

DEVELOP THE MULTIPLEX-PCR METHOD FOR DIANOSING AND DISTINGUISHING *HETERAKIS GALLINARUM* BETWEEN *HISTOMONAS MELEAGRIDIS*

Doan Thi Thanh Huong^{1,2*}, Do Thi Roan^{1,2}, Le Thi Kim Xuyen¹, Phan Xuan Doc¹,
Nguyen Thi Thu Hien¹, Le Thi Hue¹, Luu Minh Duc¹, Le Thi Viet Ha³, Nguyen Thi Khue¹

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology -

18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay Dist, Hanoi City, Vietnam

²Academy of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology -

18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay Dist, Hanoi City, Vietnam

³Vietnam University of Traditional Medicine - 2 Tran Phu, Mo Lao Ward, Ha Dong Dist, Hanoi City, Vietnam

Received: 10/02/2025

Revised: 27/02/2025; Accepted: 14/03/2025

ABSTRACT

Objective: This study aims to develop a multiplex-PCR method to simultaneously diagnose and differentiate the two species, *Heterakis gallinarum* and *Histomonas meleagridis*, coexisting in the intestines of chickens.

Method: Intestinal and cecal tissue samples were processed to extract total DNA, and species-specific primer pairs were designed based on the 18S ribosomal gene sequences. Based on this, a multiplex-PCR method was developed and tested for the simultaneous diagnosis and detection of the two species, *Heterakis gallinarum* and *Histomonas meleagridis*.

Results: Both primer pairs used in the reaction were designed to amplify the 18S ribosomal gene region. Specifically, the HGF-HGR primer pair generated a PCR product of 712 bp, which is specific to *H. gallinarum*, while the HMF-HMR primer pair produced a 331 bp PCR product, specific to *H. meleagridis*. The results of the multiplex-PCR method demonstrated the ability to simultaneously detect both *H. gallinarum* and *H. meleagridis*. Clinical samples with a total DNA concentration of 0.78 ng or higher yielded high-quality PCR results.

Conclusion: The HMF-HMR primer pair was specifically designed for *H. meleagridis*, while the HGF-HGR primer pair was specific to *H. gallinarum*. Multiplex-PCR tests conducted on single templates, mixed templates, or DNA templates from other nematode species showed no non-specific primer binding reactions.

Keywords: *Heterakis gallinarum*, *Histomonas meleagridis*, multiplex-PCR, 18S rRNA.

*Corresponding author

Email: doantthuong74@gmail.com **Phone:** (+84) 988904605 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCĐ3.2147**

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP MULTIPLEX-PCR CHẨN ĐOÁN PHÂN BIỆT HAI LOÀI *HETERAKIS GALLINARUM* VÀ *HISTOMONAS MELEAGRIDIS*

Đoàn Thị Thanh Hương^{1,2*}, Đỗ Thị Roan^{1,2}, Lê Thị Kim Xuyên¹, Phan Xuân Độc¹, Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Lê Thị Huệ¹, Lưu Minh Đức¹, Lê Thị Việt Hà³, Nguyễn Thị Khuê¹

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - 18 Hoàng Quốc Việt, Q. Cầu Giấy, Tp. Hà Nội, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - 18 Hoàng Quốc Việt, Q. Cầu Giấy, Tp. Hà Nội, Việt Nam

³Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam - 2 Trần Phú, P. Mộ Lao, Q. Hà Đông, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 10/02/2025

Chỉnh sửa ngày: 27/02/2025; Ngày duyệt đăng: 14/03/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: “Nghiên cứu này nhằm phát triển phương pháp multiplex-PCR để chẩn đoán và phân biệt đồng thời hai loài *Heterakis gallinarum* và *Histomonas meleagridis* cùng tồn tại trong đường ruột của gà.”.

Phương pháp: Tiến hành tách chiết mẫu mô ruột và manh tràng để thu nhận DNA tổng số; thiết kế các cặp mồi đặc hiệu riêng cho từng loài dựa trên trình tự gen 18S ribosome. Trên cơ sở đó, xây dựng và thử nghiệm phương pháp multiplex-PCR nhằm chẩn đoán và phát hiện đồng thời hai loài *Heterakis gallinarum* và *Histomonas meleagridis*.

Kết quả: Cả hai cặp mồi sử dụng trong phản ứng được thiết kế để khuếch đại vùng gen 18S ribosome. Cụ thể, cặp mồi HGF-HGR tạo sản phẩm PCR có kích thước 712 bp, đặc hiệu riêng cho loài *H. gallinarum*, trong khi cặp mồi HMF-HMR tạo sản phẩm PCR có kích thước 331 bp, đặc hiệu riêng cho loài *H. meleagridis*. Kết quả thử nghiệm phản ứng multiplex-PCR khi sử dụng đồng thời hai cặp mồi trên cho phép phát hiện hai loài *H. gallinarum* và *H. meleagridis* với các kích thước chênh lệch nhau và ngưỡng phát hiện mẫu bệnh phẩm với hàm lượng DNA tổng số từ 0,78 ng trở lên đều cho kết quả multiplex-PCR đạt chất lượng tốt.

Kết luận: Cặp mồi HMF-HMR được thiết kế đặc hiệu cho loài *H. meleagridis*, trong khi cặp mồi HGF-HGR đặc hiệu cho loài *H. gallinarum*. Thử nghiệm phản ứng multiplex-PCR trên các mẫu đơn khuôn, đa khuôn, hoặc các khuôn từ các loài giun tròn khác nhau đều không ghi nhận phản ứng bất cặp sai mồi.

Từ khóa: *Heterakis gallinarum*, *Histomonas meleagridis*, multiplex-PCR, 18S rRNA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh “đầu đen” (blackhead, histomoniasis) do một loại kí sinh trùng đơn bào có tên gọi *Histomonas meleagridis*, thuộc họ *Dientamoebidae*/*Protrichomonadinae* (bộ *Tritrichomonadida*, lớp *Tritrichomonadea*) gây ra ở gia cầm, chủ yếu là gà nhà và gà tây[1]. Bệnh gây thiệt hại rất lớn đối với ngành chăn nuôi gà trên toàn thế giới, với bệnh tích đặc trưng là bề mặt gan có biến đổi giống hình “hoa cúc” và ở manh tràng bị cô đặc tạo “kén”, bệnh còn có tên gọi khác là bệnh kén ruột[1, 2]. Loài kí sinh trùng đơn bào này thường lây truyền qua trứng của giun kim *Heterakis gallinarum*, một loại giun tròn cư trú trong manh tràng, loài có khả năng truyền bệnh qua mẹ[3, 4]. Trứng giun manh tràng tồn tại như một dạng ngủ đông, đóng vai trò là vật trung gian truyền bệnh hiệu quả cho

H. Meleagridis[1, 5, 6].

Hiện nay, chưa có vắc-xin thương mại để phòng ngừa bệnh và các phương pháp điều trị hiệu quả như dùng thuốc kháng sinh Nitro imidazole đã bị cấm sử dụng trên động vật trong ngành sản xuất thực phẩm[7]. Vì vậy, các biện pháp kiểm soát chủ yếu tập trung vào việc quản lý vector[6, 8].

Trước đây, các phương pháp nghiên cứu giám định bệnh giun kim (heterakiasis) do *H. gallinarum* (Phylum Nematoda) và bệnh đầu đen (histomoniasis) do kí sinh trùng đơn bào *H. meleagridis* chủ yếu dựa vào triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy bệnh có thể được chẩn đoán qua phân lập kí sinh trùng ở qui mô *in vitro*, tuy

*Tác giả liên hệ

Email: doanthuong74@gmail.com Điện thoại: (+84) 988904605 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCĐ3.2147>

nhiên phương pháp này tốn rất nhiều thời gian[1].

Trong các phương pháp tiến tiến đã sử dụng, phương pháp PCR là phương pháp được cho là ưu việt nhất. PCR đa môi (multiplex-PCR) là một kỹ thuật chẩn đoán phân tử được sử dụng để phát hiện đồng thời *Heterakis gallinarum* và *Histomonas meleagridis*, cung cấp một phương pháp tiếp cận sàng lọc nhanh chóng, nhạy cảm và đặc hiệu. Phương pháp này cho phép khuếch đại nhiều trình tự DNA mục tiêu trong một phản ứng duy nhất, cho phép phân biệt cả hai tác nhân gây bệnh trong một xét nghiệm. Bằng cách nhắm mục tiêu vào các dấu hiệu di truyền đặc hiệu loài, kỹ thuật này đảm bảo xác định chính xác cả giun tròn và động vật nguyên sinh, ngay cả ở những vật mang mầm bệnh không có triệu chứng hoặc các mẫu môi trường. Ứng dụng của nó trong sàng lọc thường quy giúp tăng cường giám sát bệnh, hỗ trợ can thiệp sớm và các biện pháp kiểm soát hiệu quả. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp chẩn đoán phân biệt hai loài *Heterakis gallinarum* và *Histomonas meleagridis* gây bệnh trên gà bằng phương pháp multiplex-PCR sử dụng vùng gen ribosome 18S rRNA.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tách chiết DNA tổng số

Mẫu bệnh phẩm: Mẫu gan, manh tràng, phân của gà ở các lứa tuổi nghi bệnh do *Histomonas meleagridis*. DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất (Qiagen). Nguyên tắc: Kit sử dụng hệ thống buffer được tối ưu để ly giải trực tiếp tế bào và dùng màng lọc có Silicagel gắn kết có chọn lọc với DNA. Đầu tiên, mẫu được ly giải trong điều kiện biến tính cao để ly giải tế bào và phân huỷ protein. Sau đó mẫu được chuyển qua cột lọc DNeasy Mini spin, qua quá trình ly tâm, DNA được gắn kết vào màng một cách chọn lọc. Các tạp chất còn lại được loại bỏ trong 2 bước rửa với dung dịch đệm để rửa khác nhau. DNA được hoà tan lại bằng dung dịch đệm phù hợp và bảo quản ở -200C cho đến khi sử dụng.

2.2.1. Thiết kế môi dựa trên trình tự gen 18S ribosome (18S rRNA) của *Histomonas sp* và *H. gallinarum*

Cặp môi được thiết kế dựa vào trình tự gen 18S rRNA trong hệ gen của *Histomonas sp* và *H. gallinarum*, cho sản phẩm PCR có độ dài chênh lệch giữa các đối tượng chẩn đoán phân biệt, để dễ đánh giá bằng phương pháp điện di trên thạch. Cặp môi đặc hiệu của *H. meleagridis* là HMF-HMR cho sản phẩm PCR có kích thước 331 bp, cặp môi đặc hiệu riêng cho *H. gallinarum* là HGF-HGR cho sản phẩm PCR có kích thước 712 bp (Bảng 1). Phản ứng multiplex-PCR sử dụng cả 4 môi cho vào một phản ứng cho sản phẩm có độ chênh lệch khoảng 0,4 kb giữa hai loài khi được điện di trên thạch agarose 1%.

Bảng 1. Thành phần nucleotide của các chuỗi môi sử dụng trong phản ứng multiplex-PCR phân biệt hai loài *H.meleagridis* và *H.gallinarum*

Tên môi	Trình tự chuỗi môi (5' → 3')	Vị trí bám	Độ dài sản phẩm PCR
HMF (môi xuôi)	5' GAAAG-CATCTAT-CAAGTGGGA 3'	Riêng cho <i>H. meleagridis</i>	331 bp
HMR (môi ngược)	5 TGCACCAC-CAAAAAT-TATATCC 3'		
HGF (môi xuôi)	5' AAAGGT-GAAACCGC-GAACGGC 3'	Riêng cho <i>H. gallinarum</i>	712 bp
HGR (môi ngược)	5' GCCCG-CGTTAAG-CACTCTAAT 3'		

2.2.2. Thực hiện phản ứng PCR và multiplex-PCR

Phản ứng PCR đơn loài được phối hợp với thành phần gồm: 25 µl PCR Mastermix, 2 µl mỗi loại môi xuôi và môi ngược (10 picomol/µl), 2,5 µl DMSO (dimethyl sulfoxide), 1 µl khuôn DNA tổng số và lượng nước vừa đủ đến 50 µl. DMSO có tác dụng tăng cường chất lượng PCR. Phản ứng multiplex-PCR đa môi (2 cặp môi) với khuôn đơn loài (uniplex) hoặc 2 loài (duplex-PCR), được bố trí mỗi loại môi là 10 picomol; mỗi loại khuôn là 50 ng, cùng với các thành phần của phản ứng như trên. Chu trình nhiệt thực hiện các loại PCR: 1 chu kỳ ở 95°C/5 phút; 35 chu kỳ [95°C/1 phút; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút]; 1 chu kỳ cuối ở 72°C/5 phút; sau đó giảm xuống 4°C bảo quản sản phẩm. Điện di trên thạch agarose 1% để kiểm tra sản phẩm PCR và đánh giá hiệu quả của phản ứng PCR đa môi. Dựa trên độ dài của sản phẩm DNA (PCR hay multiplex-PCR) xác định độ chênh lệch và hiệu quả của phản ứng/duplex-PCR (cho 2 loài cần phân biệt).

Một số sản phẩm PCR/multiplex-PCR được tinh sạch, giải trình tự để kiểm tra chuỗi nucleotide của từng loài bổ sung kết quả đánh giá bằng điện di trên thạch.

2.2.3. Thử nghiệm chẩn đoán phân biệt và xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng multiplex-PCR

Phản ứng duplex-PCR được thực hiện bao gồm 2 µl hỗn hợp của 4 môi (nồng độ 10 pmol mỗi loại môi), với 2 µl hỗn hợp khuôn (1 µl khuôn *H. meleagridis* có nồng độ ban đầu 50 ng và 1 µl khuôn *H. gallinarum* có nồng độ ban đầu 50 ng), và cùng với các thành phần như đã mô tả ở trên.

Các môi đặc hiệu được xác định bằng cách thực hiện phản ứng multiplex-PCR sử dụng khuôn DNA của các loài giun tròn trưởng thành đã được xác định chính xác loài như: *Heterakis gallinarum*, *Histomonas meleagridis*, *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma*

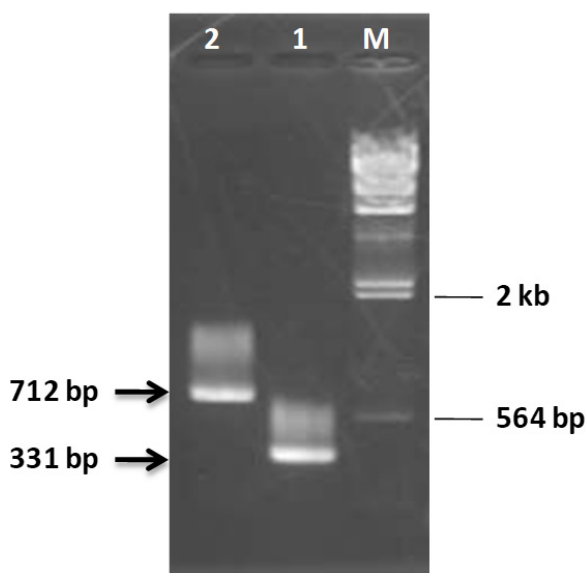
duoenale, *Angiostrong cantonensis*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Trichinella spiralis*, *Dirofilaria repens*.

Để xác định độ nhạy của phản ứng multiplex-PCR, từ khuôn chung 2 loài, tiến hành pha loãng theo cơ số 2 liên tục: 2^{-1} (25ng/ μ l); 2^{-2} (12,5 ng/ μ l); 2^{-3} (6,25 ng/ μ l); 2^{-4} (3,125 ng/ μ l); 2^{-5} (1,5625 ng/ μ l); 2^{-6} (0,78125 ng/ μ l); 2^{-7} (0,390625 ng/ μ l). Thực hiện phản ứng multiplex-PCR với thành phần và chu trình nhiệt như đã mô tả, bắt đầu từ khuôn là 2-1 (25ng/ μ l) đến 2-7 (khoảng 0,39 ng/ μ l). Sản phẩm được điện di trên thạch agarose 1%, nhuộm ethidium bromide và đánh giá kết quả.

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả thử nghiệm cặp mồi HMF-HMR và HGF-HGR

Thực hiện phản ứng PCR đơn loài (uniplex-PCR) để kiểm tra cặp mồi HMF-HMR và HGF-HGR được thiết kế có thực sự đặc hiệu riêng với từng loài *H. meleagridis* và *H. gallinarum* hay không, chúng tôi tiến hành sử dụng khuôn DNA tổng số của các chủng *H. meleagridis* và *H. gallinarum* đã được cung cấp. Các mẫu bao gồm: HmH1 (*H. meleagridis*) và HGA1 (*H. gallinarum*). Phản ứng uniplex-PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt đã được lựa chọn và tối ưu hoá như đã mô tả. Sản phẩm uniplex-PCR được điện di trên thạch agarose 1%, kết quả trình bày ở hình 1.



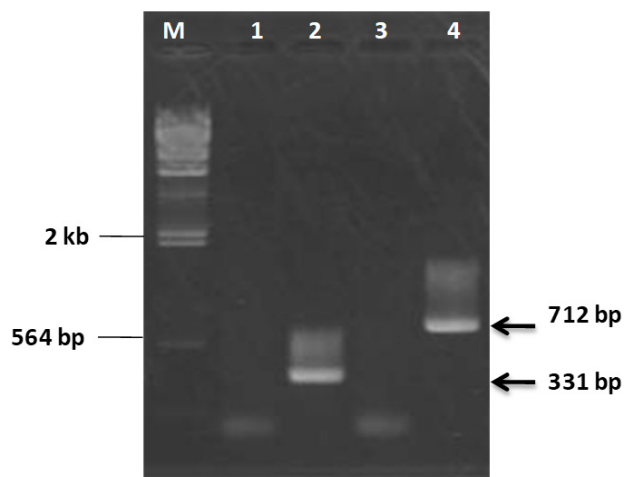
Ghi chú: M: chỉ thị phân tử DNA của thực khuẩn thể Lambda được cắt bằng Hind III; giếng số 1 là từ khuôn HmH1 (*H. meleagridis*) bằng DNA kích thước 331 bp; Giếng số 2 là HGA1 (*H. gallinarum*), kích thước 712 bp.

Hình 1. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm uniplex-PCR của các mẫu *H. meleagridis* và *H. gallinarum*.

Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy, ở tất cả các giếng đều xuất hiện một băng DNA đơn nhất có chất lượng rất tốt. So sánh với kích thước cho thấy băng DNA các giếng có kích thước đúng với dự kiến, lần lượt là 331 bp của HmH1, tương ứng với loài *H. meleagridis*; 712 bp của HGA1, tương ứng với loài *H. gallinarum*, điều này chứng cứ mỗi thiết kế là đặc hiệu riêng cho từng loài, không phản ứng chéo với DNA không phải mục tiêu và các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa tốt. Các đoạn mồi đặc hiệu loài tạo ra các dải riêng biệt, đơn lẻ có kích thước dự kiến mà không có phản ứng chéo. 10 Các nghiên cứu này làm nổi bật độ tin cậy của vùng 18S rRNA để phân biệt giữa hai loài ký sinh trùng này.

Kết quả thử nghiệm chéo hai cặp mồi HMF-HMR và HGF-HGR phân biệt giữa 2 loài *H. meleagridis* và *H. gallinarum*

Chúng tôi kiểm tra cặp mồi HMF-HMR và HGF-HGR được thiết kế đặc hiệu đối với loài *H. meleagridis* và *H. gallinarum* có thực sự đặc hiệu chỉ riêng đối với loài được thiết kế mồi hay không, bằng cách dùng 2 cặp mồi trên thử nghiệm chéo (thực hiện uniplex-PCR với cặp mồi của loài này trên khuôn DNA tổng số của loài khác).



Ghi chú: M: chỉ thị phân tử DNA; Giếng 1: khuôn HGA1 (*H. gallinarum*), bằng cặp mồi HMF-HMR (của *H. meleagridis*) không cho sản phẩm; Giếng 2: khuôn HmH1 (*H. meleagridis*), bằng cặp mồi HMF-HMR (của *H. meleagridis*), 331 bp; Giếng 3: khuôn HmH1 (*H. meleagridis*) bằng cặp mồi HGF-HGR (của *H. gallinarum*) không cho sản phẩm; Giếng 4: khuôn HGA1 (của *H. gallinarum*) bằng cặp mồi HGF-HGR (của *H. gallinarum*), 712 bp.

Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR thực hiện thử nghiệm chéo đối mồi, đối khuôn tương ứng.

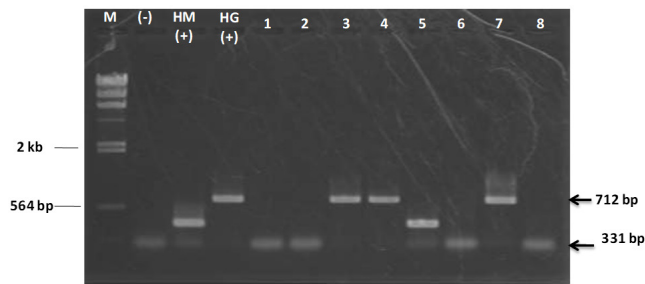
Kết quả điện di ở hình 2 cho thấy, chỉ những khuôn thực hiện bằng đúng cặp mồi được thiết kế đặc hiệu cho chính loài đó, thì PCR cho sản phẩm rõ ràng, băng sáng, đơn nhất, kích thước 331 bp đặc hiệu cho *H. meleagridis* (giếng 2), kích thước 712 bp đặc hiệu cho *H. gallinarum* (giếng 3), các giếng còn lại không

có băng DNA do thực hiện chéo môi nên không bám vào khuôn DNA của loài khác. Kết quả này cho thấy, không thấy xuất hiện sự bắt cặp lẫn nhau giữa cặp môi này với các nguồn khuôn khác loài trong cùng một phản ứng PCR. Đây là yếu tố cần thiết để xây dựng kit multiplex-PCR phân biệt các loài với nhau.

4.2. Kết quả thử nghiệm độ đặc hiệu của cặp môi HMF-HMR và HGF-HGR với các chủng tham chiếu

Để xác định độ đặc hiệu của hai cặp môi HMF-HMR và HGF-HGR của phản ứng multiplex-PCR (hỗn hợp môi) trên các khuôn DNA tổng số của *H. meleagridis* thu ở gan gà (HmH1) và *H. gallinarum* thu ở ruột gà (HGA1) và một số loài giun tròn khác có thể cho trứng trong phân như: *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma duodenale*, *Dirofilaria repens*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*.

Sau khi kiểm tra trên thạch agarose 1% nhuộm với ethidium bromide dưới ánh sáng tia cực tím cho thấy chỉ các mẫu có *H. meleagridis* và *H. gallinarum* thì xuất hiện băng, còn với các loài giun tròn khác thì không. Như vậy, một lần nữa khẳng định không có phản ứng bắt cặp chéo môi với các loài giun tròn khác (hình 3).



Ghi chú: M: chỉ thị phân tử DNA. (-): đối chứng âm không có DNA, HM(+) và HG(+): *H. meleagridis* và *H. gallinarum*. Giếng 1: *T. canis* (Tcdd); Giếng 2: *A. caninum* (GMC); Giếng 3 và 4: *H. gallinarum* (HGA2, HGA3); Giếng 5: HmC1 (*H. meleagridis*); Giếng 6: *D. repens* (GTC); Giếng 7: *H. gallinarum* (GK1); Giếng 8: *A. cantonensis* (GM).

Hình 3. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR thực hiện thử nghiệm độ đặc hiệu của hai cặp môi HMF-HMR và HGF-HGR với các loài giun tròn khác nhau.

4.3. Kết quả thử nghiệm phản ứng multiplex-PCR chẩn đoán phân biệt giữa 2 loài *H. meleagridis* và *H. gallinarum*

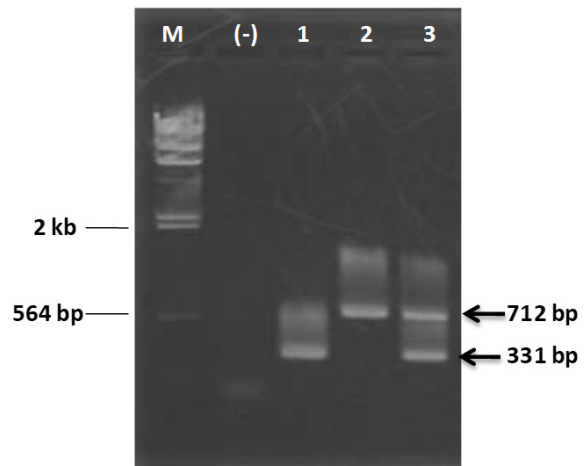
Phản ứng multiplex-PCR phân biệt 2 loài *H. meleagridis* và *H. gallinarum*, gọi là duplex-PCR, được thử nghiệm trên các mẫu DNA tổng số, hỗn hợp giữa HmH1 (*H. meleagridis*) và HGA1 (*H. gallinarum*)

Thực hiện phản ứng PCR với thành phần, theo chu trình nhiệt như đã trình bày; sau đó điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên thạch agarose 1% (hình 4).

Kết quả ở hình 4 cho thấy, ở giếng 1, 2, với khuôn riêng của từng loài, chỉ xuất hiện 1 băng DNA sản phẩm PCR;

giếng 3, với hỗn hợp khuôn của 2 loài, có 2 băng DNA hiển thị. Như vậy, tuy có cả 2 cặp môi HMF-HMR và HGF-HGR trong phản ứng duplex-PCR, nhưng chỉ xuất hiện 1 băng DNA đặc hiệu, có độ dài tương ứng với mỗi loài: *H. meleagridis* (giếng 1), *H. gallinarum* (giếng 2). Ở giếng 3, khuôn của 2 loài đã cho 2 sản phẩm PCR, với kích thước tương ứng của loài *H. meleagridis* (331 bp), *H. gallinarum* (712 bp), thực hiện đối chứng âm để chứng tỏ không có sự tạp nhiễm (hình 4).

Như vậy, phản ứng multiplex-PCR sử dụng 2 cặp môi (HMF-HMR và HGF-HGR), phát hiện 2 loài *H. meleagridis* và *H. gallinarum*, đã được thử nghiệm thành công.

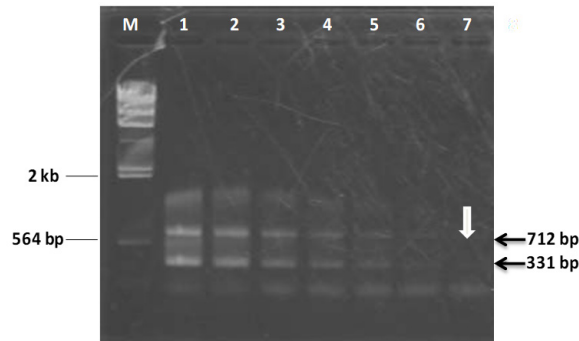


Ghi chú: M: chỉ thị phân tử DNA (Lambda cắt bằng HindIII); (-): đối chứng âm (không có DNA); Giếng 1: *H. meleagridis* (HmH1); Giếng 2: *H. gallinarum* (HGA1); Giếng 3: Từ Hỗn hợp khuôn 2 HmH1/HGA1 (2 loài: *H. meleagridis* và *H. gallinarum*).

Hình 4. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR của phản ứng multiplex-PCR giữa *H. meleagridis* và *H. gallinarum* sử dụng 2 cặp môi HMF-HMR và HGF-HGR.

4.4. Đánh giá ngưỡng phát hiện của phản ứng multiplex-PCR

Kiểm tra ngưỡng phát hiện của phản ứng PCR nhằm xác định với độ pha loãng cao nhất nào phản ứng có thể thực hiện được cho kết quả. Phản ứng được tiến hành như sau: chúng tôi chọn khuôn DNA tổng số của mẫu HmH1 (*H. meleagridis*) và HGA1 (*H. gallinarum*), được pha ở nồng độ gốc 50 ng/μl. Từ nồng độ này, DNA tổng số của các mẫu được pha loãng theo cơ số 2 (2-1 đến 2-7) và thực hiện PCR bắt đầu từ khuôn có nồng độ 2-1 (25ng/μl).



Ghi chú: M: Chi thị DNA. Giếng: 1 = 25 ng (2^{-1}); 2 = 12,5 ng (2^{-2}); 3 = 6,25 ng (2^{-3}); 4 = 3,13 ng (2^{-4}); 5 = 1,56 ng (2^{-5}); 6 = 0,78 ng (2^{-6}); 7 = 0,39 ng (2^{-7}). Mũi tên chỉ rõ, đèn hàm lượng khuôn DNA ở 0,78 ng, bằng PCR vẫn còn phát hiện được.

Hình 5. Độ nhạy của phản ứng duplex-PCR của bộ kit ở các nồng độ khác nhau của khuôn trộn chung DNA tổng số của *H. meleagridis* và *H. gallinarum*

Với các độ pha loãng khác nhau gấp đôi liên tục, 1 μ l của mỗi một nồng độ được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR đa môi gồm 4 môi (HMF-HMR và HGF-HGR), thực hiện theo thành phần và chu trình nhiệt đã trình bày, sau đó điện di kiểm tra kết quả trên thạch agarose 1%. Kết quả điện di kiểm tra độ nhạy của phản ứng, trình bày ở hình 5, cho thấy, ở nồng độ 2-6: 0,78125ng/ μ l, khi sử dụng 1 μ l làm khuôn, phản ứng PCR vẫn cho phép phát hiện được sản phẩm. Tuy nhiên, ở các nồng độ khuôn thấp (khoảng 0,78 ng/phản ứng và sau đó), sản phẩm PCR hiển thị không được rõ lắm để cho phép đánh giá kết quả. Kết quả cũng cho phép khẳng định, nếu mẫu bệnh phẩm có hàm lượng khuôn DNA tổng số từ khoảng 0,78 ng trở lên, đều cho kết quả PCR tốt.

5. KẾT LUẬN

Xây dựng, kiểm tra và xác định hiệu quả của phản ứng multiplex-PCR phân biệt 2 loài *H. meleagridis* và *H. gallinarum*, đã được thực hiện thành công. Cặp môi đặc hiệu riêng cho loài *H. meleagridis* là HMF-HMR cho kích thước 331bp, cặp môi HGF-HGR đặc hiệu riêng cho loài *H. gallinarum* cho kích thước 712 bp. Phản ứng multiplex-PCR đã được thử nghiệm đánh giá trên các loại khuôn đơn và hỗn hợp khuôn, cho kết quả với độ nhạy cao: hàm lượng khuôn DNA 0,78 ng trở lên, đều cho kết quả PCR tốt.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả khẳng định không có xung đột lợi ích đối với các nghiên cứu, tác giả, và/hoặc xuất bản bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] McDougald LR. Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. Avian Dis. 2005;49(4):462-76. doi: 10.1637/7420-081005R.1. PMID: 16404985.
- [2] Lê Văn Năm. Bệnh đầu đen ở gà và gà tây. Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi. 2011;32:88-91.
- [3] Graybill HW, Smith T. Production of fatal blackhead in turkeys by feeding embryonated eggs of *Heterakis papillosa*. J Exp Med. 1920;31(5):647-55. doi: 10.1084/jem.31.5.647.
- [4] Hauck R, Hafez HM. Experimental infections with the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*: a review. Parasitol Res. 2013;112:19-34. doi: 10.1007/s00436-012-3190-5.
- [5] Farr MM. Further observations on survival of the protozoan parasite, *Histomonas meleagridis*, and eggs of poultry nematodes in feces of infected birds. Cornell Vet. 1961;51:3-13. PMID: 13698259.
- [6] Beckmann JF, Dormitorio T, Oladipupo SO, Bethonico Terra MT, Lawrence K, Macklin KS, Hauck R. *Heterakis gallinarum* and *Histomonas meleagridis* DNA persists in chicken houses years after depopulation. Vet Parasitol. 2021;298:109536. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109536.
- [7] Clark S, Kimminau E. Critical review: future control of blackhead disease (histomoniasis) in poultry. Avian Dis. 2017;61:281-8. doi: 10.1637/11593-012517-ReviewR.
- [8] Liebhart D, Windisch M, Hess M. Oral vaccination of 1-day-old turkeys with in vitro attenuated *Histomonas meleagridis* protects against histomonosis and has no negative effect on performance. Avian Pathol. 2010;39:399-403. doi: 10.1080/03079457.2010.506906.
- [9] Kitade Y, Ootsuka S, Iitsuka O, Saga N. Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) gene. J Appl Phycol. 2003;15:555-7.
- [10] Hauck R, Balczulat S, Hafez HM. Detection of DNA of *Histomonas meleagridis* and *Tetratrichomonas gallinarum* in German poultry flocks between 2004 and 2008. Avian Dis. 2010;54:1021-5.