

PHÁT HIỆN VI KHUẨN *PASTEURELLA MULTOCIDA* GÂY BỆNH TỤ HUYẾT TRÙNG Ở CỪU PHAN RANG BẰNG KỸ THUẬT PCR

Nguyễn Thị Kim Cúc¹, Nguyễn Hữu Thọ¹, Nguyễn Thị Diễm¹, Nguyễn Thị Oanh¹, Hồ Thị Xuân Túy¹,
Bùi Văn Lợi², Nguyễn Xuân Huy², Lê Công Tuấn³, Nguyễn Văn Phú^{1*}

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phú Thượng, TP Huế, Thừa Thiên Huế

² Đại học Huế, Số 3 Lê Lợi, TP Huế, Thừa Thiên Huế

³ Trường Đại học khoa học, Đại học Huế, Số 77 Nguyễn Huệ, TP Huế, Thừa Thiên Huế

* Tác giả liên hệ Nguyễn Văn Phú <nguyenvanphu@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 25-08-2022; Ngày chấp nhận đăng: 12-12-2022)

Tóm tắt. Tụ huyết trùng là một bệnh truyền nhiễm có thể gây thiệt hại nghiêm trọng cho chăn nuôi gia súc, gia cầm nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát triển phương pháp PCR có độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác cao để phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *P. multocida*, một trong những tác nhân gây bệnh tụ huyết trùng trên cừu Phan Rang. Gen KMT1 của vi khuẩn *P. multocida* được nhân lên bằng cặp mồi đặc hiệu FKMT1/RKMT1 ở nồng độ khoảng 10⁴ bản sao của plasmid mang gen đích. Phản ứng PCR không bị ảnh hưởng khi có mặt DNA của một số vi khuẩn Gram âm khác như *E. coli* hay *M. haemolytica*. Đặc biệt, với phương pháp PCR, chúng tôi đã phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *P. multocida* từ mẫu DNA thô thu được bằng xử lý mẫu vi khuẩn/mẫu dịch ngoáy mũi của cừu nghi nhiễm bệnh trong đệm TE chứa 0,1% TritonX-100 mà không cần tinh sạch DNA tổng số. Đây là nghiên cứu đầu tiên công bố một phương pháp xác định sự có mặt của *P. multocida* trên cừu Phan Rang và là cơ sở để xây dựng quy trình chẩn đoán hiệu quả nhằm góp phần kiểm soát bệnh tụ huyết trùng trên đối tượng này.

Từ khóa: cừu Phan Rang, tụ huyết trùng, *P. multocida*, KMT1

Detecting *pasteurella multocida* causing pasteurellosis in Phan Rang sheep with PCR method

Nguyen Thi Kim Cuc¹, Nguyen Huu Tho¹, Nguyen Thi Diem¹, Nguyen Thi Oanh¹, Ho Thi Xuan Tuy¹,
Bui Van Loi², Nguyen Xuan Huy², Le Cong Tuan³, Nguyen Van Phu^{1*}

¹ Institute of Biotechnology, Hue University, Provincial Road 10, Phu Thuong, Hue City, Thua Thien Hue

² Hue University, 3 Le Loi, TP Huế, Hue City, Thua Thien Hue

³ Hue University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue City, Thua Thien Hue

* Correspondence to Nguyen Van Phu <nguyenvanphu@hueuni.edu.vn>

(Received: 25 August 2022; Accepted: 12 December 2022)

Abstract. Pasteurellosis is an infectious disease causing severe damage to livestock and poultry since it leads to animals' death, including sheep of all ages. In this study, we developed a sensitive, specific and accurate PCR method for detecting *P. multocida* in Phan Rang sheep using FKMT1/RKMT1 primers targeted to the KMT1 gene of *P. multocida*. The PCR-based method was used to detect the KMT1 gene

from 10^4 copies of the KMT1-bearing plasmid. The method's specificity was demonstrated by the successful amplification of KMT1 from the mixture containing other DNA of Gram-negative bacteria, such as *E. coli* or *M. haemolytica*. In particular, with the present method, we successfully detected *P. multocida* with crude DNA obtained from *P. multocida* or nasal swabs of pasteurellosis-suspected sheep samples treated in a TE buffer containing 0.1% TritonX-100. This is the first report on using a PCR-based method for detecting *P. multocida* from Phan Rang sheep, and it can serve as the basis for an effective procedure to diagnose pasteurellosis in sheep.

Keywords: Phan Rang sheep, pasteurellosis, *P. multocida*, KMT1

1 Mở đầu

Các bệnh hô hấp được xem là nguyên nhân chính gây thiệt hại cho ngành chăn nuôi gia súc, đặc biệt là đối với các động vật nhai lại [1]. *Pasteurella multocida* được xem là tác nhân chính gây nên các bệnh liên quan tới hô hấp [2]. Ngoài ra, *P. multocida* cũng được cho là có khả năng gây ra nhiễm trùng huyết, xuất huyết ở một số động vật, kể cả động vật nhai lại cỡ nhỏ như dê, cừu [3]. Để phát hiện ra vi khuẩn này trên các đối tượng vật nuôi bị bệnh hiện nay đã có một số công bố trên thế giới đề cập tới các phương pháp như phân lập, kiểm tra các đặc điểm hoá sinh, xác định tuýp huyết thanh, hay xét nghiệm PCR [4]. Ở Việt Nam, từ những năm 2000 vi khuẩn *P. multocida* gây bệnh ở gia cầm đã được xác nhận bằng phương pháp REP-PCR (repetitive extragenic palindromic sequence PCR) và PFGE (pulsed field gel electrophoresis) [5], ngoài ra bộ tiêu chuẩn quốc gia (TCVN) về quy trình chẩn đoán tụ huyết trùng trâu bò (TCVN 8400-14: 2011); tụ huyết trùng gia cầm (TCVN 8400-31:2015) do Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố đã cung cấp những thông tin hỗ trợ chẩn đoán lâm sàng, lấy mẫu bệnh phẩm với các phương pháp chẩn đoán bao gồm kiểm tra hình thái vi khuẩn từ các mẫu bệnh phẩm tới phân lập, nuôi cấy và giám định vi khuẩn bằng hình thái và một số đặc tính hoá sinh. Trên cơ sở đó, một số nghiên cứu đã sử dụng đặc điểm hình thái, hoá sinh để xác định *P. multocida* trên gia cầm [6] hay kỹ thuật PCR để xác định vi khuẩn *P. multocida* trên lợn [7]. Gần đây, một số gen độc lực của vi khuẩn

P. multocida, phân lập trên lợn, bò, cừu đã được xác định bằng kỹ thuật PCR [7–9]. Bên cạnh các gen liên quan tới độc lực hay định type vi khuẩn thì gen KMT1 được một số tác giả cho là gen xuất hiện ở hầu hết các chủng *P. multocida* phân lập từ lợn, dê, cừu, trâu, bò nên đã được xem như một chỉ thị để phát hiện sự có mặt của vi khuẩn này [9–12].

Cừu Phan Rang là giống cừu được nuôi chủ yếu ở Ninh Thuận, Việt Nam. Giống cừu này có khả năng chịu hạn rất tốt nhưng các nghiên cứu liên quan tới chúng còn rất hạn chế, đặc biệt là các nghiên cứu liên quan tới chẩn đoán bệnh, ví dụ như tụ huyết trùng hay một số bệnh thường gặp ở cừu. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục đích đưa ra một phương pháp phát hiện chính xác và hiệu quả vi khuẩn *P. multocida* trên cừu Phan Rang.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

DNA tổng số của chủng vi khuẩn *P. multocida* và *Mannheimia haemolytica* đối chứng cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ sinh học, Phân viện Thú y miền Trung (Km4 Đường 2/4, Vĩnh Hải, Nha Trang, Khánh Hòa); DNA tổng số từ *Escherichia coli* ATCC 25922 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm công nghệ vi sinh, Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên; và các chủng *P. multocida* cung cấp từ đề tài khoa học và công nghệ cấp bộ thuộc chương trình khoa học công nghệ cấp bộ thực hiện tại Đại học Huế từ năm 2021, mã số CT-2021-01-DHH-02.

2.2 Thời gian và địa điểm

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế từ tháng 4/2021-6/2022.

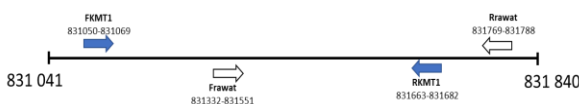
2.3 Phương pháp

Phương pháp thiết kế mồi

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp so sánh trình tự của 9 gen KMT1 đã công bố trên ngân hàng gen bằng phần mềm ClustalW2 để chọn trình tự có độ tương đồng cao nhất trong 9 trình tự phân tích (các trình tự tham khảo trên GenBank lần lượt là MF417603, MF776876, KY825088, KY825087, KY825086, MH068783, KX348143, KP222299, KP212385); sau đó, trình tự này được sử dụng làm khuôn mẫu để thiết kế mồi bằng phần mềm SnapGene. Cặp mồi FKMT1/RKMT1 dùng để nhân đoạn gen có kích thước khoảng 630 nucleotide. Ngoài ra, nghiên cứu này còn sử dụng cặp mồi đã công bố của Rawat [11], và kết hợp giữa mồi của Rawat với mồi thiết kế trong nghiên cứu này. Thông tin về trình tự các cặp mồi và vị trí bắt mồi được trình bày chi tiết ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Thông tin về trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Trình tự mồi	Kích thước sp (bp)	Nhiệt độ (°C) / Thời gian gắn mồi (s)	Tài liệu tham khảo
Frawat: 3' GCTGTAAACGAACTCGCCAC 5'	460	55°C/60s	Rawat, 2019 [11]
Rrawat: 3' ATCCGCTATTACCCAGTGG 5'			
FKMT1: 3' CCTCCGACTAACACCAAGT 5'	633	56°C/30s	Thiết kế trong nghiên cứu này
RKMT1: 3' TGGGCTTGTCGGTAGTCTTT 5'			
Frawat: 3' GCTGTAAACGAACTCGCCAC 5'	350	56°C/30s	Rawat, 2019 [11]
RKMT1: 3' TGGGCTTGTCGGTAGTCTTT 5'			Thiết kế trong nghiên cứu này
FKMT1: 3' CCTCCGACTAACACCAAGT 5'	740	55°C/30s	Thiết kế trong nghiên cứu này
Rrawat: 3' ATCCGCTATTACCCAGTGG 5'			Rawat, 2019 [11]



Hình 1. Vị trí bắt mồi của các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Phương pháp PCR

PCR được thực hiện như sau: đối với cặp mồi tham khảo của Rawat, điều kiện PCR được thực hiện theo thông tin do tác giả công bố [11]; với các cặp mồi còn lại (FKMT1/RKMT1, FRawat/RKMT1, FKMT1/ FRawat), phản ứng PCR được thực hiện tương tự nhau ở điều kiện trước biến tính (94°C trong 5 phút); tiếp theo là 30 chu kỳ PCR, mỗi chu kỳ gồm 3 bước: biến tính ở 94°C/30 giây, gắn mồi (thông tin ở bảng 1, nhiệt độ gắn mồi được kiểm tra bằng phần mềm IDT (<https://sg.idtdna.com>)) và kéo dài ở 72°C/30 giây, cuối cùng kết thúc ở 72°C trong 10 phút; sau đó bảo quản ở 4°C trong máy PCR MJ mini thermal cycler (Bio-Rad, Mỹ). Sản phẩm PCR sau đó được chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5% có bổ sung 1X thuốc nhuộm Redsafe (Intron, Hàn Quốc) và chạy trong đệm TAE ở điều kiện 100 V/30 phút, kết quả được quan sát và chụp hình trên máy Mulpid one led Illuminator (Nippon, Đức).

Phương pháp tạo dòng

Sản phẩm PCR từ cặp mồi FKMT1/RKMT1 đã được tạo dòng vào vector pSpark TA (Canvax Biotech) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, đầu tiên sản phẩm PCR được tinh sạch bằng MinElute PCR purification kit (Qiagen), trộn với vector và ủ ở 22°C trong 1 giờ trước khi chuyển vào vi khuẩn khả biến *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt [13]. Vi khuẩn sau đó được trải trên đĩa có bổ sung Ampicillin (50 µg/mL) và X-Gal (20 µg/mL), ủ ở 37°C qua đêm và chọn các khuẩn lạc có màu trắng để sàng lọc các dòng tái tổ hợp bằng phương pháp PCR trực tiếp trên khuẩn lạc.

Phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc

Phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc được thực hiện theo hướng dẫn của Woodman [14]; cụ thể, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa kháng sinh được chấm vào tấm rồi miết đầu tăm vào đáy các ống PCR có chứa các thành phần phản ứng PCR trước khi cho vào máy chạy ở các điều

kiện tương tự với điều kiện cho cặp môi FKMT1/RKMT1 đã trình bày ở phần phương pháp PCR.

Phương pháp đánh giá độ nhạy của phương pháp chẩn đoán

Plasmid mang gen KMT1 đã được đo nồng độ (ng) và tính lượng bản sao theo công thức (<https://www.idtdna.com>):

$$\text{Số lượng bản sao} = \frac{X(\text{ng}) * 6.0221 * 10^{23} (\text{phân tử/mol})}{N * 660(\text{g/mol}) * 1 * 10^9 (\text{ng/g})}$$

trong đó, X là nồng độ DNA cần xác định số lượng bản sao, N là kích thước của plasmid. Sau đó plasmid được pha loãng thành các nồng độ 10^8 - 10^2 bản sao/ μL và dùng 1 μL cho mỗi phản ứng PCR, dùng cặp môi FKMT1/RKMT1 với điều kiện tương tự đã được trình bày trong phần phương pháp PCR.

Phương pháp đánh giá độ đặc hiệu

DNA tổng số của *P. multocida*, *E. coli* và *M. haemolytica* đã được pha loãng tới nồng độ 50 ng/ μL và sử dụng riêng rẽ hoặc trộn lẫn với nhau theo tỉ lệ 1:1 để làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với điều kiện đã được trình bày ở phần phương pháp PCR.

Phương pháp chẩn đoán nhanh với mẫu hiện trường

Vi khuẩn *P. multocida* ở mật độ 10^7 CFU/mL đã được li tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút, thu cặn tế bào và hoà tan trong 100 μL nước cất vô trùng, đệm TE (thành phần của bộ Kit MinElute PCR purification), hoặc đệm TE có bổ sung 0,1% Triton X-100 (Sigma) và ủ ở 99°C trong 10 phút (Stuart block heater, UK), sau đó thu dịch nổi chứa DNA thô bằng cách li tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút và sử dụng 1 μL cho mỗi phản ứng PCR. Đối với mẫu ngoáy mũi cừu, sau khi thu thập mẫu tại Ninh Thuận, các que ngoáy mũi được bảo quản trong 2 mL môi trường vận chuyển mẫu, bảo quản

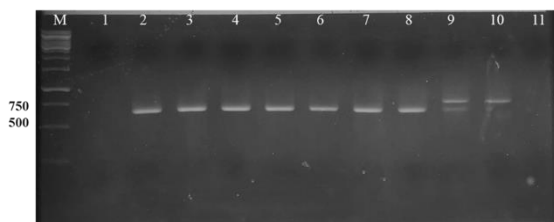
trong hộp vận chuyển môi trường chứa đá khô chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ. Mẫu sau đó được đảo trộn bằng máy vortex và lấy 0,5 mL môi trường vận chuyển mẫu cho vào 4,5 mL môi trường BHI để làm giàu với điều kiện lắc 150 vòng/phút trong 12 giờ ở nhiệt độ 37°C, theo quy trình làm giàu vi khuẩn đã công bố [15, 16], thu tế bào và hoà tan vào nước, đệm TE hay TE có 0,1% Triton X-100 giống quy trình làm đối với vi khuẩn *P. multocida* thuần khiết.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Nhân gen KMT1 từ vi khuẩn *P. multocida*

Các cặp môi Frawat/ Rrawat; FKMT1/RKMT1; Frawat/ RKMT1; FKMT1/Frawat đã được sử dụng để nhân gen KMT1 từ các mẫu đối chứng hay mẫu phân lập cung cấp từ đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số CT-2021-01-DHH-02. Với điều kiện tại phòng thí nghiệm, cặp môi Frawat/Rrawat không nhân được gen KMT1 từ DNA của vi khuẩn *P. multocida* được cung cấp bởi Phân viện Thú y miền Trung (Hình 2, giếng số 1) và một số mẫu phân lập (kết quả không trình bày trong bài báo này), trong khi cặp môi FKMT1/RKMT1 đã nhân được trình tự KMT1 từ chúng đối chứng (2) và các chủng phân lập (Hình 2, giếng số 3-8). Đáng lưu ý là tổ hợp 4 môi Frawat/Rrawat và FKMT1/RKMT1 cho ra 2 sản phẩm PCR với kích thước khác nhau (Hình 2, giếng số 9); dựa vào kích thước hai sản phẩm này, chúng tôi dự đoán chúng là sản phẩm khuếch đại tạo ra do cặp môi FKMT1/RKMT1 (630 bp) và FKMT1/Rrawat (740 bp). Để khẳng định điều này, chúng tôi đã kiểm tra khả năng nhân gen KMT1 của cặp môi FKMT1/Rrawat (Hình 2, giếng số 10) và Frawat/RKMT1 (Hình 2, giếng số 11), kết quả cho thấy rằng chỉ cặp môi FKMT1/Rrawat nhân được gen có kích thước xấp xỉ 750 bp trong khi cặp môi còn lại không nhân được sản phẩm. Kết quả của giếng số 1 và giếng số 11 gợi ý rằng rất có thể môi Frawat có một số trình tự nucleotide khác với

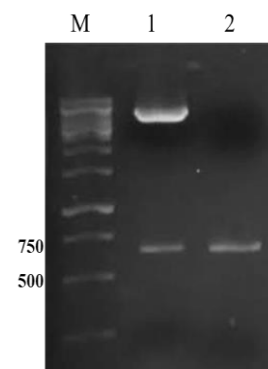
trình tự trên gen KMT1 của các chủng nghiên cứu nên dẫn tới tình trạng không bắt cặp hiệu quả và nhân được đoạn gen kỳ vọng (Hình 2). Một số nghiên cứu khác ở Việt Nam có sử dụng cặp mồi tham khảo giống nghiên cứu này (Frawat/Rrawat) với các chủng *P. multocida* phân lập từ lợn thì thấy rằng tất cả các chủng đều xuất hiện băng DNA với kích thước mong đợi [7, 12]. Tuy nhiên, có rất ít các công bố liên quan tới gen KMT1 ở cừu và do lần đầu tiên chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nên việc không xuất hiện băng DNA khi sử dụng cặp mồi Frawat/Rrawat đã được phân tích thêm bằng phương pháp giải trình tự. Sản phẩm PCR của cặp mồi FKMT1/Rrawat được gửi đi giải trình tự và đăng ký trên ngân hàng gen với mã số OP245117. Dựa vào kết quả này, chúng tôi thấy rằng có sự thay đổi một số nucleotide tại vị trí gắn mồi của mồi Frawat, điều này có thể là nguyên nhân dẫn tới sự gắn mồi không hiệu quả và ức chế sự nhân lên của gen KMT1 bằng cặp mồi này ở điều kiện tối ưu mà tài liệu đã công bố. Hiện tượng này trước đó đã được đưa ra bởi nhóm nghiên cứu của Krol (2011) [17] khi nhấn mạnh rằng vị trí địa lý và vật chủ khác nhau có thể ảnh hưởng tới khả năng nhân đặc hiệu gen KMT. Đối với cặp mồi thiết kế trong nghiên cứu này chúng tôi đã nhân hiệu quả gen KMT1 của *P. multocida* phân lập từ cừu Phan Rang.



Hình 2. Nhân gen KMT1 trong các chủng *P. multocida*. M: thang DNA; 1, 2: Cặp mồi Frawat/Rrawat, FKMT1/RKMT1 với DNA tổng số của *P. multocida* cung cấp từ Phân viện Thú y miền Trung; 3-8: cặp mồi FKMT1/RKMT1 với các chủng *P. multocida* phân lập từ cừu Phan Rang; 9, 10, 11: Frawat/Rrawat và FKMT1/RKMT1; FKMT1/Rrawat; Frawat/RKMT1 với DNA tổng số của *P. multocida* cung cấp từ Phân viện Thú y miền Trung.

3.2 Tạo dòng gen KMT1

Đoạn gen KMT1 nhân lên bởi cặp mồi FKMT1/RKMT1 đã được tinh sạch đưa vào vector pSpark TA (Canvax Biotech) để tạo vector tái tổ hợp và chuyển vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau khi chọn lọc được dòng mang gen bằng phương pháp PCR khuẩn lạc, tiến hành nuôi cấy khuẩn lạc trong môi trường LB qua đêm và thu sinh khối để tách plasmid nhằm kiểm tra sự có mặt của gen KMT1 trong vector pSpark-KMT1 bằng cách cắt với enzyme *Eco*RI, tạo ra hai đoạn cắt khoảng 3000 bp và 640 bp (Hình 3), kết quả cho thấy đoạn gen KMT1 đã được đưa vào trong plasmid. Plasmid pSpark-KMT1 sau đó được sử dụng để đánh giá độ nhạy của cặp mồi FKMT1/RKMT1 khi phát hiện sự có mặt của gen KMT1.

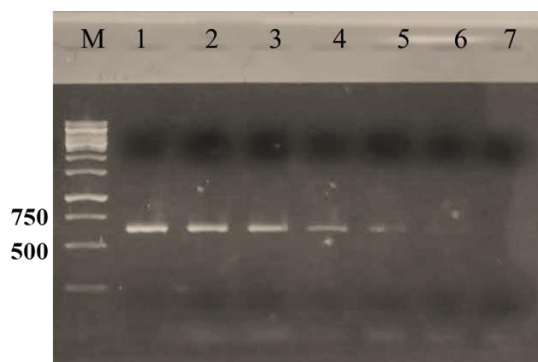


Hình 3. Tạo dòng gen KMT1. M: thang DNA, 1: vector pSpark-KMT1 cắt bởi enzyme *Eco*RI, 2: KMT1 nhân bởi cặp mồi FKMT1/RKMT1 từ khuẩn lạc được chọn.

3.3 Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp phát hiện *P. multocida* bằng gen KMT1

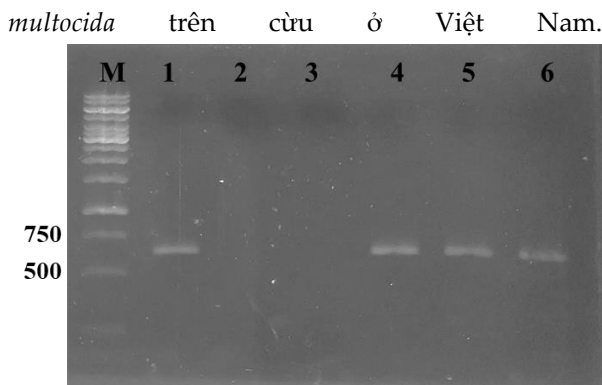
Nồng độ của plasmid Spark-KMT1 đã được xác định bằng máy Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), quy đổi nồng độ plasmid từ nanogram sang số lượng copy theo công thức tính đã trình bày ở phần phương pháp và pha loãng plasmid trong dải từ 10^8 - 10^2 bản sao/ μ L, sau đó sử dụng làm khuôn mẫu để đánh giá độ nhạy của phương pháp chẩn đoán PCR dùng cặp mồi FKMT1/RKMT1. Với điều kiện PCR dành cho cặp mồi FKMT1/RKMT1

và sử dụng plasmid Spark-KMT1 ở nồng độ từ 10^8 - 10^2 bản sao/phản ứng, chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp chẩn đoán này có thể phát hiện ra sự có mặt của gen KMT1 ở nồng độ 10^4 bản sao/phản ứng (Hình 4, giếng số 5), ở nồng độ 10^3 bản sao/phản ứng thì sự xuất hiện của gen KMT1 rất mờ, chỉ nhìn thấy trực tiếp trên gel dưới ánh sáng huỳnh quang kích thích (Hình 4, giếng số 6) và ở nồng độ 10^2 bản sao/phản ứng thì không quan sát thấy băng DNA xuất hiện (Hình 4, giếng số 7). Kết quả này gợi ý rằng cặp mồi FKMT1/RKMT1 do chúng tôi thiết kế trong nghiên cứu này có thể phát hiện ra sự có mặt của gen KMT1 ở nồng độ khoảng 10^4 bản sao/phản ứng. Việc đánh giá độ nhạy bằng số lượng bản sao DNA thường được thực hiện bằng phương pháp real-time PCR, một phương pháp chẩn đoán dựa vào tín hiệu huỳnh quang của mỗi chu kỳ phản ứng, tuy nhiên nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã có công bố so sánh phương pháp PCR và real-time PCR cho phát hiện virus Sacbrood gây bệnh trên ong mật và thấy rằng phương pháp real-time PCR có thể phát hiện virus ở nồng độ khoảng 10^2 bản sao bằng tín hiệu huỳnh quang nhưng phương pháp PCR chỉ có thể quan sát thấy băng DNA trên gel khi dùng khuôn ở nồng độ 10^3 bản sao/phản ứng [18]. Như vậy, độ nhạy của phương pháp PCR trong phát hiện gen KMT1 có thể coi là tương đương với độ nhạy của phương pháp PCR trong phát hiện số bản sao của gen mã hoá enzyme polymerase ở sacbrood virus. Đối với một số tác giả khác khi sử dụng phương pháp PCR để đánh giá độ nhạy khi phát hiện sự có mặt của một số gen, thường đánh giá dựa vào tỉ lệ phần trăm phát hiện mẫu dương tính trên tổng số mẫu được đưa vào phân tích nên khó có thể phân tích sự tương quan độ nhạy với kết quả trong nghiên cứu này [19, 20].



Hình 4. Độ nhạy của phương pháp chẩn đoán phát hiện *P. multocida* bằng gen KMT1. M: thang DNA, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: vector pSpark-KMT1 ở các nồng độ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 bản sao/phản ứng.

Khả năng phát hiện đặc hiệu sự có mặt của vi khuẩn *P. multocida* trong các mẫu được thực hiện trong phòng thí nghiệm bằng cách sử dụng DNA của một số vi khuẩn Gram âm khác nhau gồm *E. coli* và *M. haemolytica*. Kết quả ghi nhận khi trộn DNA của các chủng thử nghiệm với tỷ lệ 1:1 cho thấy rằng độ đặc hiệu của cặp mồi KMT1 trong phòng thí nghiệm là 100%, không phát hiện các băng DNA không đặc hiệu (Hình 5). Điều này gợi ý rằng cặp mồi KMT1 có khả năng bắt cặp đặc hiệu với các trình tự của gen *kmt* nằm trên DNA của *P. multocida* phân lập từ cừu nhưng không có những trình tự này trên DNA của *E. coli* hay *M. haemolytica*. Trước đó, Krol và cộng sự (2011) [17] đã thành công khi nhân đoạn gen kích thước 168 bp để xác định các mẫu thực địa nhiễm *P. multocida* với cặp mồi KMTJB-for/KMTJB-rev và gợi ý rằng *kmt* là một vùng gen bảo thủ trên hệ gen của *P. multocida*, nhưng những khác biệt di truyền do vị trí địa lý hay vật chủ khác cũng có những ảnh hưởng nhất định tới việc nhân hiệu quả gen này. Ahbed và cộng sự (2020) [21] cũng gợi ý rằng cặp mồi KMT1F/R có thể dùng để xác định đặc hiệu *P. multocida*. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cung cấp thêm bằng chứng để khẳng định *kmt* là gen bảo thủ ở *P. multocida* và cặp mồi FKMT1/RKMT1 có thể được sử dụng như một cặp mồi tiềm năng dùng để phát hiện hiệu quả sự có mặt của *P.*

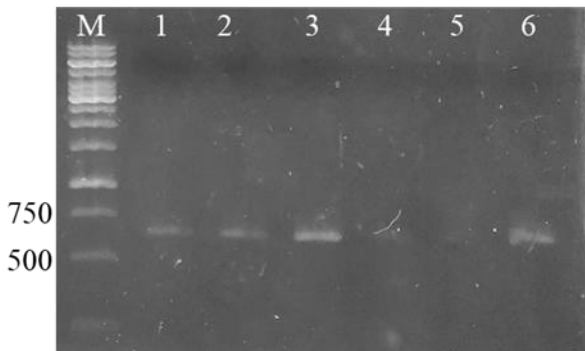


Hình 5. Độ đặc hiệu của phương pháp chẩn đoán phát hiện *P. multocida* bằng gen KMT1. M: thang DNA, 1: DNA tổng số của *P. multocida*; 2. DNA tổng số của *M. haemolytica*; 3. DNA tổng số của *E. coli*; 4, 5, 6. Lần lượt là DNA tổng số của *P. multocida* với *M. haemolytica*, *E. coli*, hỗn hợp *M. haemolytica* và *E. coli*.

Các thí nghiệm thực hiện trên đã sử dụng DNA tinh sạch làm khuôn mẫu để phát hiện sự có mặt của *P. multocida*, tuy nhiên để giảm thời gian nuôi cấy, tách chiết và tinh sạch DNA, việc nghiên cứu sử dụng DNA thô, thu được trực tiếp từ quá trình phá vỡ tế bào bằng nhiệt kết hợp với chất hoạt động bề mặt đã được thử nghiệm. Vi khuẩn sau khi nuôi cấy hoặc dịch ngoáy mũi của cừu bệnh được xử lý ở nhiệt độ 99°C trong 10 phút trong nước, đệm TE hoặc đệm TE có bổ sung 0,1% Triton X-100 được dùng làm khuôn mẫu trực tiếp để thực hiện phản ứng PCR. Đối với mẫu vi khuẩn nuôi cấy thuần chủng, thì dù xử lý nhiệt trong nước, đệm TE hay đệm TE có bổ sung 0,1% Triton X-100 đều có thể dùng làm khuôn mẫu để nhân thành công gen KMT1 (Hình 6, giếng số 1, 2, 3), tuy nhiên bằng DNA từ vi khuẩn xử lý trong đệm TE có bổ sung 0,1% Triton X-100 sáng hơn các băng khác (Hình 6, giếng số 3). Điều này gợi ý việc bổ sung 0,1% Triton X-100 hỗ trợ hiệu quả cho việc giải phóng DNA từ tế bào trong quá trình xử lý nhiệt. Đối với mẫu sử dụng trực tiếp từ dịch ngoáy mũi cừu thì việc xử lý mẫu trong nước và đệm TE cho hiệu quả nhân gen rất thấp, chỉ xuất hiện các băng mờ (Hình 6, giếng số 4 và 5) nhưng xử lý trong đệm TE có bổ sung 0,1% Triton X-100 thì cho hiệu quả nhân gen tốt hơn (Hình 6, giếng số 6). Hiệu quả nhân gen khi xử lý mẫu ngoáy mũi cừu trong nước hoặc đệm TE

thấp hơn có thể là do nguyên nhân lượng vi khuẩn có trong mẫu thấp, hoặc cũng có thể do dịch thu được có nhiều thành phần khác nhau nên hạn chế sự tác động của nhiệt lên vi khuẩn dẫn tới việc khó giải phóng DNA. Các công bố trước đây liên quan tới việc sử dụng thành công DNA từ quá trình phá vỡ mô/tế bào không qua quá trình xử lý tinh sạch làm khuôn mẫu đã cho thấy tế bào vi khuẩn có thể cho trực tiếp vào phản ứng PCR hoặc sử dụng một số chất hoạt động bề mặt như Triton X hay các chất hỗ trợ nghiền cơ học như bột thủy tinh để phá vỡ tế bào [14, 22, 23]. Cụ thể, nhóm nghiên cứu của Liu và cộng sự (1995) [22] đã khuyếch đại thành công gen *K-ras* từ mô ruột người khi bổ sung 0,4% Triton X-100 vào đệm PCR và thực hiện biến tính trong 20 phút trước khi thực hiện các chu kỳ PCR như bình thường, hay nhóm nghiên cứu của Woodman (2016) [14] cũng cho trực tiếp vi khuẩn vào phản ứng PCR để thực hiện PCR khuẩn lạc mà không cần kéo dài bước biến tính. Một nhóm nghiên cứu khác của Radha (2013) [23] đã nghiên cứu trực tiếp các tế bào tảo với bột thủy tinh trong đệm TE và sử dụng trực tiếp dịch chiết chứa DNA làm khuôn mẫu để đánh giá đa dạng di truyền của các giống tảo. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi cũng đã có kinh nghiệm thực hiện các phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc để sàng lọc các dòng mang gen đích trong quá trình tạo dòng gen tái tổ hợp (Hình 3, giếng 2), tuy nhiên phương pháp này chúng tôi chỉ thực hiện thành công với khuẩn lạc trong phòng thí nghiệm mà không thể thực hiện được với các mẫu phân/mẫu đất/mẫu nước.... Để giải thích cho vấn đề này, chúng tôi đã đưa ra một số giả thuyết về việc trong các mẫu này có thể chứa lượng vi sinh vật phù hợp với mục đích nghiên cứu thấp trong khi lượng vi sinh vật tạp nhiễm khác cao, hoặc cũng có thể quần thể vi sinh vật trong mẫu có cấu trúc tế bào có khả năng chống chịu tốt hơn với điều kiện bất lợi so với chúng trong phòng thí nghiệm, hoặc cũng có thể chứa những thành phần có khả năng ức chế phản ứng PCR,... Vì thế, để tìm ra một phương pháp chung cho các mẫu, chúng tôi đã thử nghiệm xử lý nhiệt vi khuẩn

thuần khiết ở phòng thí nghiệm, quần thể vi khuẩn từ mẫu hiện trường với dung dịch chứa chất hoạt động bề mặt Triton X-100 ở các nồng độ khác nhau thì thấy rằng 0,1% Triton X-100 là phù hợp cho việc phá vỡ tế bào, giải phóng DNA từ mẫu vi khuẩn, thậm chí cả những mẫu mô phỏng mẫu hiện trường gồm vi khuẩn được trộn với đất hay phân hữu cơ khử trùng/không khử trùng. Dịch chứa DNA thô này có thể sử dụng từ 1-5 μL /phản ứng PCR có tổng thể tích 20 μL mà không ảnh hưởng tới kết quả phản ứng (kết quả không trình bày tại nghiên cứu này). Kết quả thực tế của chúng tôi ở hình 6 cũng cho thấy rằng việc bổ sung 0,1% Triton X-100 hỗ trợ hiệu quả hơn trong việc phá vỡ tế bào và giải phóng DNA ở cả mẫu vi khuẩn tinh khiết và mẫu vi khuẩn thu được từ dịch ngoáy mũi cừu. Các nghiên cứu tiếp theo trên các mẫu từ các nguồn khác nhau để có kích thước mẫu lớn hơn là cần thiết để khẳng định sự hiệu quả của phương pháp với các nguồn mẫu từ mô, phân, dịch hầu họng...của các đối tượng nghi nhiễm/không nhiễm.



Hình 6. Nhân nhanh gen KMT1 trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm. M: thang DNA, 1, 2, 3: vi khuẩn được xử lý trong nước, dung dịch TE, dịch TE có bổ sung 0,1% Triton X-100. 4, 5, 6: Dịch ngoáy mũi vi khuẩn xử lý trong nước, dung dịch TE, dịch TE có bổ sung 0,1% Triton X-100. Kết luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng được phương pháp PCR để phát hiện đặc hiệu vi khuẩn *P. multocida* gây bệnh trên cừu Phan Rang với cặp mồi FKTM1/RKMT1. Phương pháp của chúng tôi có khả năng phát hiện hiệu quả sự có mặt của gen KMT1 với nồng độ 10^4 bản sao. Ở điều kiện thí nghiệm, phương pháp này có khả năng phát hiện đặc hiệu gen KMT1 của *P. multocida* trong hỗn hợp với một số vi khuẩn Gram âm khác như *E. coli* và *M. haemolytica*. Đặc biệt, sử dụng phương pháp này, chúng tôi có thể phát hiện được sự có mặt của gen KMT1 trong các mẫu chứa DNA thô, không qua tách chiết, tinh sạch mà chỉ qua quá trình xử lý nhiệt với sự có mặt của chất hoạt động bề mặt Triton X-100 ở nồng độ 0,1%. Mặc dù phương pháp PCR trong nghiên cứu chẩn đoán không mới, bệnh tụ huyết trùng cũng đang dần được kiểm soát hiệu quả bằng vắc-xin nhưng việc ứng dụng của phương pháp PCR nhằm phát hiện sự có mặt của vi khuẩn này trên cừu Phan Rang chưa được thực hiện trước đó, vì vậy phương pháp này sẽ góp phần hỗ trợ kiểm soát hiệu quả bệnh tụ huyết trùng, hạn chế dịch bệnh bùng phát gây thiệt hại kinh tế cho người chăn nuôi cừu.

Hỗ trợ tài chính

Nghiên cứu này được tài trợ từ đề tài thuộc chương trình Khoa học Công nghệ cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số CT-2021-01-DHH-02.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn TS. Nguyễn Mạnh Tuấn, Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên và TS. Vũ Khắc Hùng, Phân viện Thú y Miền Trung đã cung cấp một số vật liệu nghiên cứu.

Mâu thuẫn lợi ích

Các tác giả tuyên bố không có mâu thuẫn nào liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Tài liệu tham khảo

1. Jesse FFA, Mubin HNA, Hambali IU, Mohd Lila MA, Chung ELT, Abba Y, et al. Review on clinical management involving respiratory diseases in ruminants. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2019;7(4):321-325.
2. Mohamed RA, Abdelsalam EB. A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory manheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2008;11(3):139-160.
3. Odugbo MO, Odama LE, Umoh JU, Lamorde AG. *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. *Small Ruminant Research*. 2006;66(1-3):273-277.
4. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJS. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(4):1096-1100.
5. Gunawardana GA, Townsend KM, Frost AJ. Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. *Veterinary Microbiology*. 2000;72(1-2):97-109.
6. Sa ĐC. Nghiên cứu bệnh tụ huyết trùng gà ở Sơn La, một số đặc tính của *Pasteurella multocida* phân lập được và biện pháp phòng trị [dissertation]. Hà Nội: Viện Thú y Quốc gia; 2001.
7. Vu-Khac H, Trinh TTH, Nguyen TTG, Nguyen XT, Nguyen TT. Prevalence of virulence factor, antibiotic resistance, and serotype genes of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Vietnam. *Veterinary World*. 2020;13(5):896-904.
8. Al-Maary KS, Dawoud TM, Mubarak AS, Hessain AM, Galal HM, Kabli SA, et al. Molecular characterization of the capsular antigens of *Pasteurella multocida* isolates using multiplex PCR. *Saudi journal of biological sciences*. 2017;24(2):367-370.
9. Devi LB, Bora DP, Das SK, Sharma RK, Mukherjee S, Hazarika RA. Gen độc lực của chủng *Pasteurella multocida* phân lập từ lợn Asaam. *Khoa học Kỹ thuật thú y*. 2019; XXVI(2):88-96.
10. Hassan GM, El-Feky ZA, Eissa EA, Teleb AA. Rapid diagnosis of virulent *Pasteurella multocida* isolated from farm animals with clinical manifestation of pneumonia respiratory infection using 16S rDNA and KMT1 gene. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2016;6(1):21-26.
11. Rawat N, Gilhare VR, Kushwaha KK, Hattimare DD, Khan FF, Shende RK, et al. Isolation and molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with pneumonia of goats in Chhattisgarh. *Veterinary World*. 2019;12(2):331-336.
12. Vũ KH, Trịnh TTH, Trần XH, Nguyễn TTG, Nguyễn TT. Xác định loài, kiểu giáp mô và các yếu tố độc lực của vi khuẩn *Pasteurella multocida* phân lập từ lợn. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 2021;8:149-155.
13. Thi KCN, Yoo M-S, Kim I-W, Kang M-H, Han S-H, Yoon B-S. Development of PCR detection method for sacbrood virus in honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apiculture*. 2008;23(3):177-184.
14. Woodman ME. Direct PCR of intact bacteria (colony PCR). *Current Protocols in Microbiology*. 2008.
15. Landers TF, Hoet A, Wittum TE. Swab type, moistening, and preenrichment for *Staphylococcus aureus* on environmental surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(6):2235-2236.
16. Moore MK, Cicnjak-Chubbs L, Gates RJ. A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avian and environmental samples. *Avian Diseases*. 1994;38(2):317-324.
17. Król J, Bania J, Florek M, Pliszczak-Król A, Staroniewicz Z. Polymerase chain reaction-based identification of clinically relevant pasteurellaceae isolated from cats and dogs in Poland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011;23(3):532-537.
18. Thi KCN, Yoo M-S, Kang M-H, Han S-H, Yun C-H, Yoon B-S. Development of Real-time PCR assay for the detection of sacbrood virus in honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apiculture*. 2009;24(1):15-21.
19. Ferreira MB, de-Paris F, Paiva RM, Nunes L de S. Assessment of conventional PCR and real-time PCR compared to the gold standard method for screening *Streptococcus agalactiae* in pregnant

- women. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2018;22(6):449-454.
20. Junior MS da CL, Zorzenon DCR, Dorval MEC, Pontes ERJC, Oshiro ET, Cunha R, et al. Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2013;3(1):10-15.
21. Abed AH, El-Seedy FR, Hassan HM, Nabih AM, Khalifa E, Salem SE, et al. Serotyping, genotyping and virulence genes characterization of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates recovered from pneumonic cattle calves in North Upper Egypt. *Veterinary Sciences*. 2020;7(4):174.
22. Liu YS, Thomasand RJS, Phillips WA. Single-step direct PCR amplification from solid tissues. *Nucleic Acids Research*. 1995;23(9):1640.
23. Radha S, Fathima AA, Iyappan S, Ramya M. Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. *Journal of Applied Phycology*. 2013;25:609-613.