiella* infections in *Opsanus tau* by

Polymerase Chain Reaction. *Biol Bull* 205: 235-236.

Nagla FGA, Safinaz GM, Khalil RH, Soliman MK (2005), Study on *Edwardsiella* infection in *Oreochromis niloticus*, *Egypt J Aquatic Res* 31: 462-471.

Panangala VS, Vansanten VL, Shoemaker CA, McNulty ST, Arias CR., Klesius PH (2005), InTra- and interspecific phenotypic characteristics of fish-pathogenic *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*, *Aquacult Res* 37: 49-60.

Yeh H-Y, Shoemaker CA, Klesius PH (2005) Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *J Microbiol Method* 63: 36-44.

### DETECTION OF *EDWARDSIELLA ICTALURI* INFECTION IN TRA CATFISH IN VIETNAM BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Tran Thi Thanh Huyen<sup>1</sup>, Nguyen Thi Trung<sup>2</sup>, Truong Nam Hai<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Hanoi University of Science, Hanoi National University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, VAST

#### SUMMARY

Nowadays, Tra and Basa catfish infected with lesion white diseases internal organs are widespread in Viet Nam, one of prevalent pathogenic agents is *Edwardsiella ictaluri*. It is a constant threat to the sustainability and economic viability of aquaculture. Early diagnosis plays a vital role in management of Tra catfish disease not only in Vietnam but also in all over the world. In this report, the polymerase chain reaction that amplifies DNA with high specificity and rapidity was evaluated for rapid detection of *E. ictaluri*. The primers were designed specifically to recognize the *eip18* gene of this pathogen, which band size is 480 bp. The results showed that DNA of *E. ictaluri* could be amplified distinctly by using these primers. These primers amplified *eip18* gene of *E. ictaluri*, yielding a product of 480 bp, and did not amplify *E. tadar* and other pathogenic agents such as *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*. In addition, this technique could amplify this gene with high specificity and sensitivity (3 cfu/ml). Thus, we concluded that the PCR could potentially be used for rapid diagnosis *E. ictaluri*.

**Keywords:** *Edwardsiella ictaluri*, *eip18* gene, PCR, Tra catfish

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562790; Fax: 84-4-37562790; E-mail: [mhai@vnn.vn](mailto:mhai@vnn.vn)