

## NGHIÊN CỨU CHẨN ĐOÁN *PASTEURELLA MULTOCIDA* VÀ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR

Nguyễn Thị Thu Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Phú<sup>1</sup>, Nguyễn Hữu Thọ<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Oanh<sup>1</sup>,  
Trương Phúc Hưng<sup>4</sup>, Hồ Thị Xuân Tuy<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Huy<sup>2</sup>, Lê Công Tuấn<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Thịnh<sup>5</sup>,  
Nguyễn Thị Kim Cúc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phường Phú Thượng, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Đại học Huế, Số 3 Lê Lợi, TP Huế, Việt Nam

<sup>3</sup> Trường Đại học khoa học, Đại học Huế, Số 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

<sup>4</sup> Trường Đại học khoa học, Đại học Thái Nguyên, Phường Tân Thịnh, Thái Nguyên, Việt Nam

<sup>5</sup> Phân viện Thú y Miền Trung, Km4, Phường Vĩnh Hòa, Nha Trang, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Kim Cúc <ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 02-04-2023; Hoàn thành phản biện: 23-08-2023; Ngày chấp nhận đăng: 23-08-2023)

**Tóm tắt.** Ở Việt Nam, kỹ thuật multiplex PCR đã được sử dụng để chẩn đoán nhiều bệnh trên vật nuôi nhưng kỹ thuật này hiện nay chưa được áp dụng để chẩn đoán bệnh trên cừu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển một kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện đồng thời hai tác nhân chính gây tụ huyết trùng trên cừu Phan Rang là *Pasteurella multocida* và *Mannheimia haemolytica*. Bằng cách sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu, với nồng độ tối ưu của mỗi mồi là 5 pM, phương pháp này đã nhân thành công đoạn gen *kmt1* từ *P. multocida* và *gcp* từ *M. haemolytica* trong cùng một phản ứng chứa hỗn hợp DNA tổng số của hai vi khuẩn này ở nồng độ thấp nhất là 0,1 ng mỗi loại. Thêm vào đó, phản ứng multiplex PCR này không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt nhân tạo của một số DNA từ vi khuẩn khác. Đặc biệt, phương pháp multiplex PCR này có độ ổn định đạt 100% khi thử nghiệm trên quy mô nhỏ với 20 mẫu DNA thô thu được từ phương pháp xử lý nhiệt trực tiếp hay xử lý nhiệt sau khi làm giàu 10 mẫu thực địa. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về việc chẩn đoán tụ huyết trùng trên cừu bằng kỹ thuật multiplex PCR, kỹ thuật không chỉ có giá trị để phát hiện vi khuẩn *P. multocida* và *M. haemolytica* ở cừu mà còn có vai trò tham khảo để chẩn đoán những vi khuẩn này trong các đối tượng vật nuôi khác.

**Từ khóa:** *P. multocida*, *M. haemolytica*, *kmt1*, *gcp*, multiplex PCR

## Development of a multiplex PCR method for detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*

Nguyen Thi Thu Thao<sup>1</sup>, Nguyen Van Phu<sup>1</sup>, Nguyen Huu Tho<sup>1</sup>, Nguyen Thi Oanh<sup>1</sup>,  
Truong Phuc Hung<sup>4</sup>, Ho Thi Xuan Tuy<sup>1</sup>, Nguyen Xuan Huy<sup>2</sup>, Le Cong Tuan<sup>3</sup>, Nguyen Thi Thinh<sup>5</sup>,  
Nguyen Thi Kim Cuc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Hue University, Provincial Road 10, Phu Thuong, Hue, Vietnam

<sup>2</sup> Hue University, 3 Le Loi st., Hue, Vietnam

<sup>3</sup> Hue University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue st., Hue, Vietnam

<sup>4</sup> Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University, Tan Thinh, Thai Nguyen, Vietnam

<sup>5</sup> Institute of Veterinary research and development of Central Vietnam, Km4, Vinh Hoa, Nha Trang, Vietnam

\* Correspondence to Nguyen Thi Kim Cuc <ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn>

(Received: 02 April 2023; Revised: 23 August 2023; Accepted: 23 August 2023)

**Abstract.** The multiplex PCR assay has been used to diagnose different diseases in livestock in Vietnam; however, this method has not been well-applied to sheep diseases. This study developed a multiplex PCR assay to detect the two main agents, *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*, causing Pasteurellosis in sheep. By using two pairs of specific primers, with the optimum concentration of each primer being 5 pM, this method successfully amplified the *kmt1* gene from *P. multocida* and the *gcp* gene from *M. haemolytica* in the same reaction containing DNA of *P. multocida* and *M. haemolytica* at the lowest concentration of 0.1 ng each. Moreover, this multiplex PCR reaction is not affected by the artificial presence of some other bacterial DNA. In particular, this multiplex PCR showed 100% confidence in a stability test on a small scale with 20 raw DNA samples obtained from direct heat treatment or enrichment before heat treatment of 10 field samples. This is the first study in Vietnam on diagnosing *P. multocida* and *M. haemolytica* by multiplex PCR. This method is valuable for detecting *P. multocida* and *M. haemolytica* in sheep and serves as a reference for detecting these bacteria in other household animal.

**Keywords:** *P. multocida*, *M. haemolytica*, *kmt1*, *gcp*, multiplex PCR

## 1 Mở đầu

Theo số liệu của tổng Cục thống kê tới đầu năm 2021 cả nước có khoảng trên một trăm nghìn con cừu, so với các vật nuôi khác như trâu, bò, lợn, dê, ngựa thì tổng đàn cừu ở hiện nay còn ở mức thấp. Mặc dù hiện nay có một số giống cừu nhập nội được nuôi phục vụ công tác giống nhưng giống cừu bản địa, còn gọi là cừu Phan Rang, chiếm ưu thế gần như tuyệt đối (trên 93%) [1]. Sự thích nghi và chiếm ưu thế của cừu Phan Rang tại Ninh Thuận, một tỉnh mưa ít, nắng nhiều, quanh năm khô hạn đã gợi ý về một tiềm năng chuyển đổi cơ cấu vật nuôi cho những vùng khô hạn chịu ảnh hưởng bởi biến đổi khí hậu [2]. Tuy nhiên, như đã đề cập ở trên cừu Phan Rang không chỉ có số lượng nhỏ mà còn được nuôi tập trung tại một khu vực nên các nghiên cứu liên quan tới giống cừu này còn rất hạn chế, các nghiên cứu đã công bố chủ yếu tập trung vào chăn nuôi [3–5], bên cạnh đó còn có một số ít nghiên cứu liên quan tới chuỗi giá trị [6], tới đa dạng di truyền của cừu Phan Rang dựa vào gen ty thể [7]. Tuy nhiên các nghiên cứu liên quan tới các bệnh trên cừu vẫn còn hạn chế, trong số những bệnh thường gặp thì tụ huyết trùng là một trong những bệnh được quan tâm sớm hơn cả, giai đoạn 2004 - 2007 nhóm nghiên cứu ở Phân viện Thú y miền Trung dựa vào điều tra dịch tễ học bệnh tụ

huyết trùng ở cừu và nhận thấy rằng *Pasteurella multocida* và *Mannheimia haemolytica* là tác nhân chính gây tụ huyết trùng ở Ninh Thuận, Khánh Hòa và Đắk Lắk [8]. Bên cạnh đó, một số công bố gần đây về chẩn đoán phân tử đối với tác nhân gây tụ huyết trùng như *P. multocida* [2,9], *M. haemolytica* [10] đã được công bố. *P. multocida* và *M. haemolytica* có thể coi là hai tác nhân chính gây bệnh hô hấp trên cừu, gây thiệt hại lớn đối với ngành chăn nuôi cừu [11], trong đó *M. haemolytica* thường gây viêm phổi [12] còn *P. multocida* thường gây viêm phế quản phổi ở cừu trưởng thành và gây nhiễm trùng máu ở cừu non [13]. Các nghiên cứu trước đây gợi ý rằng hai vi khuẩn này là những vi khuẩn cơ hội, chúng có thể sống trong phổi những con cừu khỏe mạnh mà không gây nên các triệu chứng của bệnh tụ huyết trùng trong điều kiện bình thường, nhưng khi vật chủ ở trạng thái căng thẳng hay suy giảm miễn dịch chúng sẽ tấn công và gây bệnh [14], và một điểm đáng lưu ý là khi cừu mẹ bị nhiễm tụ huyết trùng sẽ lây nhiễm vi khuẩn này sang con của chúng [12]. Một số nghiên cứu chẩn đoán sự có mặt của *P. multocida* và *M. haemolytica* ở vật nuôi đã được triển khai, đặc biệt ở các nước có đàn cừu lớn như Ấn Độ, Trung Quốc [12,15–17]. Đặc biệt có những nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật PCR đa mồi (multiplex PCR) để phát hiện đồng thời cả hai tác nhân này trong một phản ứng [15,17]. Việc áp

dụng kỹ thuật multiplex PCR trong chẩn đoán bệnh trên vật nuôi có thể áp dụng để phát hiện nhiều tác nhân (từ 2 tác nhân trở lên) trong một phản ứng, nó không chỉ giúp tăng cường độ nhạy, độ đặc hiệu mà còn tiết kiệm thời gian mà còn làm giảm chi phí xét nghiệm [18–20]. Bệnh tụ huyết trùng trên cừu ở Việt Nam cũng được cho là do hai tác nhân chính là *P. multocida* và *M. haemolytica* gây nên nhưng các công bố trước đây chỉ tập trung phát hiện từng tác nhân riêng lẻ [2,9,10], vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung phát triển phương pháp multiplex PCR để chẩn đoán cả hai tác nhân trên trong cùng một phản ứng nhằm ứng dụng kỹ thuật này hiệu quả hơn trong chẩn đoán tụ huyết trùng ở cừu Phan Rang.

## 2 Vật liệu và phương pháp

### 2.1 Vật liệu

Các chủng vi khuẩn *P. multocida*, *M. haemolytica* và *Fusobacterium necrophorum*; cặp mồi FKMT1/RKMT1; các mẫu thực địa được 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 2021, mã số: CT-2021-01-DHH-02; chủng *Escherichia coli* ATCC 25922 được nhận từ phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên; chủng *Vibrio alginolyticus* được cung cấp từ đề tài khoa học và công nghệ độc lập cấp Quốc gia, thực hiện tại phòng thí nghiệm Tế bào, Viện Công nghệ sinh

học, Đại học Huế từ năm 2021, mã số ĐTDLCN.95/21 .

### 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 1/2022 - 3/2023.

### 2.3 Phương pháp

#### Phương pháp thiết kế mồi

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thiết kế mồi để nhân đoạn gen mã hoá cho protein O-sialoglycoprotein endopeptidase (*gcp*) bằng cách so sánh sự tương đồng của một hệ gen của *M. haemolytica* đã công bố trên ngân hàng gen bằng phần mềm ClustalW2 để chọn khu vực có mức độ bảo thủ cao để thiết kế mồi (mã số của các gen đã tham khảo từ ngân hàng gen bao gồm CP017495.1; CP087379.1; CP097333.1; LS483299.1). Sau khi chọn được khu vực bảo thủ thì sử dụng phần mềm Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) để thiết kế mồi đặc hiệu. Cặp mồi FGCP1/RGCP1 dùng để nhân đoạn gen có kích thước khoảng 478 nucleotides. Ngoài ra, nghiên cứu này còn sử dụng cặp mồi FKMT1/RKMT1 để nhân gen *kmt1* từ *P. multocida* theo công bố của Nguyễn Thị Kim Cúc và cộng sự [9]. Thông tin về trình tự, kích thước đoạn gen được khuyếch đại cùng nhiệt độ/thời gian gắn mồi được trình bày ở Bảng 1.

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

Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm (bp)	Nhiệt độ (°C) /Thời gian gắn mồi (s)	Tài liệu tham khảo
<b>Phản ứng PCR</b>			
<b>FKMT1:</b> CCTCCGACTAACACCCAAGT <b>RKMT1:</b> TGGGCTTGTCGGTAGTCTTT	633	56°C/30s	[9]
<b>FGCP1:</b> TAAAGTTGACGGCGTTGGG <b>RGCP1:</b> AAATTGTGGGCGAGGGTAGAA	478	55°C/30s	Thiết kế trong nghiên cứu này

Trình tự môi	Kích thước sản phẩm (bp)	Nhiệt độ (°C) / Thời gian gắn môi (s)	Tài liệu tham khảo
<b>Phản ứng multiplex PCR</b>			
<b>FKMT1:</b> CCTCCGACTAACACCCAAGT			
<b>RKMT1:</b> TGGGCTTGTCGGTAGTCTTTT			
<b>FGCP1:</b> TAAAAGTTGACGGCGTTGGG	478 và 633	55°C/30s	[9] và nghiên cứu này
<b>RGCP1:</b> AAATTGTGGGCGAGGGTAGAA			

### Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn

Các chủng *P. multocida* và *M. haemolytica* được cấy ria trên đĩa môi trường BHI (Himedia, Ấn Độ), *E. coli* cấy ria trên đĩa môi trường LB (Himedia, Ấn Độ) và *V. alginolyticus* cấy ria trên đĩa môi trường tryptic soy agar (TSA) (Himedia, Ấn Độ). Một khuẩn lạc thuần khiết của mỗi vi khuẩn được cấy vào 5 mL môi trường, lần lượt là các chủng *P. multocida*, *M. haemolytica* cấy vào môi trường BHI lỏng (Himedia, Ấn Độ), *E. coli* cấy vào môi trường LB lỏng (Himedia, Ấn Độ), *V. alginolyticus* cấy vào môi trường tryptic soy broth (TCBS, Himedia, Ấn Độ). Ba vi khuẩn *P. multocida*, *M. haemolytica*, *E. coli* trong môi trường lỏng được lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở 37°C; môi trường lỏng chứa *V. alginolyticus* được nuôi ở 30°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút. Các ống môi trường chứa vi khuẩn được lắc qua đêm và thu sinh khối tế bào để tách DNA tổng số bằng bộ kit G-spin™ Genomic DNA Extraction (Intron, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất cho vi khuẩn Gram âm. DNA tổng số sau khi được hoà tan trong nước khử ion thì được kiểm tra nồng độ bằng nanodrop one (Thermo Fisher, Mỹ).

### Phương pháp PCR

PCR được thực hiện bằng máy PCR MJ mini thermal cycler (Bio Rad, Mỹ) cho từng cặp môi FGCP1/RGCP1 và FKMT1/RKMT1 (nồng độ mỗi môi là 10 pM) riêng lẻ để kiểm tra khả năng khuếch đại của 02 cặp môi này với DNA tổng số của *P.*

*multocida* và *M. haemolytica* (mỗi loại 100 ng/phản ứng) trước khi tiến hành phản ứng multiplex PCR. PCR được tiến hành gồm các bước trước biến tính (94°C trong 5 phút); tiếp theo 30 chu kỳ PCR, mỗi chu kỳ gồm 3 bước ((biến tính ở 94°C trong 30 giây; gắn môi (theo thông tin ở bảng 1), nhiệt độ gắn môi của cặp môi FGCP1/RGCP1 được kiểm tra bằng phần mềm IDT (<https://sg.idtdna.com>) và gradient nhiệt độ gắn môi từ 50 - 65°C; kéo dài (72°C trong 30 giây)); kết thúc ở 72°C trong 10 phút và bảo quản ở 4°C. Sản phẩm PCR sau đó được chạy kiểm tra trong gel agarose 1,5% có bổ sung 1X thuốc nhuộm huỳnh quang Safe red (Intron, Hàn Quốc) và chạy trong đệm 1X TAE ở điều kiện 100 V/30 phút, kết quả được soi trên máy Mupid one led Illuminator (Nippon, Đức) và chụp hình.

### Phương pháp multiplex PCR

Phản ứng multiplex PCR được kết hợp 02 khuôn mẫu DNA từ *P. multocida* và *M. haemolytica* (mỗi loại 100 ng) và 04 môi FGCP1/RGCP1/FKMT1/RKMT1 (nồng độ mỗi môi được kiểm tra từ 2,5 pM tới 10 pM để lựa chọn nồng độ tối ưu), nhiệt độ gắn môi được lựa chọn là nhiệt độ gắn môi của cặp môi có nhiệt độ gắn môi thấp hơn (cặp môi FGCP1/RGCP1).

### Phương pháp kiểm tra độ nhạy của phản ứng multiplex PCR

DNA tổng số của *P. multocida* và *M. haemolytica* lần lượt được pha loãng và mỗi loại

DNA được sử dụng ở nồng độ 100, 10, 1, 0.1, 0.01 ng/phản ứng với điều kiện tối ưu của phản ứng được xác định ở phương pháp multiplex PCR.

### Phương pháp đánh giá độ đặc hiệu

DNA tổng số của *P. multocida*, *M. haemolytica*, *P. multocida* và *M. haemolytica* (100 ng mỗi loại) lần lượt được trộn DNA tổng số của *E. coli* và/hoặc *V. alginolyticus* với nồng độ tương đương để kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng với điều kiện đã được trình bày ở phần phương pháp multiplex PCR.

### Phương pháp kiểm tra độ ổn định của phản ứng multiplex PCR với mẫu DNA thô

Dịch nuôi cấy vi khuẩn *P. multocida*, *M. haemolytica* thuần khiết ở mật độ  $10^7$  CFU/mL đã được ly tâm 13000 rpm/phút trong 5 phút, thu cặn tế bào và hoà tan trong 100  $\mu$ L TE (từ bộ Kit G-spin™ Genomic DNA Extraction) có bổ sung Triton X-100 (Sigma, Mỹ) tới nồng độ cuối cùng đạt 0,1% [9]. Dịch tế bào sau đó được ủ ở 99°C trong 10 phút (Stuart block heater, Anh), và thu lại dịch nổi chứa DNA thô bằng cách ly tâm 13000 rpm/phút trong 5 phút, sau đó bảo quản ở -20°C tới khi sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng multiplex PCR.

Thí nghiệm với mẫu hiện trường sử dụng 10 mẫu ngoáy mũi cừu, ngay sau khi thu thập các que ngoáy mũi được bảo quản trong ống 15 mL có chứa 2 mL môi trường vận chuyển mẫu, các ống này được giữ lạnh trong thùng bảo quản mẫu chuyên dụng có đá túi và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ. Tại phòng thí nghiệm, các mẫu được trộn lại bằng máy vortex, sau đó 1,5 mL mẫu được ly tâm trực tiếp, loại bỏ môi trường và hoà tan cặn vào 50  $\mu$ L TE chứa 0,1% Triton X-100 và tiến hành xử lý nhiệt như mẫu vi khuẩn, lượng môi trường chứa mẫu còn lại được chuyển sang làm giàu trong 4,5 mL môi trường BHI theo tài liệu tham khảo đã công bố trước đó [21, 22], tế bào sau

đó được hoà tan trong 100  $\mu$ L TE có 0,1% Triton X-100 và xử lý nhiệt như trên. DNA tổng số từ mẫu ngoáy mũi trực tiếp hoặc mẫu ngoáy mũi đã được làm giàu sẽ được bảo quản ở -20°C tới khi sử dụng.

Tất cả các mẫu DNA thô đều sử dụng cho phản ứng PCR/Multiplex PCR ở nồng độ 1  $\mu$ L/phản ứng.

## 3 Kết quả và thảo luận

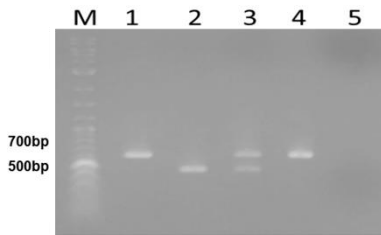
### 3.1 Multiplex PCR phát hiện sự có mặt của *P. multocida* và *M. haemolytica*

Để phát hiện sự có mặt của *P. multocida* trong các mẫu cừu Phan Rang, nhóm nghiên cứu của chúng tôi trước đây đã sử dụng cặp mồi FKMT1/RKMT1 [9], tương tự chúng tôi cũng đã sử dụng phương pháp multiplex PCR với 2 cặp mồi Rpt2 và PHSSA tham khảo từ nhóm nghiên cứu của Kumar [23] để phát hiện *M. haemolytica* [10], tuy nhiên khi chúng tôi ghép cặp mồi nhân gen *kmt1* với *rpt2* hoặc *kmt1* với *phssa* thì phản ứng multiplex PCR không hoạt động hiệu quả ở nhiệt độ gắn mồi tương ứng với cặp mồi FKMT1/RKMT1 (56°C) hay các cặp mồi Rpt2/PHSSA (55°C) (kết quả không được trình bày trong công bố này).

Ngoài các cặp mồi khuếch đại gen *rpt2* và *phssa* thì một số công bố về chuẩn đoán *M. haemolytica* gợi ý gen mã hoá *gcp* cũng là một gen có khả năng phát hiện đặc hiệu vi khuẩn này [24–26], vì vậy nhóm nghiên cứu đã thiết kế bổ sung cặp mồi để nhân gen *gcp*. Hình 1 minh họa cho kết quả PCR (giếng 1 và 2) và multiplex PCR (giếng 3) để phát hiện lần lượt *P. multocida*, *M. haemolytica*, *P. multocida* và *M. haemolytica*. Kết quả này gợi ý rằng cặp mồi FKMT1/RKMT1 và FGCP1/RGCP1 đã nhân hiệu quả hai gen *kmt1* và *gcp* từ khuôn mẫu DNA tổng số, tuy nhiên phản ứng multiplex PCR với điều kiện ghép cơ học thành phần của phản ứng PCR đơn ở nhiệt độ gắn mồi 55°C (theo điều kiện PCR của cặp mồi FGCP1/RGCP1) cho kết quả sản phẩm PCR là hai băng với kích thước mong đợi nhưng mờ hơn so với phản ứng PCR đơn lẻ. Điều

này gợi ý hai cặp mồi này có thể sử dụng cho phản ứng multiplex PCR nhưng cần tối ưu điều kiện phản ứng để nâng cao hiệu quả nhân gen. Đặc biệt phản ứng multiplex PCR với hai cặp mồi KMT1 và GC1 không nhân các băng không đặc hiệu khi sử dụng DNA khuôn là DNA từ các vi khuẩn khác (Hình 1, giếng số 4, 5).

Các nghiên cứu trước đây về kỹ thuật multiplex PCR gợi ý rằng để có thể áp dụng thành công phương pháp này cần xem xét mối liên hệ giữa nồng độ của các mồi dùng trong phản ứng, nồng độ của đệm PCR, nồng độ MgCl<sub>2</sub> so với nồng độ dNTPs, nhiệt độ gắn mồi, lượng DNA khuôn và enzyme taq DNA polymerase, trong đó tối ưu nồng độ mồi cho mỗi gen đích là một tiêu chí cần thiết [27].

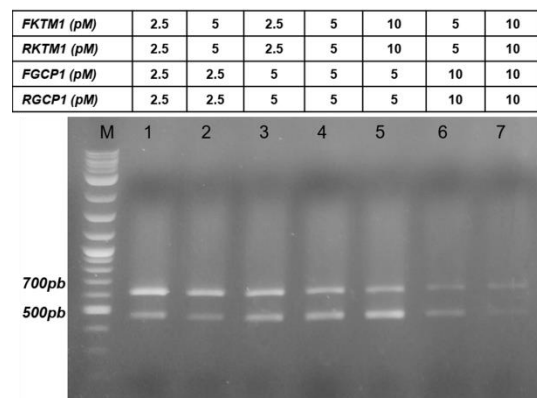


**Hình 2.** Xác định tự huyết trùng bằng multiplex PCR sử dụng mồi FKMT1/RKMT1 và FGCP1/RGCP1. M. 1kb DNA ladder Marker Plus (NEB, Anh), 1. PCR khuếch đại gen *kmt1* từ *P. multocida*, 2. PCR khuếch đại gen *gcp* từ *M. haemolytica*, 3. Multiplex PCR khuếch đại gen *kmt1* và *gcp* từ *P. multocida* và *M. haemolyticam*, 4. Multiplex PCR khuếch đại gen *kmt1* và *gcp* từ *P. multocida* và *F. necrophorum*, 5. Multiplex PCR khuếch đại gen *kmt1* và *gcp* từ *E. coli* và *F. necrophorum*

### 3.2 Tối ưu điều kiện của phản ứng multiplex PCR để phát hiện *P. multocida* và *M. haemolytica*

Trong nghiên cứu này, do điều kiện gắn mồi tối ưu cho phản ứng PCR đơn cho FGCP1/RGCP1 (55°C) và FKMT1/RKMT1 (56°C) không có sự khác biệt lớn nên việc tối ưu nhiệt độ gắn mồi không phải là nhân tố chính mà nồng độ DNA khuôn, nồng độ mồi sử dụng được kiểm tra đầu tiên. Theo kết quả khảo sát thì việc tăng nồng độ DNA khuôn và giữ nguyên nồng độ mồi (10 pM mỗi mồi) và

nhiệt độ gắn mồi ở 55°C không có ảnh hưởng đáng kể tới độ sáng của hai băng sản phẩm DNA trong phản ứng multiplex PCR trong khi giảm nồng độ các DNA khuôn đi 100 lần (tương ứng với 1 ng mỗi loại) thì không xuất hiện băng DNA nữa (kết quả không trình bày trong công bố này). Điều đáng lưu ý là khi giảm nồng độ mồi xuống thì các băng DNA xuất hiện rõ nét hơn. Theo kết quả ở hình 2 thì khi sử dụng cặp mồi FKMT1/RKMT1 ở nồng độ mỗi mồi là 2,5 pM thì gen *kmt1* sáng rõ nhất, nhưng ở cùng nồng độ thì cặp mồi FGCP1/RGCP1 thể hiện hiệu quả nhân gen *gcp* kém hơn (giếng số 1). Kết quả tương tự được quan sát khi tăng nồng độ của cặp mồi FKMT1/RKMT1 ở nồng độ mỗi mồi là 5 pM và giữ nguyên nồng độ của cặp mồi FGCP1/RGCP1. Điều đáng lưu ý là khi giữ nồng độ của cặp mồi FKMT1/RKMT1 ở nồng độ 2,5 pM mỗi loại và tăng nồng độ của cặp mồi FGCP1/RGCP1 lên 5 pM mỗi loại thì sản phẩm nhân gen *gcp* hiệu quả hơn so với sử dụng 2,5 pM mỗi loại (giếng số 3). Đặc biệt khi sử dụng cả 4 mồi ở nồng độ 5 pM mỗi loại hiệu quả của phản ứng multiplex PCR với hai gen có thể được xem là tương đương (giếng số 4) nhưng khi tăng nồng độ của cặp mồi FKMT1/RKMT1 10 pM mỗi loại thì hiệu quả nhân gen *kmt1* lại giảm xuống (giếng số 5) và khi tăng nồng độ của mỗi mồi FGCP1/RGCP1 lên 10 pM thì



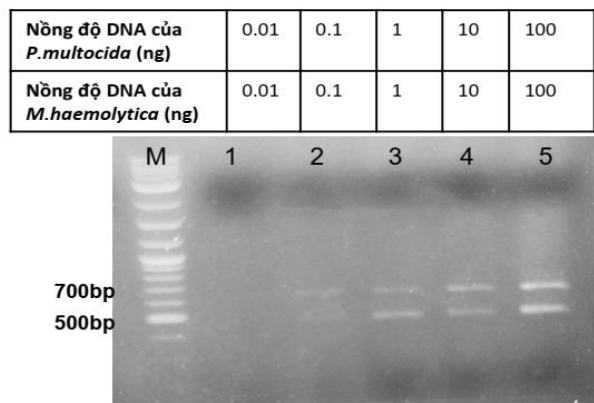
**Hình 1.** Ảnh hưởng của nồng độ mồi tới phản ứng multiplex PCR. M: 1kb DNA ladder Marker Plus (NEB, Anh), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: phản ứng multiplex PCR với nồng độ mồi khác nhau. Nồng độ DNA khuôn là 100 ng mỗi loại.

dù cặp mồi FKMT1/RKMT1 có sử dụng ở 5 hay 10 pM mỗi loại thì phản ứng đều giảm hiệu quả đáng kể (giếng số 6, 7).

Trước đó, Henegariu và cộng sự [28] đã gợi ý nồng độ của các cặp mồi khác nhau rất quan trọng cho thành công của phản ứng multiplex PCR, trong nghiên cứu đó nhóm tác giả đã sử dụng các mồi với nồng độ dao động từ 40 đến 60 pM. Tương tự, nghiên cứu khác của Sint và cộng sự [29] cũng cho rằng nồng độ của các cặp mồi trong phản ứng multiplex PCR cần được khảo sát cẩn thận để có thể khuếch đại tất cả các gen quan tâm, cụ thể trong thí nghiệm để phát hiện 7 tác nhân (*Pardosa* spp.; *Nebria rufescens*; *Oreonebria castanea*; *Mitopus glacialis*; *Nebria jockischii*; *Nebria germari* và *Collembola*) trong một phản ứng thì nhóm tác giả đã sử dụng nồng độ khác nhau của các cặp mồi, dao động từ 100 pM tới 400 pM. So sánh với kết quả của chúng tôi thì nồng độ mồi của các nghiên cứu khác đều cao hơn nhưng về cơ bản từ kết quả này của chúng tôi một lần nữa khẳng định nồng độ mồi có vai trò hết sức quan trọng trong phản ứng multiplex PCR, việc xác định được nồng độ mồi tối ưu là cần thiết để phản ứng diễn ra hiệu quả.

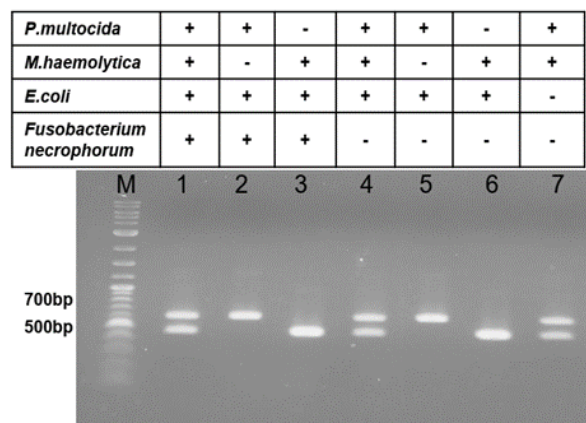
### 3.3 Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp multiplex PCR để phát hiện *P. multocida* và *M. haemolytica*

Sau khi xác định được nồng độ mồi phù hợp cho phản ứng multiplex PCR là 5 pM mỗi loại thì độ nhạy của phản ứng đã được kiểm tra với nồng độ khuôn được pha loãng với tỷ lệ 10 lần, từ 0,01 - 100 ng. Kết quả ở hình 3 gợi ý rằng ở nồng độ 100 ng phản ứng diễn ra hiệu quả, cả hai băng DNA là sản phẩm của hai cặp mồi đều được nhân lên rõ ràng, khi giảm nồng độ khuôn xuống 10 và 100 lần thì băng DNA giảm độ sáng, khi giảm 1000 lần thì băng DNA xuất hiện rất mờ và khi giảm 10000 lần thì băng DNA không xuất hiện nữa. Điều này thể hiện rằng hai cặp mồi của phản ứng multiplex PCR có thể phát hiện ra vi khuẩn *P. multocida* và *M.*



*haemolytica* ở nồng độ khoảng 0.1 ng/phản ứng.

**Hình 3.** Độ nhạy của phản ứng multiplex PCR. M: 1kb DNA ladder Marker Plus (NEB, Anh), 1, 2, 3, 4, 5: phản ứng multiplex PCR với nồng độ khuôn DNA khác nhau. Nồng độ mỗi mồi sử dụng là 5 pM



**Hình 4.** Độ đặc hiệu của phản ứng multiplex PCR. M: 1kb DNA ladder Marker Plus (NEB, Anh), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: phản ứng multiplex PCR tổ hợp DNA khuôn khác nhau, mỗi loại 100 ng; nồng độ mỗi mồi sử dụng là 5 pM

So với kết quả liên quan tới chuẩn đoán *P. multocida* và *M. haemolytica* thì kết quả của chúng tôi có thể xem là có giới hạn phát hiện cao hơn so với công bố của Wisselink và cộng sự [30] khi giới hạn phát hiện 4 tác nhân *P. multocida*, *M. haemolytica*, *Histophilus somni* và *Trueperella pyogenes* vào khoảng từ 1 - 10 fg. Tuy nhiên, trong công bố của Zhang và cộng sự [15] thì phương pháp multiplex PCR của nhóm này có thể phát hiện ra *P. multocida*, *M. haemolytica* và *T. pyogenes* ở nồng độ 40 pg, cao gấp khoảng 2,5 lần so với nghiên cứu của chúng tôi (0,1 ng tương ứng 100 pg). Đặc biệt

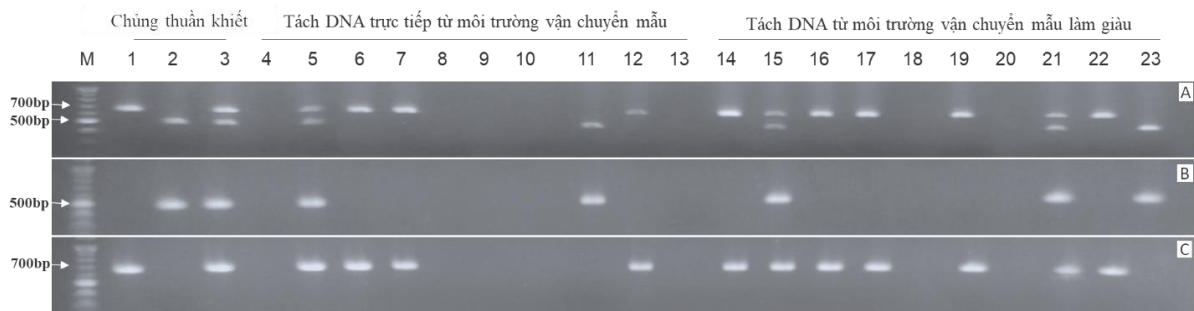
nếu so với phương pháp multiplex PCR để phát hiện một số loại vi khuẩn khác thì phương pháp của chúng tôi có giới hạn phát hiện tương đương với kết quả của Li và cộng sự [20] khi nhóm tiến hành phản ứng multiplex PCR để theo dõi đồng thời 4 tác nhân *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, và *Staphylococcus aureus*. Nhưng cũng có những công bố tiến hành tối ưu nồng độ khuôn cho từng cặp môi và thấy rằng có sự khác nhau về giới hạn phát hiện của DNA cho từng cặp môi nhưng cũng giới hạn ở mức độ picogram [31]. Điều này khẳng định mức độ giới hạn theo dõi của từng phương pháp với các cặp môi khác nhau cho các tác nhân khác nhau là khác nhau, nên khi phát triển một phương pháp mới cho các đối tượng mới cần có sự khảo sát về giới hạn phát hiện để xác định giới hạn theo dõi.

Để kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng, thí nghiệm đã được thiết kế bằng cách bổ sung DNA của *E. coli* và/hoặc *V. alginolyticus* vào phản ứng multiplex PCR. Kết quả ở hình 4 gợi ý rằng sự có mặt của DNA tổng số từ *P. multocida* và *M. haemolytica* là cần thiết cho sự xuất hiện hai băng DNA, sự có mặt/vắng mặt của *E. coli* và/hoặc *V. alginolyticus* không ảnh hưởng tới sự xuất hiện của các băng DNA dù phản ứng có *P. multocida*, *M. haemolytica* hay cả *P. multocida* và *M. haemolytica*. Trước đó Zhang và nhóm nghiên cứu [15] cũng đã báo cáo việc sử dụng cặp môi KMT1 và artJ-lktC có thể phát hiện đặc hiệu sự có mặt của *P. multocida* và *M. haemolytica* dù có bổ sung thêm 1 hay nhiều loại DNA từ nguồn vi sinh vật khác. Không chỉ vậy, kỹ thuật multiplex PCR thực hiện trên các tác nhân gây bệnh khác cũng cho kết quả đặc hiệu khi phối trộn hoặc gây nhiễm nhân tạo các tác nhân khác ngoài tác nhân cần theo dõi [18,20,30]. Điều này gợi ý rằng phản ứng multiplex PCR có thể phát hiện đặc hiệu các tác nhân gây bệnh trong điều kiện có hỗn hợp các loại DNA khuôn.

### 3.4 Đánh giá độ ổn định của phương pháp multiplex PCR để phát hiện *P. multocida* và *M. haemolytica*

Để kiểm tra sự ổn định của phản ứng multiplex PCR chúng tôi đã bước đầu sử dụng một số mẫu thực địa để kiểm tra sự có mặt của hai vi khuẩn *P. multocida* và *M. haemolytica* bằng kỹ thuật multiplex PCR và PCR đơn. Dựa theo kết quả được minh họa ở Hình 5 thì kết quả phản ứng multiplex PCR là đồng thuận với kết quả ở phản ứng PCR đơn. Đối với mẫu DNA tách chiết từ các chủng thuần khiết bằng phương pháp xử lý nhiệt thì các băng xuất hiện tương ứng với loại DNA khuôn được sử dụng (giếng số 1, 2, 3 lần lượt chứa *P. multocida*, *M. haemolytica*, *P. multocida* và *M. haemolytica*). Ở mười giếng tiếp theo, từ 4 – 13, khi sử dụng DNA thô tách trực tiếp từ mẫu hiện trường thì cũng có kết quả tương tự, trong đó có một mẫu có mặt của cả hai tác nhân (giếng số 5), 4 giếng có mặt của *P. multocida* (giếng số 5, 6, 7, 12), một giếng có mặt của *M. haemolytica* (giếng số 11). Điều đáng quan tâm là 10 mẫu này khi được làm giàu vi khuẩn qua đêm trong môi trường BHI thì có hai mẫu dương tính với cả hai vi khuẩn (giếng số 15 và 21), sáu mẫu dương tính với *P. multocida* (giếng số 14, 16, 17, 19, 22), 1 mẫu dương tính với *M. haemolytica* (giếng số 21). Kết quả multiplex PCR đã được kiểm tra lại với PCR đơn và các kết quả là hoàn toàn phù hợp. Tuy nhiên, từ kết quả này có thể thấy rằng nếu sử dụng DNA tách chiết trực tiếp từ môi trường vận chuyển mẫu, khả năng phát hiện tác nhân *P. multocida* và *M. haemolytica* thấp hơn so với DNA tách chiết từ môi trường đã được làm giàu, điều này có thể chủ yếu do mật độ vi khuẩn trong môi trường vận chuyển mẫu thấp dẫn đến nồng độ DNA khuôn thấp hơn giới hạn theo dõi dẫn tới âm tính giả trong khi với môi trường đã được làm giàu mật độ tế bào tăng lên nên hiệu quả chẩn đoán cao hơn, tần suất xuất hiện của tác nhân nhiều hơn. Với một số nghiên cứu mức độ ổn định của phản ứng multiplex PCR cũng có thể được kiểm tra bằng phương pháp giống nhóm nghiên





**Hình 5.** Độ ổn định của phương pháp multiplex PCR để phát hiện *P. multocida* và *M. haemolytica*. A. multiplex PCR, B. PCR đơn với cặp mồi FGCP/RGCP, C. PCR đơn với cặp mồi FKMT1/RKMT1. M: 1kb DNA ladder Marker Plus (NEB, Anh); 1, 2, 3: DNA khuôn lần lượt là *P. multocida*, *M. haemolytica*, *P. multocida* và *M. haemolytica*; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13: DNA khuôn tách chiết trực tiếp từ 10 mẫu hiện trường; 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23: DNA khuôn tách chiết từ mẫu hiện trường đã được làm giàu

cứu của chúng tôi đó là so sánh multiplex PCR với PCR đơn [20]. Tuy nhiên, với một số nghiên cứu khác, họ có thể tiến hành kiểm tra sự ổn định bằng cách kiểm tra hoạt động của phản ứng multiplex PCR bằng cách lây nhiễm nhân tạo tác nhân gây bệnh vào vật chủ và thu mẫu để chẩn đoán [15] hoặc so sánh kết quả của phản ứng multiplex PCR với các phương pháp miễn dịch thông thường trên mẫu bệnh phẩm trong phòng xét nghiệm [18]. Thí nghiệm của chúng tôi không có điều kiện để tiến hành lây nhiễm hai vi khuẩn này vào cừu do vấn đề liên quan tới đạo đức động vật nhưng nhóm nghiên cứu cũng đã tiến hành kiểm tra độ ổn định của phương pháp với một số mẫu hiện trường cung cấp bởi đề tài khoa học và công nghệ thuộc chương trình khoa học và công nghệ cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số CT-2021-01-DHH-02 và thấy rằng có sự thống nhất giữa phương pháp multiplex PCR và PCR đơn, điều này gợi ý rằng phương pháp này là một phương pháp tiềm năng để ứng dụng trong chẩn đoán đồng thời *P. multocida* và *M. haemolytica*.

#### 4 Kết luận

Chúng tôi đã phát triển thành công kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện đồng thời *P. multocida* và *M. haemolytica*, hai tác nhân chính gây bệnh tụ huyết trùng ở cừu Phan Rang với hai cặp mồi FKTM1/RKMT1 và FGCP/RGCP. Phương pháp

này có khả năng phát hiện sự có mặt của hai vi khuẩn này ở nồng độ 0,1 ng và có thể phát hiện đặc hiệu hai gen *kmt1* và *gcp* của *P. multocida* và *M. haemolytica* trong trường hợp có mặt của DNA từ *E. coli* và/hoặc *V. alginolyticus*. Bằng kỹ thuật này chúng tôi có thể phát hiện ra tác nhân gây bệnh trong dịch chứa DNA thô của chúng thuần khiết, hay từ các mẫu hiện trường. Mặc dù nghiên cứu cho thấy kỹ thuật multiplex PCR có tiềm năng trong việc phát hiện trực tiếp tác nhân gây bệnh từ mẫu hiện trường nhưng việc làm giàu vi khuẩn từ các mẫu ngoáy mũi sẽ giúp hạn chế âm tính giả do có những mẫu mật độ vi khuẩn thấp dẫn đến hàm lượng DNA trong mẫu thô dưới ngưỡng theo dõi. Ngành chăn nuôi ngày càng phát triển đồng thời với việc đối mặt với nguy cơ về dịch bệnh, chính vì vậy việc phát triển kỹ thuật multiplex PCR cho tụ huyết trùng cho cừu cần được nghiên cứu áp dụng cho một số đối tượng vật nuôi khác để đánh giá hiệu quả trước khi áp dụng trong thực tế.

#### 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 và nhóm nghiên cứu mạnh mã số: NCM.DHH2020.13.

## Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn TS. Nguyễn Mạnh Tuấn, Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên đã cung cấp chủng *Escherichia coli* ATCC 25922.

## 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. Bùi VL. Đánh giá khả năng thích ứng của giống cừu Phan Rang nuôi ở Thừa Thiên Huế [ Luận án]. Huế: Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế; 2014.
2. Nguyen VP, Le CT, Nguyen XH, Nguyen MT, Nguyen KCT. First study on capsular serotypes and virulence factors of *Pasteurella multocida* isolates from Phan Rang sheep in Vietnam. *Veterinary World*. 2023;16(2).
3. Trần QH. Nghiên cứu sinh trưởng của cừu Phan Rang nuôi tại Tây Nguyên. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. 2005;1(Tháng 1):51-53.
4. Bùi VL, Nguyễn XB. Xác định một số chỉ tiêu sinh lý của cừu Phan Rang nuôi ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và phát triển nông thôn*. 2015;108(9).
5. Nguyễn ĐT, Ngô HBT, Lê MT, Nguyễn TTH. Khảo sát các chỉ tiêu sinh trưởng của cừu Phan Rang khi sử dụng thức ăn ủ chua. *Tạp chí khoa học Đại học Thủ Dầu Một*. 2021;2(51):40-47.
6. Nguyễn HD, Nguyễn PS, Lê VGN. Phân tích chuỗi giá trị thịt cừu tỉnh Ninh Thuận. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 2016;1(62):98-104.
7. Nguyễn NT, Lê VL, Lê TL, Trần TV, Hoàng TT. Đa dạng di truyền cừu Phan Rang dựa vào trình tự nucleotide gen coi ở ty thể. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*. 2022;273(Tháng 1):32-37.
8. Nguyễn ĐT, Lê L, Đào DH, Đặng VT, Trương CT, Lê ĐH. Nghiên cứu vai trò của *Mannheimia haemolytica* và *Pasteurella multocida* trong bệnh tụ huyết trùng ở dê, cừu tại 3 tỉnh Ninh Thuận, Khánh Hòa, Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học Công nghệ: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 2008;5:46-51.
9. Nguyễn TKC, Nguyễn HT, Nguyễn TD, Nguyễn TO, Hồ TXT, Bùi VL, et al. Nghiên cứu phát hiện vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây bệnh tụ huyết trùng ở cừu Phan Rang bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*. Accepted submission (In-Press).
10. Nguyen VP, Le CT, Ho XTT, Trương PH, Bùi VL, Nguyen KCT. First Report of Antimicrobial Resistance of *Mannheimia haemolytica* from Phan Rang Sheep in Vietnam. *Pakistan veterinary journal*. 2023;1(43):41-48.
11. Marru HD, Anijajo TT, Hassen AA. A study on Ovine pneumonic pasteurellosis: Isolation and Identification of *Pasteurellae* and their antibiogram susceptibility pattern in Haramaya District, Eastern Hararghe, Ethiopia. *BMC Veterinary Research*. 2013;9(1):1-8.
12. Singh F, Sonawane GG, Meena RK. Pathology, isolation and characterisation of virulent and diverse *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with fatal pneumonia in sheep, Rajasthan, India. *Comparative Clinical Pathology*. 2019;28(2):531-540.
13. Watson PJ, Davies RL. Outbreak of *Pasteurella multocida* septicaemia in neonatal lambs. *The Veterinary Record*. 2002;151(14):420-422.
14. Chakraborty S, Kumar A, Tiwari R, Rahal A, Malik Y, Dhama K, et al. Advances in Diagnosis of Respiratory Diseases of Small Ruminants. *Veterinary Medicine International* 2014;1-16.
15. Zhang W, Liu X, Liu M, Ma B, Xu L, Wang J. Development of a multiplex PCR for simultaneous detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and *Trueperella pyogenes*. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2017;65(3):327-339.
16. 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.
17. Sahay S, Natesan K, Prajapati A, Kalleshmurthy T, Shome BR, Rahman H, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from ovine respiratory infection: A study from Karnataka, southern India. *Veterinary World*. 2020;13(9):1947-1954.

18. Sea-Liang N, Sereemasapun A, Patarakul K, Gaywee J, Rodkvamtook W, Srisawat N, et al. Development of multiplex PCR for neglected infectious diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(7):e000744.
19. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(4):559-570.
20. Li P, Zhang D, Li H, Pang J, Guo H, Qiu J. Establishment and Application of Multiplex PCR for Simultaneously Detecting *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* in Minks. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7(November):1-9.
21. 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.
22. Moore MK, Cicnjak-Chubbs L, Gates RJ. A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avian and environmental samples. *Avian Diseases*. 1994;317-324.
23. Kumar J, Dixit SK, Kumar R. Rapid detection of *Mannheimia haemolytica* in lung tissues of sheep and from bacterial culture. *Veterinary World*. 2015;8(9):1073-1077.
24. Dassanayake RP, Call DR, Sawant AA, Carol Casavant N, Weiser GC, Knowles DP, et al. *Bibersteinia trehalosi* Inhibits the growth of *mannheimia haemolytica* by a proximity-dependent mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(4):1008-1013.
25. Shanthalingam S, Goldy A, Bavananthasivam J, Subramaniam R, Batra SA, Kugadas A, et al. PCR assay detects *Mannheimia haemolytica* in culture-negative pneumonic lung tissues of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) from outbreaks in the western USA, 2009–2010. *Journal of Wildlife Diseases*. 2014;50(1):1-10.
26. Kumar J, Swarnkar CP, Sonawane GG, Pandian SJ, Kumar R. Detection of *Mannheimia Haemolytica* in culture and lung tissue of lambs by real-time polymerase chain reaction assay . *Indian Journal of Small Ruminants (The)*. 2019;25(2):186-191.
27. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2002;16(1):47-51.
28. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997;23(3):504-511.
29. Sint D, Raso L, Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*. 2012;3(5):898-905.
30. Wisselink HJ, Cornelissen JBWJ, van der Wal FJ, Kooi EA, Koene MG, Bossers A, et al. Evaluation of a multiplex real-time PCR for detection of four bacterial agents commonly associated with bovine respiratory disease in bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Veterinary Research*. 2017;13(1):1-10.
31. Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(5):3183-3187.