

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN BỘ KIT PHÁT HIỆN SỚM MỘT SỐ BỆNH Ở GIA SÚC, GIA CẦM BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR (Polymerase Chain Reaction)

Hà Bích Hồng¹, Nguyễn Hải Đăng¹, Nguyễn Thị Thu Trang¹, Đỗ Văn Hiệp¹, Bùi Văn Thắng¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Bệnh truyền nhiễm được xem như là trở ngại lớn gây ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và phát triển bền vững của ngành chăn nuôi (gia súc và gia cầm). Ở Việt Nam, công tác chẩn đoán bệnh trên gia cầm chủ yếu dựa vào những triệu chứng và các vết bệnh tích ở vật chủ; hình thái, cấu tạo và hoạt tính sinh học của các tác nhân gây bệnh. Điều đó ảnh hưởng đến hiệu quả sử dụng thuốc và thuốc kháng sinh đối với những bệnh có triệu chứng tương đồng nhau. Tình trạng sử dụng thuốc và thuốc kháng sinh không hiệu quả dẫn đến bệnh không được tiêu diệt triệt để, hình thành những ổ dịch tự nhiên, và thúc đẩy tích lũy các đột biến ở các tác nhân gây bệnh. Với sự phát triển của lĩnh vực sinh học phân tử, tiêu biểu là kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) đã kéo theo hàng loạt các thành tựu khoa học mang tính ứng dụng cao. Phương pháp PCR giúp chẩn đoán sớm và nhanh những bệnh ở gia súc, gia cầm nhằm tìm ra tác nhân gây bệnh chính xác từ đó có biện pháp điều trị hiệu quả cũng như chống bùng phát dịch. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển thành công hai bộ kit phát hiện bệnh cầu trùng ở gà do ký sinh trùng *Eimeria sp.* gây ra và bệnh viêm ruột hoại tử ở lợn do vi khuẩn *Clostridium perfringens* gây nên bằng kỹ thuật PCR. Quy trình để phát hiện bệnh được tối ưu với tổng thời gian xét nghiệm là 4 giờ tính từ lúc nhận mẫu bệnh phẩm tới lúc đưa trả kết quả. Đây là một hướng ứng dụng hiệu quả của kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại vào trong thực tiễn góp phần đưa dịch vụ xét nghiệm bệnh trên gia súc, gia cầm trở nên đơn giản và phổ biến hơn.

Từ khóa: Cầu trùng, *Clostridium perfringens*, *Eimeria sp.*, Kit, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh truyền nhiễm là nguyên nhân chủ yếu làm trì trệ sự phát triển bền vững của lĩnh vực chăn nuôi; không chỉ thiệt hại về kinh tế, mà còn ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe cộng đồng. Một số bệnh truyền nhiễm gây thiệt hại ngành chăn nuôi gia cầm ở Việt Nam như: dịch cúm gia cầm (12/2003), nước ta đã phải tiêu hủy 38 triệu con tương đương với hơn 380 tỷ đồng (nhandan.com.vn/kinhte/8045602), hàng năm phải tiêu hủy hàng nghìn gia cầm do các trận dịch nhỏ, lẻ xảy ra thường xuyên rải rác khắp cả nước; hay bệnh viêm ruột hoại tử (NE), ORT (Vi khuẩn *Ornithobacterium rhinotracheale*), viêm thanh khí quản (*Gallid herpesvirus 1*), tiêu chảy (*Escherichia coli*), thương hàn (*Salmonella gallinarum*), cầu trùng (*Eimeria sp.*). Những bệnh truyền nhiễm ở gia súc nói chung và lợn nói riêng cũng gây nên những thiệt hại kinh tế do tỷ lệ chết, giảm thể trọng cộng với các chi phí liên quan đến kiểm soát phòng ngừa và điều trị. Điển hình là những trận dịch lợn tai xanh (*Arterivirus*), lở mồm long móng (*Aphthovirus*) và gần đây nhất là dịch tả lợn châu Phi (*African swine fever*

virus) đã gây thiệt hại vô cùng lớn cho ngành chăn nuôi (Đỗ Tiến Duy, 2015, 2016; Nguyễn Đình Quát, 2015). Do đó, việc phát hiện và chẩn đoán sớm bệnh khi mới nhiễm, chưa có biểu hiện lâm sàng là rất cần thiết, giúp đưa ra phác đồ điều trị bệnh đúng và kịp thời, đồng thời ngăn chặn bùng phát dịch trên quy mô lớn gây tổn thất nặng nề về kinh tế và môi trường.

Bệnh cầu trùng gà là một loại bệnh đường ruột do ký sinh trùng đơn bào thuộc giống *Eimeria* gây ra. Bệnh xảy ra ở manh tràng và ruột non, làm rối loạn tiêu hóa, ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ dinh dưỡng và trao đổi chất của vật chủ. Vật chủ giảm tăng trọng, còi cọc, chậm lớn và suy yếu, bệnh có thể dẫn đến tử vong. Ngoài ra, vật chủ còn bị suy giảm hệ miễn dịch là yếu tố cho các bệnh cơ hội xảy ra như viêm ruột hoại tử. Ký sinh trùng thuộc giống *Eimeria*, họ *Eimeriidae*, nhóm ký sinh trùng *Apicomplexans*. Cho đến nay, các nhà khoa học đã xác định được 10 loại cầu trùng trên gà, trong đó chín loại đã được xác định rõ tên, kích thước và màu sắc gồm: *E. tenella* (Railliet và Lucet, 1891); *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis* (Tyzzer, 1929); *E. necatrix*,

E. praecox (Johnson, 1930); *E. hageni* (Levine, 1938), *E. brunetti* (Levine, 1942) và *E. mivatti* (Edgar và Seibold, 1969). Theo thống kê, trong 05 chủng gây bệnh cầu trùng của giống *Eimeria* ở Việt Nam thì tần số gây bệnh của *E. tenella* là cao nhất, kế đến là *E. maxia*, *E. acervula*, *E. brunetti* và *E. mitis* (Fernandez và cộng sự, 2003; Hamidinejat và cộng sự, 2010; vjol.info/index.php/kkty/article/view/8563/7950). Bệnh cầu trùng có thể được chẩn đoán sau khi chết bởi sự hiện diện của các tổn thương đặc trưng trong đường ruột, bên cạnh đó việc chẩn đoán những vật chủ đã chết sau một giờ sẽ cho kết quả với độ tin cậy thấp (do sự thay đổi đường ruột sau khi tử vong). Chẩn đoán bằng kính hiển vi có thể phát hiện các noãn nang nhưng lại không đủ luận cứ để nhận định bệnh do *Eimeria* gây ra.

Bệnh viêm ruột hoại tử ở lợn do vi khuẩn *Clostridium perfringens* gây nên. Bệnh phổ biến ở heo con với biểu hiện viêm ruột to huyết cấp tính dữ dội cùng với phân đen hoặc có máu. Tỷ lệ heo con chết rất cao nhưng thể mãn tính vẫn tồn tại. Khi bệnh đã xuất hiện triệu chứng lâm sàng thì khó có thể chữa khỏi. Chẩn đoán bệnh tiêu chảy do *Clostridium* được thực hiện bằng xét nghiệm xác chết, xét nghiệm phết kính mẫu ruột, mô bệnh học, xét nghiệm độc tố và nuôi cấy (Wu và cộng sự, 2008; Rood và cộng sự, 1991).

Với sự phát triển của lĩnh vực sinh học phân tử, tiêu biểu là kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) đã kéo theo hàng loạt các thành tựu khoa học mang tính ứng dụng cao. Phương pháp PCR giúp chẩn đoán sớm và nhanh những bệnh ở gia súc, gia cầm nhằm tìm ra tác nhân gây bệnh chính xác từ đó có biện pháp điều trị hiệu quả cũng như chống bùng phát dịch.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp lấy mẫu bệnh phẩm

a) Thu thập mẫu:

Mẫu máu: có thể thu nhận bằng cách cắt tiết hoặc lấy máu từ vùng tĩnh mạch (dưới cánh gà).

Mẫu mô: thu nhận các mẫu nội tạng nếu quan sát thấy vết bệnh tích có trên nội tạng tương ứng với chẩn đoán lâm sàng.

Mẫu kén: tùy thuộc vào mô, cơ quan ký sinh và chu kỳ sinh sản của tác nhân gây bệnh mà ta có thể thu được.

Mẫu phân: phân được lấy bằng tăm bông tiết trùng.

b) Bảo quản mẫu:

Các ống chứa chất chống đông (EDTA) được dùng để chứa và bảo quản các mẫu máu.

Các ống chứa còn tuyệt đối được dùng bảo quản mẫu ruột và mẫu kén.

Các mẫu bệnh phẩm được bảo quản trong một thùng nhựa giữ nhiệt chứa đá khô tạo môi trường thích hợp để ức chế sự hoạt động của các enzyme có sẵn trong mẫu bệnh phẩm. Các mẫu bệnh phẩm sau đó được bảo quản trong tủ lạnh 4°C cho đến khi sử dụng.

2.2. Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm máu và ruột đều được tách chiết ADN tổng số bằng bộ Kit “*G-spin*TM Total ADN Extraction Kit” và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tách chiết ADN tổng số của mẫu kén trùng *Eimeria sp.* theo phương pháp của Saeed El-Ashram (2016).

2.3. Phương pháp nhân bản đoạn gen của tác nhân gây bệnh bằng kỹ thuật PCR

Thể tích hỗn hợp mỗi phản ứng PCR là 20µl, trong đó chứa các thành phần và nồng độ các chất tham gia phản ứng như: 2,0 µl đệm 10X Taq, 2,0 µl hỗn hợp dNTP (2,0 mM), 1,0 µl cho mỗi cặp mồi (10 µM), 0,3 µl cho 5 U/µl Taq ADN polymerase, 1 µl ADN khuôn (50 ng/µl) và H₂O cho tổng thể tích đạt là 25 µl. Chu kỳ nhiệt cho PCR: 95°C trong 5 phút; (95°C: 30 giây, 57°C - 62°C: 30 giây, 72°C: 1 phút) lặp lại 35 chu kỳ; 72°C trong 10 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Sản phẩm PCR được chạy trên gel agarose 1,5%. Nhân bản vùng gen nhân (*ITS1-rDNA*) bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi ITS1_F: 5' – AATTTAGTCCATCGCAACCCTTG – 3', ITS1_R: 5'-CGAGCGCTCTGCATACGACA – 3' (R. F. Wang và cộng sự, 1994); vùng gen ty thể (16S-rRNA) với cặp mồi 16S_F: 5' – AAAGATGGCATCATCATCAAC – 3',

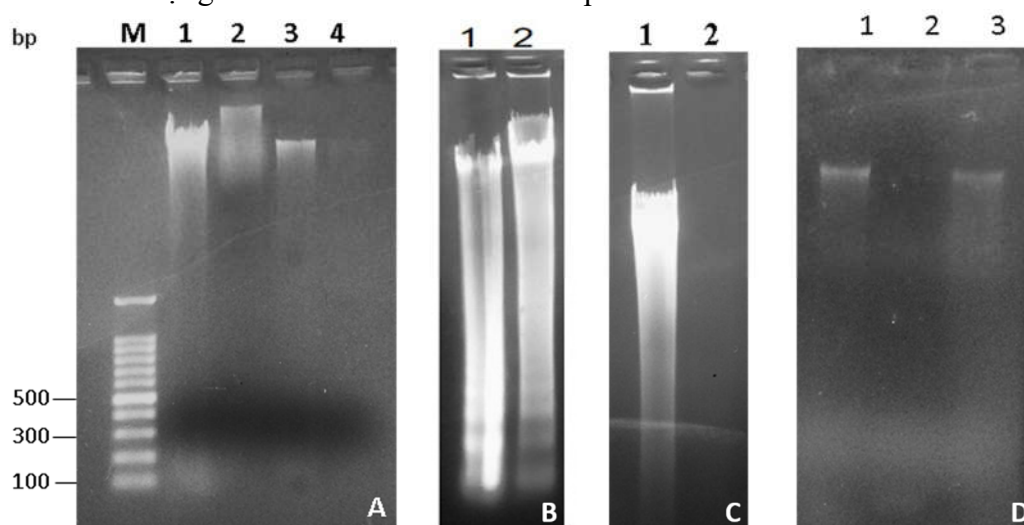
16S_R: 5' – TACCGTCATTATCTTCCCCAAA – 3' (Hamidinejat và cộng sự, 2010).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau

DNA tổng số 11 mẫu bệnh phẩm của Gà (04 mẫu máu, 02 mẫu kén và 02 mẫu ruột) và Heo (máu, phân và ruột) đã được tách chiết thể hiện trong hình 1. Đối với ADN tổng số tách chiết từ mẫu máu Gà có chất lượng và hàm lượng ADN rất khác nhau (Hình 1A). Cụ thể, mẫu số 01 có hàm lượng ADN lớn nhất so với

các mẫu còn lại và chất lượng ADN tương đối tốt thể hiện bằng một vạch sáng rộng và dài smear (do ADN bị đứt gãy thành các đoạn nhỏ) (Giếng 1, Hình 1A). Mẫu 02 và 03 có hàm lượng ADN thấp hơn hẳn so với mẫu 01, nhưng chất lượng ADN cũng tương đối tốt (Giếng 2, 3; Hình 1A). Riêng mẫu số 04 gần như không nhìn thấy vạch sáng của ADN, điều này cho thấy hiệu quả tách chiết ADN từ mẫu này chưa tốt (Giếng 4; Hình 1A) và mẫu này không được sử dụng cho bước nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả kiểm tra ADN tổng số được tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau trên gel agarose 1%. Trong đó, mẫu máu (A), mẫu kén trùng (B), mẫu ruột (C) của gà chẩn đoán bệnh cầu trùng; mẫu máu, phân và ruột của Heo chẩn đoán bệnh viêm ruột hoại tử (D)

Kết quả tách chiết ADN tổng số từ 02 mẫu kén bệnh phẩm Gà theo phương pháp của Saeed El-Ashram (2016) được thể hiện ở hình 1B. Trong đó, 02 mẫu kén được chẩn đoán là kén của cầu trùng có hàm lượng ADN tổng số tương đối lớn. Mẫu 01 có hàm lượng và chất lượng kém hơn so với mẫu 02 thể hiện bởi vạch ADN tổng số không sáng bằng vạch ADN tổng số của mẫu 02. ADN của mẫu 01 cũng bị đứt gãy nhiều hơn so với ADN của mẫu 02 (dải smear sáng hơn ở giếng 1). Mẫu 02 với hàm lượng và chất lượng ADN cao hơn, vạch ADN sáng và rõ nét cùng với đó là ADN đứt gãy đều thấp. Mặc dù hàm lượng và chất lượng ADN tách chiết không đồng đều nhưng với mục đích là khuếch đại axit nucleic bằng kỹ thuật PCR thì kết quả tách chiết này vẫn đảm bảo đủ tiêu chuẩn. Đối với những mẫu có

độ tinh sạch thấp và hàm lượng ADN cao, chúng tôi tiếp tục pha loãng đến nồng độ ADN tổng số thích hợp cho phản ứng PCR. Việc pha loãng này vừa làm tăng độ tinh sạch của mẫu ADN khuôn, vừa cung cấp lượng ADN khuôn đủ cho phản ứng PCR. Do đó có tác dụng tăng tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Cả 02 mẫu ADN tách chiết từ kén trùng đều chứa hàm lượng lớn ARN, thể hiện ở những vạch có trọng lượng phân tử thấp, nằm phía dưới của bản gel. Nguyên nhân có thể là do enzyme RNase bị mất hoạt tính và trong quá trình ủ enzyme RNase thì nhiệt độ 37°C không được đảm bảo. Tách chiết ADN từ mẫu kén sử dụng kết hợp giữa phương pháp hóa học và phương pháp nghiền cơ học bằng nitor lỏng thu được hàm lượng ADN cao nhưng ADN bị đứt gãy nhiều hơn so với tách chiết bằng phương pháp

hóa học kết hợp với phương pháp nghiền bằng hạt thủy tinh (Mohammadi và cộng sự, 2015; El-Ashram và cộng sự, 2016). Tuy nhiên, với mục đích là tách chiết ADN làm khuôn cho phản ứng PCR thì không yêu cầu chất lượng ADN quá cao. Do đó, ADN từ 02 mẫu kén trùng vẫn đảm bảo đủ tiêu chuẩn làm khuôn cho phản ứng PCR và các mẫu ADN này cần được pha loãng trước khi tiến hành PCR.

Kết quả tách chiết ADN tổng số từ 02 mẫu bệnh phẩm ruột Gà được thể hiện ở Hình 1C. Trong đó, mẫu số 01 có hàm lượng ADN tương đối lớn nhưng ADN bị đứt gãy thể hiện ở dải smear kéo dài xuống phía dưới (Giếng 1, Hình 1C). Sự đứt gãy ADN có thể là do quá trình nghiền mẫu trong ni tơ lỏng với lực mạnh và trong thời gian nghiền thì mẫu không hoàn toàn được bảo quản lạnh trong ni tơ lỏng, mà vẫn có thời điểm mẫu nghiền hết ni tơ lỏng tạo điều kiện cho enzyme ADNase trong tế bào hoạt động cắt một phần ADN thành những đoạn ngắn. Với hàm lượng ADN lớn như mẫu 01 thì cần pha loãng ít nhất 50 lần để đạt được hàm lượng ADN thích hợp cho tiến hành phản ứng PCR. Mẫu 02 không xuất hiện vạch ADN (Giếng 2, Hình 1C), điều này cho thấy hiệu quả tách ADN của mẫu 02 không đạt và mẫu này cũng không được sử dụng cho bước nghiên cứu tiếp theo.

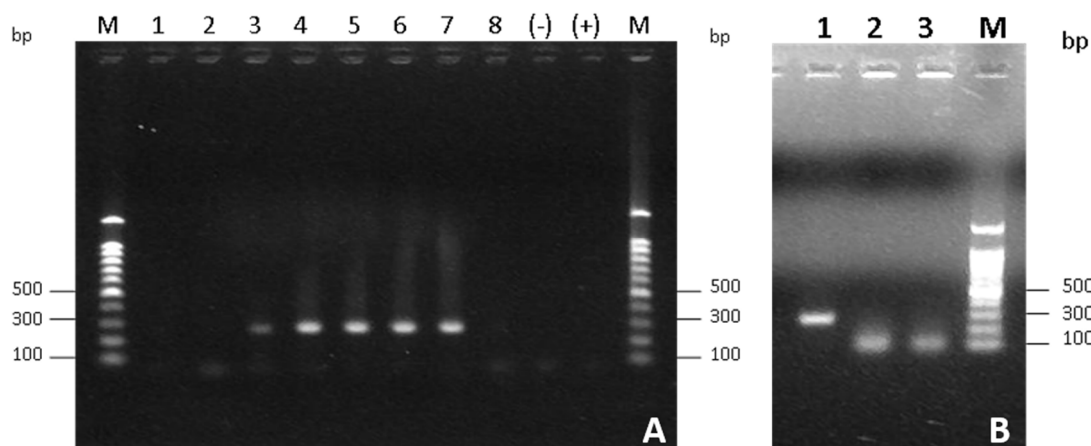
Hình 1D là kết quả tách chiết ADN tổng số từ 03 mẫu bệnh phẩm của lợn được chẩn đoán mắc bệnh viêm ruột hoại tử. ADN tách từ mẫu máu (Giếng 1, Hình 1D) và mẫu ruột (Giếng 3, Hình 1D) có chất lượng tương đối tốt, hàm lượng ADN không nhiều nhưng đủ tiêu chuẩn để làm khuôn cho phản ứng PCR. Riêng ADN tách từ mẫu phân (Giếng 2, Hình 1D) thì gần như không quan sát thấy băng sáng tuy nhiên sản phẩm tách ADN vẫn được sử dụng để tiến hành phản ứng PCR vì PCR là một kỹ thuật rất nhạy chỉ cần một lượng nhỏ ADN khuôn đã có thể nhân bản được đoạn gen mong muốn.

3.2. Kết quả nhân bản đoạn gen nhân *ITS1-rDNA* của chủng *E. tenella* gây bệnh cầu trùng ở Gà

Ribosome là một bào quan không màng có

ở cả sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân thực, có chức năng quan trọng trong quá trình dịch mã tạo thành các chuỗi polypeptide. Cấu tạo của ribosome gồm 2 tiểu đơn vị: một tiểu đơn vị nhỏ và một tiểu đơn vị lớn. Thành phần cấu tạo nên ribosome chủ yếu là RNA ribosome (rRNA) do các gen rADN trong hệ gen mã hóa. Vùng gen nhân ITS (Internal Transcribed Spacer) là vùng đệm nằm giữa các gen mã hóa cho các tiểu đơn vị khác nhau của rRNA ở sinh vật. Đến nay, các nhà khoa học đã phát hiện được 03 loại ITS khác nhau: ITS là vùng đệm giữa các gen mã hóa cho tiểu đơn vị 16S và 23S rRNA ở vi khuẩn và cổ khuẩn; ITS1 là vùng đệm giữa các gen mã hóa cho tiểu đơn vị 18S và 5.8S có ở sinh vật nhân thực; Ngoài ra, còn có vùng đệm ITS2 nằm giữa vùng mã hóa cho 2 tiểu đơn vị 5.8S và 26S trên thực vật (D. L. J. Lafontaine và cộng sự, 2001). Vùng gen ITS được cho là yếu tố tiềm năng hiệu quả nhất để phân biệt sự khác nhau của các loài trong cùng một chi/giống với vùng gen ITS có tỉ lệ cao nhất (35,94%), gen 23S (7,29%) và gen 16S (5,34%) (Man và cộng sự, 2010).

Cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu này để phát hiện bệnh cầu trùng ở Gà sẽ khuếch đại đoạn ADN thuộc vùng gen nhân (*ITS1-rADN*) đặc trưng cho phân loài cầu trùng *E. tenella* (Kawahara và cộng sự, 2008; Hamidinejat và cộng sự, 2010). Trong những loài *Eimeria* gây bệnh cầu trùng ở Gà thì loài *E. tenella* được cho là phổ biến nhất (Hamidinejat và cộng sự, 2010; vjol.info/index.php/kk-ty/article/view/8563/7950). Do đó, cặp mồi ITS1_F/R sẽ khuếch đại một đoạn ADN với kích thước 278 bp và sản phẩm PCR của cặp mồi này là căn cứ để phát hiện bệnh cầu trùng ở Gà do loài *E. tenella* gây ra. Đối với các cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR thì nhiệt độ gắn mồi là yếu tố quyết định đến sự thành công. Do đó, với mỗi cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu chúng tôi đều phải tiến hành bước tối ưu nhiệt độ gắn mồi sử dụng chương trình gradient nhiệt độ trong máy PCR.



Hình 2. Sản phẩm PCR của cặp mồi ITS1_F/R điện di trên gel agarose 1,5%. M - Marker phân tử, các nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho cặp mồi *ITS1-rDNA* (A) và nhân đoạn gen *ITS1-rDNA* ở 03 mẫu bệnh phẩm của Gà chẩn đoán bệnh cầu trùng (B)

Theo tác giả Hamidinejat và cộng sự (2010) thì nhiệt độ gắn mồi tối ưu của các cặp mồi sử dụng là 58°C hoặc 65°C. Để xác định chính xác nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho cặp mồi ITS1_F/R, chúng tôi tiến hành thí nghiệm PCR gradient với dải nhiệt độ như sau: 52°C, 53°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C và 65°C. Chúng tôi sử dụng ADN tách chiết từ kén trùng trong thí nghiệm tối ưu nhiệt độ gắn mồi. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn cặp mồi ITS-1 (Hình 2A) chỉ ra rằng nhiệt độ gắn mồi tối ưu của cặp mồi ITS1_F/R là 58°C (Giếng 4, Hình 2). Do đó, nhiệt độ 58°C được chọn để tiến hành tiếp phản ứng PCR chẩn đoán bệnh cầu trùng ở gà với 03 mẫu bệnh phẩm khác nhau (mẫu kén, máu và ruột). Có thể thấy rằng việc sử dụng các cặp mồi đã được công bố nhiều khi không thể áp dụng hoàn toàn theo quy trình của tác giả mà cần có sự xem xét và tối ưu lại vì trong kỹ thuật PCR việc sử dụng enzyme polymerase, đệm và hóa chất khác nhau cũng làm thay đổi điều kiện để phản ứng PCR thành công.

Trong tổng số 03 mẫu ADN (kén, máu và ruột) của Gà thì chỉ có mẫu kén là cho kết quả dương tính với cặp mồi ITS1_F/R. Sản phẩm PCR từ mẫu kén có kích thước 278 bp đúng như kích thước dự kiến với một băng ADN đặc hiệu duy nhất và rõ nét (Giếng 1, Hình 2B). Kích thước đoạn ADN được khuếch đại sử dụng cặp mồi ITS1_F/R ở nhiệt độ gắn mồi 58°C thu được từ mẫu kén tương đồng với kết quả của tác giả Hamidinejat và cộng sự (2010).

Điều này khẳng định việc sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện bệnh cầu trùng ở gà là rất khả thi và loài cầu trùng *E. tenella* là tác nhân gây bệnh trên mẫu gà nghiên cứu. Tuy nhiên, mẫu ADN từ máu và từ ruột lại không xuất hiện băng ADN như dự kiến (Giếng 2, 3; Hình 2B). Nguyên nhân mẫu ADN tách từ máu và ruột không xuất hiện băng ADN có thể do các mẫu bệnh phẩm đó không chứa ADN của loài *E. tenella*. Tác nhân gây bệnh không hoặc chưa xâm nhiễm vào hệ thống máu và tế bào ruột của gà bị bệnh mà chỉ tập trung ở trong ống ruột và sinh kén. Hoặc có thể là do quá trình sinh sản vô tính của cầu trùng bị bất hoạt bởi các thuốc kháng sinh đã điều trị cho Gà nên ở các mẫu máu và mô ruột không còn tồn tại tác nhân gây bệnh, còn kén trùng (noãn bào) do có thành noãn nang rắn chắc nên thuốc kháng sinh sẽ không thể tác động và ly giải noãn bào nếu không có sự kết hợp với phương pháp nghiền cơ học nhằm làm vỡ noãn nang.

Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc chẩn đoán bệnh cầu trùng trên mẫu kén trùng bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi ITS1_F/R. Chẩn đoán bệnh cầu trùng ở Gà bằng kỹ thuật PCR cho ta kết quả chính xác và nhanh chóng, quá trình chẩn đoán chỉ mất khoảng 04 giờ với quy trình tách chiết ADN tổng số và thực hiện phản ứng PCR đã được tối ưu. Điều này đặc biệt quan trọng trong việc lập kế hoạch phòng ngừa hiệu quả và chương trình kiểm soát bệnh cầu trùng. Theo phương pháp

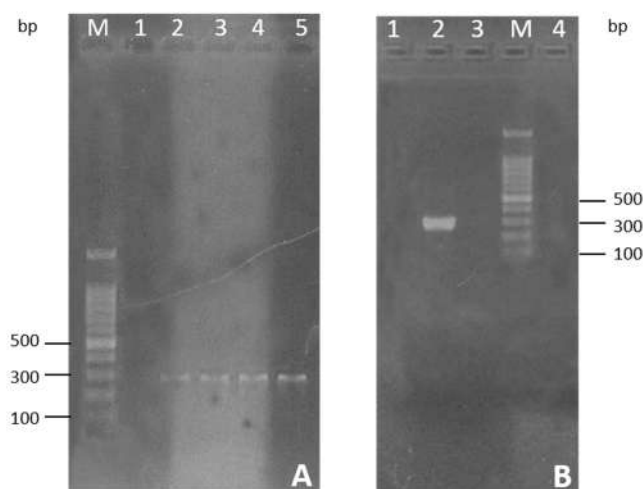
truyền thống, chẩn đoán bệnh bằng phát hiện các noãn bào *Eimeria* có trong phân gà bằng cách đo kích thước noãn bào hoặc đánh giá mức độ tổn thương bệnh lý trong ruột gà. Mặc dù kính hiển vi hoàn toàn có thể phát hiện một số mẫu phân với một phân chủng gây bệnh riêng biệt, tuy nhiên đối với những vật chủ nhiễm đồng thời cùng lúc nhiều loài như chi *Eimeria* gây bệnh trên Gà thì phương pháp chẩn đoán bằng kính hiển vi không có độ tin cậy cao do sự chồng chéo kích thước giữa các noãn bào của giống *Eimeria* cũng như vị trí nhiễm trùng trong ruột của chúng (Hamidinejat và cộng sự, 2010).

3.3. Kết quả nhân bản đoạn gen 16S - rRNA của chủng *C. perfringens* gây bệnh viêm ruột hoại tử ở lợn

Tiêu đơn vị 16S - rRNA là một trong hai tiểu phần quan trọng cấu thành nên ribosome của vi khuẩn, chúng là rất ngắn (chỉ 1.542 nucleotide). Với vai trò quan trọng trong việc dịch mã và tổng hợp nên protein của ribosome thì tính bảo thủ của nó của các loài trong sinh giới rất cao, do hầu hết các loài còn tồn tại đến nay đều là hậu duệ của các loài tổ tiên từ hơn 3,5 tỷ năm trước (Campbel và cộng sự, 2008). Tuy nhiên, gen 16S - rRNA từ vi khuẩn khác nhau sẽ có một vài nucleotide khác nhau nằm rải rác trong các trình tự, dựa vào những sai khác đó mà gen 16S-rRNA thường được sử dụng để phân biệt các loài. Bệnh viêm ruột

hoại tử ở Heo do loài vi khuẩn *C. perfringens* gây nên. Chủng vi khuẩn *C. perfringens* hiện diện ở các cơ quan tiêu hóa, rong đó chủ yếu là ruột non. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn gen 16S-rRNA để phát hiện tác nhân gây bệnh là *C. perfringens* trong các mẫu bệnh phẩm thu được từ các cá thể lợn được chẩn đoán lâm sàng.

Cặp mồi 16S_F/R được sử dụng trong nghiên cứu này chỉ bắt cặp bổ sung với một đoạn trong gen mã hóa cho 16S - rRNA của *C. perfringens* (Wang và cộng sự, 1994). Cặp mồi này sẽ khuếch đại một đoạn ADN có kích thước 279 bp và chỉ đặc hiệu đối với loài *C. perfringens*. Wang và cộng sự (1994) công bố nhiệt độ gắn mồi của cặp mồi này là 55°C, từ tham khảo đó chúng tôi chọn dải nhiệt độ (52°C, 55°C, 58°C, 60°C) để thực hiện phản ứng PCR gradient nhằm tìm ra nhiệt độ gắn mồi tối ưu nhất. Đối với ADN được tách từ mẫu máu và ruột của Heo không xuất hiện sản phẩm PCR ở tất cả các nhiệt độ. Mẫu phân tuy hàm lượng ADN tổng số rất ít, không nhìn thấy trên ảnh điện di khi kiểm tra ADN tổng số (Giếng 2, Hình 1D) thì xuất hiện sản phẩm PCR ở cả ba nhiệt độ là 55°C, 58°C, 60°C, chỉ riêng ở n 52°C thì không xuất hiện sản phẩm PCR (Hình 3A). Dựa vào độ sáng của băng sản phẩm PCR trên hình 3A cho thấy nhiệt độ gắn mồi thích hợp nhất của cặp mồi 16S_F/R là 60°C.

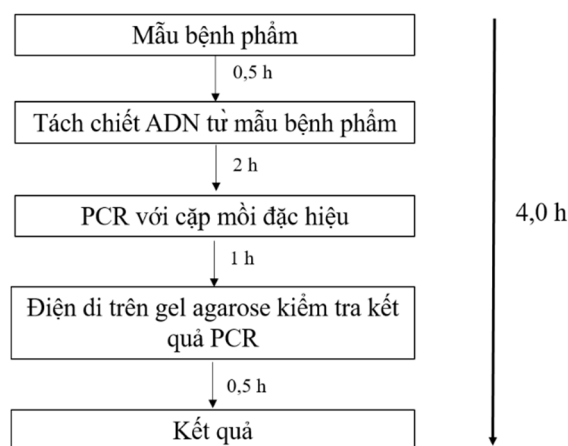


Hình 3. Sản phẩm PCR của cặp mồi 16S_F/R điện di trên gel agarose 1,5%. M- Marker phân tử; các nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho cặp mồi 16S_F/R (A) và nhân đoạn gen 16S - rRNA ở 03 mẫu bệnh phẩm của Heo chẩn đoán bệnh viêm ruột hoại tử (B)

Trong thí nghiệm tiếp theo cặp mồi 16S_F/R được sử dụng để nhân bản đoạn gen *16S-rRNA* trong 03 mẫu bệnh phẩm của Heo (mẫu máu, ruột và phân). Kết quả trên hình 3B chỉ ra rằng chỉ có mẫu phân cho kết quả dương tính với một băng ADN đặc hiệu với kích thước gần 300 bp như kích thước dự kiến (Giếng 2, Hình 3B), còn mẫu từ máu và ruột thì không xuất hiện băng sản phẩm PCR. Với kết quả này, chúng tôi có thể khẳng định mẫu phân lợn sử dụng trong nghiên cứu có nhiễm vi khuẩn *C. perfringens*. Hai mẫu còn lại là máu và ruột, tuy lấy trên cùng một con Heo nhưng lại không xuất hiện băng ADN đặc hiệu có thể là do Heo mới nhiễm khuẩn và vi khuẩn chưa xâm nhiễm vào trong máu và ruột. Một điều quan trọng là mẫu ADN tách từ phân gần như không xuất hiện khi điện di trên gel agarose 1% nhưng kết quả PCR lại khẳng định là có ADN trong mẫu tách chiết nhưng với hàm lượng quá nhỏ. Tuy nhiên hàm lượng ADN này vẫn đủ để làm khuôn cho phản ứng PCR nhân bản thành công đoạn gen *16S-rRNA* của vi khuẩn *C. perfringens*.

3.4. Quy trình phát hiện bệnh ở gia súc, gia cầm bằng phương pháp PCR

Để phát hiện được bệnh trên gia súc, gia cầm bằng phương pháp PCR cần đảm bảo các điều kiện như sau: Tách chiết được ADN tổng số từ các mẫu bệnh phẩm và tối ưu hóa phản ứng PCR nhân bản một đoạn gen đặc hiệu của tác nhân gây bệnh sử dụng cặp mồi đặc hiệu tương ứng. Do đó, một bộ kit phát hiện bệnh ở gia súc, gia cầm bao gồm: bộ hóa chất tách chiết ADN tổng số, bộ hóa chất PCR, bộ hóa chất chạy điện di. Trong nghiên cứu này, quy trình hoàn chỉnh từ khi nhận mẫu bệnh phẩm tới khi trả kết quả đã được tối ưu hóa với tổng thời gian là 4 giờ. Điều này cho thấy hiệu quả trong việc sử dụng kỹ thuật PCR trong chẩn đoán sớm bệnh ở gia súc, gia cầm.



4. KẾT LUẬN

Hai bộ kit phát hiện sớm bệnh cầu trùng ở Gà và bệnh viêm ruột hoại tử ở Heo đã được nghiên cứu thành công. Trong đó, bệnh cầu trùng ở Gà được phát hiện nhờ cặp mồi ITS1_F/R nhân bản một đoạn ADN đặc hiệu trong vùng gen nhân (*ITS1-rDNA*) chỉ có ở chủng *E. tenella*, đây cũng là chủng gây bệnh cầu trùng phổ biến ở Gà. Bệnh viêm ruột hoại tử ở Heo do vi khuẩn *C. perfringens* gây nên cũng được phát hiện sớm dựa trên mẫu phân của Heo nhiễm bệnh và sử dụng cặp mồi 16S_F/R để nhân bản một đoạn gen ty thể (*16S-rRNA*) đặc hiệu của loài vi khuẩn này. Toàn bộ quy trình chẩn đoán bệnh được tối ưu hóa với tổng thời gian từ khi nhận mẫu đến khi có kết quả là 4 giờ. Đây là cơ sở để chúng tôi tiếp tục phát triển những bộ kit phát hiện bệnh dựa trên kỹ thuật multiplex PCR (PCR đa mồi), có thể phát hiện 3 - 4 bệnh chỉ trong một phản ứng PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tiến Duy và Nguyễn Tất Toàn (2015), Phát triển quy trình multiplex PCR phát hiện mầm bệnh vi khuẩn và virus gây rối loạn hô hấp trên heo, Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y, Số 7, Tập 22, 28-36.
2. Đỗ Tiến Duy và Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Thị Thu Năm, Lê Thanh Hiền, Nguyễn Thị Phước Ninh (2016), Xác định sự hiện diện *Duck Circovirus* và *Reimerella Anatipestifer* từ các ca bệnh bại huyết trên vịt bằng kỹ thuật PCR, Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y, Số 6, 14-21.
3. Nguyễn Đình Quát, Lê Thị Tuyết Toan, Phạm Ngọc Như Ý, Nguyễn Thị Thu Năm, Nguyễn Thị Phước Ninh (2015), Chẩn đoán *Actinobacillus Pleuropneumoniae* (APP) và xác định typ 1,2,5,8 bằng

kỹ thuật PCR, Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp, Số 3, 15-20.

4. Neil A. Campbell và Jane B. Reece (2008), Sinh học tái bản lần 4 (Biology 4th Fourth Edition).

5. S. Fernandez, A.H. Pagotto, M.M. Furtado, A.M. Katsuyama, A.M. Madeira, A. Gruber (2003), A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl, Parasitology, Vol.127, No.4, 317-325.

6. F. Kawahara, K. Taira, S. Nagai, H. Onaga, M. Onuma, T. Nunoya (2008), Detection of five avian *Eimeria* species by species-specific real-time polymerase chain reaction, 10.1637/8351-050908-Reg.1.

7. Hakan Kalender (2004), Isolation of *Clostridium perfringens* from Chickens and Detection of the Alpha Toxin Gene by Polymerase Chain Reaction (PCR), Turk J Vet Anim Sci, Vol.29, No.3, 847-851.

8. H. Hamidinejat, M.R. Seifiabad Shapouri, M. Mayahi, M.P. Borujeni (2010), Characterization of *Eimeria* Species in Commercial Broilers by PCR Based on ITS1 Regions of rDNA, Iranian J Parasitol, Vol.5, No.4, 48-54.

9. J. Wu, WW. Zhang, B. Xie, M. Wu, X. Tong, J. Kalpoe, D. Zhang (2008), Detection and Toxin Typing of *Clostridium perfringens* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples by PCR, 10.1128/JCM.01324-08.

10. N. Mohammadi, B. Kazemi, G. Roozkhosh, K. Masoomi, M. T. Farghadani (2015), A simple, Inexpensive and Safe Method for DNA Extraction of Frigid and Clotted Blood Samples, Novelty in Biomedicine, Vol.3, No.3, 10.22037/nbm.v3i3.9507.

11. J. I. Rood, S. T. Cole (1991), Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*, Microbiol Rev, Vol.55, No.4, 621-648.

12. R. F. Wang, W. W. Cao, W. Franklin, W. Campbell, C. E. Cerniglia. (1994), A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food, 10.1006/mcpr.1994.1018.

13. S. M. Man, N. O. Kaakoush, S. Octavia, H. Mitchell (2010), The Internal Transcribed Spacer Region, a New Tool for Use Species Differentiation and Delineation of Systematic Relationships within the *Campylobacter* Genus, Appl Environ Microbiol, Vol.76, No.10, 3071-3081.

14. S. El-Ashram, I. Al-Nasr, X. Suo (2016), Nucleic Acid protocols: Extraction and Optimization, Biotechnol Rep (Amst), Vol.12, 33-39.

15. <https://www.nhandan.com.vn/kinhte/item/8045602-.html>.

16. www.vjol.info/index.php/kk-ty/article/view/8563/7950.

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF KITS FOR EARLY DETECTION OF SOME DISEASES IN CATTLE AND POULTRY BY PCR TECHNIQUE (Polymerase Chain Reaction)

Ha Bich Hong¹, Nguyen Hai Dang¹, Do Van Hiep¹, Nguyen Thi Thu Trang¹, Bui Van Thang¹

Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Infectious diseases are considered as the biggest obstacle affecting the growth and sustainable development of the livestock industry (cattle and poultry raising). In Vietnam, cattle and poultry disease diagnosis is mainly based on host symptoms and lesions; morphology, structure and biological activity of pathogens. That affects the efficacy of drugs and antibiotics for diseases with similar symptoms. The ineffective use of drugs and antibiotics leads to the disease not being completely eradicated, forming natural diseases outbreaks, and promoting the accumulation of mutations in pathogens. With the development of the field of molecular biology, typically the polymerase chain reaction (PCR) technique has led to a series of highly applied scientific achievements. The PCR method helps to quickly diagnose diseases in cattle and poultry in order to find the exact pathogens, thereby effectively treating as well as combating diseases outbreaks. In this study, we have successfully developed two kit for detecting coccidiosis in chickens caused by the parasite *Eimeria sp.* and necrotic enterocolitis in pigs caused by *Clostridium perfringens* using PCR technique. The procedure for detecting the disease is optimal with a total test time of 4 hours from the time of sample receipt to the time when results are returned. This is an effective application of modern molecular biology techniques in practice, contributing to simplify and popularize disease testing services for cattle and poultry.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Coccidiosis, *Eimeria sp.*, Kit, PCR.

Ngày nhận bài : 06/12/2019

Ngày phản biện : 07/02/2020

Ngày quyết định đăng : 14/02/2020