

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TỬ TRONG CHẨN ĐOÁN *PASTEURELLA MULTOCIDA* VÀ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* Ở ĐỘNG VẬT

Lê Công Tuấn¹, Hồ Thị Xuân Túy², Nguyễn Thị Diệu Thế², Nguyễn Thị Thu Thảo²,
Hoàng Thị Ngọc Hân³, Nguyễn Thị Diễm², Nguyễn Văn Phú², Nguyễn Hữu Thọ², Nguyễn Thị Oanh²,
Nguyễn Thị Kim Cúc², Nguyễn Xuân Huy^{4*}

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, TP Huế, Việt Nam

² Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tư, Phường Phú Thượng, TP Huế, Việt Nam

³ Sở Tài nguyên và Môi trường tỉnh Quảng Trị, 227 Hùng Vương, TP. Đông Hà, Việt Nam

⁴ Đại học Huế, 3 Lê Lợi, TP Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Xuân Huy <nguyensexuanhuy@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 09-12-2023; Hoàn thành phản biện: 05-01-2024; Ngày chấp nhận đăng: 03-05-2024)

Tóm tắt. *P. multocida* và *M. haemolytica* là những tác nhân chính gây ra tụ huyết trùng trên nhiều loại gia súc, gia cầm dẫn tới những thiệt hại kinh tế lớn cho ngành chăn nuôi. Để phát hiện những vi khuẩn này, một số phương pháp truyền thống đã được sử dụng từ những năm 80 của thế kỷ XX. Mặc dù không thể phủ nhận vai trò của những phương pháp truyền thống trong chẩn đoán tụ huyết trùng ở giai đoạn đầu nhưng những phương pháp này rất hạn chế về độ nhạy và độ đặc hiệu, vì vậy nhiều phương pháp chẩn đoán hiện đại dựa dựa vào trình tự hệ gen của vi khuẩn đã được áp dụng để nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu và độ ổn định của xét nghiệm. Báo cáo này dựa trên những kết quả của nhóm nghiên cứu, các công bố liên quan tới chẩn đoán, định tuýp và nghiên cứu đa hình tụ huyết trùng bằng kỹ thuật PCR, multiplex PCR, real-time PCR và LAMP và phân tích những điểm mạnh, điểm yếu của từng phương pháp nhằm đánh giá toàn diện hơn về ứng dụng chỉ thị phân tử trong chẩn đoán tụ huyết trùng.

Từ khóa: LAMP, PCR, *P. multocida*, *M. haemolytica*, multiplex PCR, real-time PCR

Molecular detection methods for *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*

Le Cong Tuan¹, Ho Thi Xuan Tuy², Nguyen Thi Dieu The², Nguyen Thi Thu Thao²,
Hoang Thi Ngoc Han³, Nguyen Thi Diem², Nguyen Van Phu², Nguyen Huu Tho², Nguyen Thi Oanh²,
Nguyen Thi Kim Cuc², Nguyen Xuan Huy^{4*}

¹ Hue University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

² Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue, Vietnam

³ Department of Natural resources and Environment of Quang Tri, Dong Ha, Vietnam

⁴ Hue University, 3 Le Loi St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Xuan Huy <nguyensexuanhuy@hueuni.edu.vn>

(Received: 09 December 2023; Revised: 05 January 2024; Accepted: 03 May 2024)

Abstract. *P. multocida* and *M. haemolytica* are the main bacteria causing pasteurellosis in household animals, leading to extensive economic losses for the livestock industry. Different traditional methods have been used since the 1980s to detect *P. multocida* and *M. haemolytica* infection. Although these methods help diagnose pasteurellosis in the early stages, they are limited in sensitivity and specificity. Therefore, modern diagnostic methods that rely on bacterial genomics to improve sensitivity, specificity, and stability have developed. This report is based on our team's results and published papers related to diagnosis, typing, and polymorphism of pasteurellosis via PCR, Multiplex PCR, real-time PCR, and LAMP and analyze the advances and drawbacks of each method to provide a comprehensive view of pasteurellosis diagnosis.

Keywords: LAMP, PCR, *P. multocida*, *M. haemolytica*, multiplex PCR, real-time PCR

1 Mở đầu

Pasteurellaceae là một họ vi khuẩn Gram âm gồm các chi *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, và *Mannheimia*, hầu hết trong số chúng đều có khả năng gây bệnh ở động vật, đặc biệt các chủng gây bệnh thường bám vào niêm mạc khoang miệng, đường hô hấp và sinh dục [1]. Trong chi *Pasteurella* có ít nhất khoảng 20 loài và 3 dưới loài [2], trong đó *P. multocida* là tác nhân gây bệnh chính trong chi này. Bên cạnh đó, *M. haemolytica* là tác nhân gây bệnh chính của chi *Mannheimia*. Cả *P. multocida* và *M. haemolytica* đều là tác nhân có phổ vật chủ rộng, bao gồm hầu hết các loại động vật như bò, dê, cừu... [3-5]. Hai loài này đều là vi khuẩn gram âm và có kích thước nhỏ từ 0,2-2 μm , chúng được coi là mầm bệnh cơ hội và có khả năng tồn tại trong vật chủ mà không gây bệnh trong điều kiện bình thường [6, 7]. Hai vi khuẩn này có một số đặc trưng về đặc điểm hoá sinh để có thể phân biệt với các loài thuộc họ khác như khả năng sinh enzyme oxidases, khả năng lên men các loại carbohydrate, khả năng sinh một số chất khử nitrate [5]. *P. multocida* được xác định là có 5 tuýp huyết thanh vô nhày gồm các tuýp A, B, D, E, F; ngoài ra có 16 tuýp huyết thanh từ 1-16, trong khi đó đối với *M. haemolytica* số lượng tuýp huyết thanh vô nhày chưa được ghi nhận hết, nhưng ít nhất có 12 tuýp đã được công bố bao gồm 1-2, 5-9, 12-14, 16, 17 [8]. Các tuýp huyết thanh vô nhày vô cùng quan trọng do nó liên quan tới sự đặc hiệu tương tác với vật chủ và khả năng gây bệnh của hai loài vi khuẩn này.

Hiện nay bệnh do *P. multocida* và *M. haemolytica* có thể được kiểm soát bằng vaccine và một số loại kháng sinh nhưng việc chẩn đoán phát hiện sự có mặt của chúng cùng việc định loại tuýp huyết thanh vẫn đóng vai trò quan trọng trong việc tầm soát và xử lý bệnh hiệu quả. Trong nghiên cứu này chúng tôi cung cấp các thông tin về các kỹ thuật phân tử sử dụng trong việc phát hiện, định tuýp và nghiên cứu đa hình trong quần thể những vi khuẩn này.

2 Chẩn đoán *P. multocida* và *M. haemolytica* bằng phương pháp PCR đơn gen

Từ những năm 1955, *P. haemolytica* (nay là *M. haemolytica*) đã được xem là nguyên nhân gây nên hiện tượng xuất huyết ở cừu non [9]; sau đó nhiều nghiên cứu đã phát hiện tụ huyết trùng, cụ thể là *P. haemolytica* đã được đề cập tới trong nhiều nghiên cứu [10-15] nhưng hầu hết các nghiên cứu này đều dựa vào triệu chứng lâm sàng, giải phẫu động vật hoặc nuôi cấy vi sinh. Tới năm 1996 nhóm nghiên cứu của Davies [16] đã khuếch đại gen mã hoá r16S phân tích sự đa dạng của các loài *P. haemolytica*. Sau này khi kỹ thuật PCR được áp dụng rộng rãi hơn, việc chẩn đoán *P. multocida* và *M. haemolytica* bằng phương pháp này cũng nhanh chóng được thực hiện. Từ 1997, nhóm nghiên cứu của Kasten [17] đã sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen *pls* của *P. multocida* để phát hiện vi khuẩn này trong đàn gà tây và nhận thấy ngưỡng phát hiện thấp nhất của

phương pháp này là 10 vi khuẩn hoặc tương ứng khoảng 24 pg DNA tinh sạch. Ngay tiếp sau đó nhóm nghiên cứu của Townsend [18] ngoài việc thiết kế thành công mỗi đặc hiệu để nhân gen *kmt1*, còn thiết kế được một cặp mồi định tuýp *P. multocida* B:2; B:5 và B:2,5. Không chỉ *P. multocida*, *P. haemolytica* cũng được định tuýp bằng phương pháp PCR, cụ thể Angen và nhóm nghiên cứu [19] đã dựa vào các cụm gen r16S để xác định chi mới, chi *Mannheimia*, và *P. haemolytica* chính thức được đổi tên thành *M. haemolytica*. Đây có thể nói là những nghiên cứu đầu tiên ứng dụng PCR để chuẩn đoán phát hiện và định tuýp của *P. multocida* và *M. haemolytica*. Tuy nhiên, các nghiên cứu sau này khẳng định gen *psl* sử dụng bởi Kasten và cộng sự [17] có sự tương đồng lớn với *H. influenza*, điều này có thể không phải là vấn đề lớn khi chẩn đoán trên gia cầm do không tìm thấy *H. influenzae* trong các mẫu gia cầm nhưng vẫn có nguy cơ dương tính giả khi các mẫu nghiên cứu có *H. influenzae* thay vì *P. multocida* [20]. Tương tự nghiên cứu của nhóm Townsend [18], Lee và cộng sự [21] cũng phát triển phương pháp PCR dựa trên thiết kế mồi nhân gen *kmt1* phát hiện *P. multocida* trong ruột gà đã khử trùng thành công nhưng không phát hiện được vi khuẩn này trong mô chưa khử trùng. Đặc biệt, nghiên cứu của Lee [21] gợi ý việc làm giàu *P. multocida* trong môi trường BHI (brain heart infusion broth) giúp cho phản ứng PCR hiệu quả hơn. Việc chẩn đoán phát hiện và định tuýp *P. multocida*, *M. haemolytica* bằng PCR sau thời điểm năm 2000 ngày càng phổ biến với những công bố điển hình của nhóm [18, 22–30].

Ngoài ra một số biến thể của PCR như repetitive extragenic palindromic sequence (REP-PCR) hay phương pháp khuếch đại đoạn cắt giới hạn (RFLP-PCR), phương pháp phân tích đa hình đoạn DNA khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD, random amplified polymorphic DNA) cũng được sử dụng trong việc xác định đặc điểm phân tử của một số chủng, đặc biệt là xác định đa hình các

chủng trong 1 tuýp huyết thanh từ các đàn/vật chủ khác nhau nhưng không quá phổ biến [31–35]. Trong phương pháp REP-PCR, nhóm nghiên cứu đã thiết kế cặp mồi phổ quát (universal primer) để nhân các trình tự lặp lại palindromic trong hệ gen của vi khuẩn để đánh giá mức độ đa hình. Đối với phương pháp RFLP-PCR, nhóm nghiên cứu của Jabbari [32] đã phối hợp PCR và RFLP để thực hiện việc xác định kiểu gen của một số chủng *P. multocida* phân lập từ gia cầm, nhóm tác giả đã nhân gen *ompH* từ các chủng *P. multocida* phân lập bằng cặp mồi đặc hiệu và tiến hành cắt sản phẩm PCR của gen *ompH* bằng 3 enzyme *EcoRI*, *foI* và *HindIII* để thu được các đoạn cắt giới hạn khác nhau. Tương tự, nhóm cũng áp dụng phương pháp này để phân tích kiểu gen của các chủng *P. multocida* phân lập từ bò và cừu [33]. Từ những kết quả này các tác giả đã gợi ý việc có thể sử dụng phương pháp này để xác định kiểu gen cho những chủng *P. multocida* phân lập từ các vật chủ khác nhau. Ngoài ra, các chủng *P. multocida*, *P. haemolytica* cũng có thể được xác định bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch [36] hoặc bằng kỹ thuật PCR [37], sau đó các chủng này có thể được tiếp tục phân tích đa hình sử dụng các mồi ngẫu nhiên (RAPD).

Nhờ việc áp dụng PCR và các biến thể của PCR vào chuẩn đoán phát hiện hay định tuýp của *P. multocida*, *M. haemolytica* đã trở nên dễ dàng, nhanh chóng và chính xác hơn nhiều so với những phương pháp truyền thống, tuy nhiên phương pháp này cũng có những hạn chế đó là yêu cầu thiết bị hiện đại, hoá chất đắt tiền và đặc biệt cần những người thực hiện được đào tạo chuyên sâu.

3 Chẩn đoán *P. multocida* và *M. haemolytica* bằng phương pháp multiplex PCR

Kỹ thuật multiplex PCR thực chất là kỹ thuật PCR thông thường được cải biến bằng cách

sử dụng nhiều hơn một cặp mồi trong một phản ứng nhằm khai thác tối đa hiệu quả của phản ứng [38]. Kỹ thuật này ngay sau khi được đưa ra đã được đông đảo các nhà khoa học, các nhóm nghiên cứu áp dụng rộng rãi cho lĩnh vực chẩn đoán phân tử bao gồm việc xác định hiệu quả của việc xoá gen [39, 40], nghiên cứu đột biến, đa hình [41, 42], chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm với các tác nhân khác nhau, ung thư,... [29, 43–46], do nó thể hiện ưu điểm nổi bật hơn so với PCR truyền thống, đặc biệt là việc tiết kiệm thời gian, chi phí và công sức nhưng vẫn đảm bảo được kết quả thí nghiệm. Phương pháp multiplex PCR cũng được áp dụng hiệu quả trong việc chuẩn đoán *P. multocida* và/hoặc *M. haemolytica* với các tác nhân khác. Kỹ thuật này đã được sử dụng để phát hiện *P. multocida* trong các mẫu có nhiễm với nhiều tác nhân gây bệnh, cụ thể Wei và cộng sự [47] đã phát triển phương pháp để phát hiện sự hiện diện của đồng thời bốn tác nhân *P. multocida*, *Salmonella enterica*, *Riemerella anatipestifer*, và *Escherichia coli* gây bệnh trên vịt trong cùng một phản ứng và không tạo ra các sản phẩm không đặc hiệu kể cả khi mẫu bị nhiễm đồng thời các tác nhân vi khuẩn khác như *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *M. gallinarum*, *M. synoviae*, và *M. gallisepticum*. Tương tự, *P. multocida* cũng được phát hiện đồng thời cùng 3 tác nhân khác gồm *A. pleuropneumonia*, *H. parasuis* và *Bordetella bronchiseptica* trong các mẫu lấy từ lò mổ lợn [48]. Nhóm nghiên cứu này đã khẳng định phản ứng multiplex này không bị ảnh hưởng dù có tái nhiễm thêm với 1, 2, hoặc 3 tác nhân gây bệnh khác. Trong cả hai nghiên cứu của Wei [47], và Ly [48] đều sử dụng mồi để nhân gen *kmt1*, tuy nhiên các cặp mồi được thiết kế khác nhau cho mỗi nghiên cứu để đảm bảo tính đặc hiệu của phản ứng. *M. haemolytica* cũng được phát hiện trong các mẫu bệnh phẩm đồng thời với một số tác nhân khác, trong năm 2018, Tatatabae [49], và Abinet [50] đã công bố hai phương pháp multiplex PCR để phát hiện *M. haemolytica*. Trong

nghiên cứu của Tatatabae [49], 3 cặp mồi (Lkt; HP và r16S) đã được sử dụng để tăng cường khả năng phát hiện đặc hiệu *M. haemolytica* từ cừu ở Iran. Để phát hiện *M. haemolytica* bằng phản ứng multiplex PCR, nhóm nghiên cứu của Abinet [50] đã sử dụng hai cặp mồi RPT2 và PHSSA để nhân vi khuẩn này ở cừu của Ethiopia và một nghiên cứu tương tự của Nguyen [29] cũng công bố sử dụng thành công phản ứng multiplex PCR với hai cặp mồi RPT2 và PHSSA để phát hiện *M. haemolytica* ở cừu Phan Rang của Việt Nam. Một nghiên cứu gần đây của Nguyễn Thị Thu Thảo và cộng sự [51] đã sử dụng mồi KMT1 và GCP1 để phát hiện đồng thời hai tác nhân *P. multocida* và *M. haemolytica* ở cừu Phan Rang trong cùng một phản ứng, đặc biệt bài báo này đã chẩn đoán thành công một số mẫu hiện trường thông qua sử dụng khuôn mẫu từ DNA thô, thu từ việc xử lý nhiệt vi khuẩn đã được làm giàu trong nước có triton X. Ngoài ra kỹ thuật này còn được sử dụng để phân loại các chủng *P. multocida* dựa vào gen mã hoá phân tử LPS (lipopolysaccharide) [52]; xác định gen độc lực của các chủng *P. multocida* phân lập từ các mẫu bệnh phẩm [53]; phân loại tuýp huyết thanh vỏ nhày của các chủng *M. haemolytica* [54]; *P. multocida* [27]; để phát hiện các dưới loài của *P. multocida* [55]. Các công bố đã được liệt kê ở trên đều áp dụng thành công phản ứng PCR hoặc là để phát hiện nhiều tác nhân trong cùng 1 phản ứng hoặc phát hiện đặc hiệu một tác nhân thông qua việc sử dụng các cặp mồi khác nhau để nhân nhiều gen đích và dù theo phương thức nào thì đều hướng tới một mục tiêu chung đó là tiết kiệm chi phí, nâng cao hiệu quả và chất lượng chẩn đoán, đây chính là những tiêu chí quan trọng để áp dụng phương pháp này trong thực tế. Multiplex PCR mặc dù có những ưu điểm không thể phủ nhận nhưng cũng có những hạn chế nhất định như phản ứng phức tạp hơn, hiệu quả khuếch đại thấp hơn, hiệu quả khuếch đại còn bị ảnh hưởng bởi nguồn mẫu khác nhau cho phản ứng [56,57].

4 Chẩn đoán *P. multocida*, *M. haemolytica* bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt (Loop-mediated isothermal Amplification-LAMP)

LAMP là một kỹ thuật khuếch đại DNA trong điều kiện đẳng nhiệt (isothermal) được nhóm nghiên cứu của Notomi [58] lần đầu tiên công bố năm 2000 nhằm khuếch đại hiệu quả, đặc hiệu và nhanh chóng tác nhân được quan tâm. Khác với những phương pháp phát hiện DNA dựa trên nguyên lý của PCR, LAMP sử dụng 4 môi để nhận ra 6 trình tự khác nhau của phân tử DNA đích, và đặc biệt phương pháp này được thực hiện mà không cần máy luân nhiệt. Với những ưu điểm vượt trội, LAMP đã nhanh chóng được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán nhiều loại tác nhân gây bệnh khác nhau [59–68]. Kỹ thuật LAMP đã được áp dụng lần đầu để chẩn đoán *P. multocida* trên lợn và trong nghiên cứu này tác giả đã hoàn thiện phản ứng Pm-LAMP dùng môi thiết kế cho gen *kmt1* trong một giờ ở 63°C, với ngưỡng phát hiện tối thiểu đạt 10 vi khuẩn/mL, được xem là nhạy hơn PCR 10 lần, với độ nhạy đạt 100% và độ đặc hiệu là 90,9% [69]. Đặc biệt, nhóm nghiên cứu có thể phát hiện được kết quả dương tính bằng cách bổ sung thuốc nhuộm huỳnh quang quan sát dưới đèn cực tím mà không cần bước điện di. Nghiên cứu này đã gợi ý đây là một phương pháp hữu hiệu để phát hiện *P. multocida* ở giai đoạn sớm một cách nhanh chóng [69]. Tương tự, nghiên cứu của Moustafa và cộng sự [70] đã phát triển hai phương pháp LAMP, một để phát hiện sự có mặt của *P. multocida* gọi là Pm-LAMP và một để xác định các chủng *P. multocida* tuýp B2, có khả năng gây xuất huyết (hemorrhagic septicemia-HS) còn gọi là HS-LAMP trên trâu bò. Nhóm nghiên cứu của Moustafa [70] cũng rút ngắn thời gian phản ứng của Pm-LAMP xuống còn trên 30 phút với lượng mẫu chỉ cần 10 pg, độ đặc hiệu và độ nhạy lần lượt là 93% và 91%, và HS-LAMP chỉ còn 27 phút

với lượng mẫu tối thiểu là 5 pg, với tỷ lệ đặc hiệu 93% và độ nhạy đạt 97%. Như vậy, với nghiên cứu của Moustafa và cộng sự [69] đã giảm thời gian của phản ứng LAMP còn một nửa so với nghiên cứu đầu tiên của Sun và cộng sự, và đáng lưu ý là phản ứng này có thể nhận ra tuýp huyết thanh B2 của *P. multocida* là tuýp có khả năng gây xuất huyết [70]. Sau đó, tới năm 2022, có ba nhóm nghiên cứu tập trung vào phát triển LAMP, nhóm thứ nhất của Akondi [71] đã áp dụng kỹ thuật LAMP cho chẩn đoán *P. multocida* trên trâu dựa trên gen *kmt1* tương tự như Sun và cộng sự [69] nhưng lựa chọn vị trí gắn môi khác; với sự thay đổi này nhóm nghiên cứu đã hoàn thành phản ứng sau 45 phút với cho rằng độ nhạy cả phương pháp LAMP trong nghiên cứu này gấp 10^4 lần so với PCR thông thường. Đối với hai nghiên cứu còn lại, nhóm tác giả đã tập trung phát hiện 3 tác nhân gồm *P. multocida*, *M. haemolytica* và *Histophilus somni* [72, 73]. Mohan và cộng sự [72] đã phối hợp 12 môi (4 môi cho mỗi tác nhân) để phát hiện sự có mặt của tối thiểu 10^4 bản sao DNA của các tác nhân với độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 97%, 99% và 89%. Đây là lần đầu tiên kỹ thuật LAMP được áp dụng cho cùng lúc 3 tác nhân, bao gồm cả *P. multocida* và *M. haemolytica*. Cùng mục đích phát hiện nhiều tác nhân trong phản ứng LAMP, Garrigos đã phát triển kỹ thuật LAMP để áp dụng trực tiếp tại trang trại, khai thác tối đa một trong những thế mạnh của LAMP là sự thay đổi pH của thành phần hoá chất sau phản ứng, điều này có thể nhận ra dễ dàng bằng cách bổ sung chất chỉ thị pH (không cần chỉ thị huỳnh quang). Với ý tưởng này, nhóm tác giả đã có thể phát hiện ra phản ứng dương tính nhờ kiểm tra sự thay đổi màu sắc của ống PCR sau phản ứng. Nhóm nghiên cứu của Garrigos [73] đã thành công phát hiện sự có mặt của *P. multocida*, *M. haemolytica* và *H. somni* ở trang trại bằng phương pháp LAMP dựa trên phương pháp so màu với độ nhạy đạt từ 66,7-100%, độ đặc hiệu 100% với thời gian 60 phút (bao gồm cả bước so màu). Với công bố này, nhóm tác

giả đã mở ra một triển vọng to lớn cho ứng dụng LAMP trong trang trại chăn nuôi nhờ việc chuyển giao quy trình công nghệ để các chủ trại có thể thực hiện quy trình dựa theo tài liệu hướng dẫn với 1 block nhiệt có thể điều chỉnh nhiệt trong dải hoạt động 60-65°C mà không cần các máy luân nhiệt đắt tiền, khó sử dụng. Trong công bố gần đây nhất, Dassanayake và nhóm nghiên cứu [74] đã xác định *M. haemolytica* tuýp 1 và 2 thành công bằng phản ứng LAMP, nhóm đã khẳng định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp so màu LAMP cho mỗi tuýp đều đạt 100% và giới hạn theo dõi đạt từ 1-100 bản sao DNA cho 1 phản ứng. Từ những kết quả nghiên cứu liên quan tới phản ứng LAMP để phát hiện *P. multocida* hoặc/và *M. haemolytica* cho thấy đây là một phương pháp tiềm năng cho việc áp dụng kỹ thuật này vào thực tiễn do những điểm mạnh của phương pháp này như sự khuếch đại được thực hiện theo chu trình đẳng nhiệt dẫn tới không yêu cầu máy luân nhiệt, có thể quan sát kết quả phản ứng dựa vào chất nhuộm huỳnh quang bằng cách soi trực tiếp ống phản ứng dưới đèn UV do hiệu quả nhân gen cực kì tốt, dẫn tới lượng DNA đậm đặc trong ống phản ứng có thể kết hợp trực tiếp với thuốc nhuộm, bên cạnh đó do sự thay đổi pH phản ứng trong quá trình thực hiện, phản ứng dương tính của LAMP còn có thể phát hiện dễ dàng bằng phương pháp so màu, đây chính là điểm mạnh đã và đang được khai thác hiệu quả để có thể áp dụng rộng rãi phương pháp này trong thực tiễn.

Mặc dù có rất nhiều điểm mạnh nhưng cũng phải khẳng định rằng LAMP vẫn có những điểm cần xem xét khi triển khai trên diện rộng, hạn chế đáng lưu ý nhất của phương pháp này là hiện tượng dương tính giả, điều này có thể là do thao tác làm lây nhiễm các sản phẩm khuếch đại của phản ứng LAMP trước đó vào các hoá chất hoặc vào trực tiếp phản ứng [72]. Vì vậy cần lưu ý để hạn chế tối đa hiện tượng này bằng cách thực hiện phản ứng ở các khu vực khác nhau để tránh

lây nhiễm chéo phản ứng, đồng thời cần chia nhỏ hoá chất để hạn chế nguồn nhiễm và cũng có thể dùng UDG (Uracil-DNA glycosylases) và UTP (Uracil-DNA glycosylases) để loại bỏ các cụm khuếch đại từ phản ứng LAMP trước đó trong môi trường phản ứng [75].

5 **Chẩn đoán *P. multocida*, *M. haemolytica* bằng phương pháp real-time PCR**

Cũng giống như một số tác nhân gây bệnh khác, kỹ thuật real-time PCR hay còn gọi là PCR định lượng đã được sử dụng rộng rãi trong việc chẩn đoán và định tuýp các chủng *P. multocida* hoặc/và *M. haemolytica*. Nghiên cứu của Guenther và cộng sự cho thấy kỹ thuật real-time PCR có một số điểm thuận lợi hơn kỹ thuật PCR trong chuẩn đoán và đã phát triển kỹ thuật này nhằm phân biệt các loài trong chi *Mannheimia*, bao gồm năm loài *M. haemolytica*, *M. varigena*, *M. ruminalis*, *M. granulomatis* và *M. glucosida* từ chủng nuôi cấy cũng như từ các mẫu mô của nhiều động vật khác nhau (bò, cừu, dê, mèo, gà, chó, lợn...) [76]. Kỹ thuật real-time PCR sử dụng SYBR Green và các cặp mồi đặc hiệu cho gen *sodA* của nhóm nghiên cứu có khả năng phát ra các chủng vi khuẩn trên với độ đặc hiệu cao, và chỉ cần có 5 giờ cho toàn bộ quá trình xét nghiệm, gồm cả thời gian tách chiết, tinh sạch DNA. Điều đáng lưu ý là ngưỡng phát hiện của phương pháp được xác định ở giới hạn 10^3 vi khuẩn/gram mô [76]. Nghiên cứu tương tự của Dutra và cộng sự [77] cũng sử dụng phương pháp này và thành công xác định sự có mặt của *P. multocida* trong mô phổi của lợn trong các lò mổ ở Brazil bằng cặp mồi đặc hiệu cho gen *kmt1*. Ngoài ra, Scherrer và cộng sự [78] đã phát triển kỹ thuật real-time PCR sử dụng mồi và mẫu dò đặc hiệu cho gen *tox A* để phát hiện *P. multocida* trong những mẫu bệnh phẩm từ lợn bị viêm teo mũi truyền nhiễm ác tính (Progressive atrophic rhinitis). Kỹ thuật này có thể phát hiện ra sự có

mặt của những vi khuẩn này ở ngưỡng tối thiểu là bản sao hệ gen vi khuẩn, đặc biệt so với PCR truyền thống chỉ có thể phát hiện ra 90/203 mẫu dương tính với *tox A* trong khi real-time PCR có thể phát hiện 101/203 mẫu dương tính với gen này [78]. Sau đó, không chỉ dùng để phát hiện các tác nhân riêng lẻ, kỹ thuật real-time PCR cũng đã được phát triển để nhận diện nhiều hơn một tác nhân trong một phản ứng (multiplex real-time PCR). Nhóm nghiên cứu của Settypall [79] đã ứng dụng thành công phương pháp này để phát hiện đồng thời 4 tác nhân gồm virus (*Peste des petits ruminants virus*, *Capripoxvirus*), vi khuẩn (*P. multocida*) và Mycoplasma (*Mycoplasma capricolum capripneumoniae*) sử dụng mồi và mẫu dò đặc hiệu từ dê và cừu. Hiệu quả của phản ứng multiplex real-time PCR là tương đương so với PCR đơn với ngưỡng phát hiện là 12 bản sao cho *Capripoxvirus*, 163 bản sao cho *Peste des petits ruminants virus*; 13 bản sao cho *P. multocida* và 23 bản sao cho *M. capricolum capripneumoniae* [79]. Sau đó nhóm nghiên cứu của Kishimoto [80] đã thành công phát triển kỹ thuật real-time PCR để phát hiện đồng thời 16 tác nhân trong 1 phản ứng với độ nhạy cao, nghiên cứu mẫu hiện trường đã xác nhận các mẫu ngoáy mũi từ động vật thí nghiệm có thể chứa đồng thời 4-10 tác nhân khác nhau. Các nghiên cứu tiếp theo của các tác giả khác cũng tập trung vào việc áp dụng kỹ thuật real-time PCR để phát hiện nhiều tác nhân, trong đó có *P. multocida* và/hoặc *M. haemolytica* trong một phản ứng [81–83]. Thêm vào đó, kỹ thuật này cũng được áp dụng để định tuýp huyết thanh cho *M. haemolytica* [84]. Bằng cách so sánh phương pháp real-time PCR với phương pháp ngưng kết hồng cầu gián tiếp (indirect hemagglutination) thì thấy rằng 3 tuýp huyết thanh A1, A2 và A6 đặc trưng ở những đối tượng vật nuôi khác nhau, A1 thường thấy ở bò và cừu nhưng không có ở dê, trong khi đó A2 lại tập trung ở dê và A6 thì tìm thấy ở cả dê, cừu và bò. Mặc dù vậy nghiên cứu này cũng gợi ý về việc khi sử dụng real-time PCR cho định tuýp huyết thanh của *M. haemolytica* trên

cừu thì nên thực hiện cùng với phản ứng ngưng kết hồng cầu gián tiếp để có kết quả chính xác hơn [84]. Từ các phân tích trên có thể thấy rằng real-time PCR là phương pháp chẩn đoán *P. multocida* và/hoặc *M. haemolytica* rất hiệu quả, với độ nhạy cao nhưng hạn chế của phương pháp là cần thiết bị hiện đại, con người được đào tạo và hoá chất đắt tiền, vì vậy việc triển khai áp dụng kỹ thuật này trong thực tế vẫn rất hạn chế, chủ yếu vẫn là trong phòng thí nghiệm. Một số phương pháp phân tử sử dụng trong chẩn đoán bệnh tụ huyết trùng ở động vật gây ra bởi hai loài *P. multocida* và *M. haemolytica* được tổng hợp tại bảng 1.

Bảng 1. Một số phương pháp phân tử dùng trong chẩn đoán *P. multocida* và *M. haemolytica* ở động vật

TT	Phương pháp sử dụng	Tác nhân gây bệnh	Gen đích cho tụ huyết trùng	Vật chủ	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	TLTK
1	PCR	<i>P. haemolytica</i>	<i>r16S</i>	ND	ND	ND	[16]
2		<i>P. multocida</i>	<i>pls</i>	Gà tây	10 vi khuẩn hoặc 24 pg/phản ứng	ND	[17]
3		<i>P. multocida</i>	<i>kmt1</i>	ND	ND	100%	[18]
4		<i>P. haemolytica</i>	<i>r16S</i>	ND	ND	ND	[19]
5		<i>P. multocida</i>	<i>kmt1</i>	Gà	10 vi khuẩn/phản ứng	ND	[21]
6		<i>P. multocida</i>	<i>Random</i>	Gà	ND	52/58	[22]
7		<i>P. multocida</i>	<i>ToxR</i>	Lợn	ND	ND	[23]
8		<i>M. haemolytica</i>	<i>gcp</i>	Dê	ND	ND	[24]
9	REP-PCR	<i>P. multocida</i>	<i>Random</i>	Bò, cừu, dê, mèo, chó, gia cầm	ND	ND	[26]
10	PCR	<i>P. multocida</i>	<i>kmt1</i>	Cừu, bò, trâu, gia cầm	ND	ND	[27]
11	PCR/multiplex PCR	<i>P. multocida</i>	<i>kmt1/gen mã hoá seroty</i>	Lạc đà	ND	ND	[28]
12	PCR	<i>M. haemolytica</i>	<i>Rpt2/PHSSA</i>	Cừu	ND	ND	[29]
13		<i>P. multocida</i>	<i>Kmt1</i>	Cừu	ND	ND	[30]
14	RFLP-PCR	<i>P. multocida</i>	<i>ompH</i>	Gia cầm	ND	ND	[32]
15		<i>P. multocida</i>	<i>ompH</i>	Bò, cừu	ND	ND	[33]

TT	Phương pháp sử dụng	Tác nhân gây bệnh	Gen đích cho tự huyết trùng	Vật chủ	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	TLTK
16	Multiplex PCR	<i>P. multocida</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Riemerella anatipestifer</i> , và <i>Escherichia coli</i>	<i>Kmt1</i> , <i>invA</i> , <i>r16S</i> , <i>Pho</i>	Vịt	10 pg/phản ứng	100%	[47]
17		<i>A. pleuropneumonia</i> , <i>H. parasuis</i> và <i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>AP-IV</i> , <i>kmt1</i> , <i>hps</i> , <i>Bb-fla</i>	Lợn	ND	ND	[48]
18		<i>M. haemolytica</i>	<i>Lkt</i> ; <i>HP</i> và <i>r16S</i>	Cừu	ND	ND	[49]
19			<i>RPT2</i> và <i>PHSSA</i>		ND	ND	[50]
20			<i>RPT2</i> và <i>PHSSA</i>		ND	ND	[29]
21		<i>P. multocida</i> và <i>M. haemolytica</i>	<i>KMT1</i> và <i>GCP1</i>				[51]
22		<i>P. multocida</i>	<i>LPS locus</i>	Gà, vịt, bò, lợn, gà tây	ND	ND	[52]
23		<i>P. multocida</i>	<i>pfhA</i> , <i>hgbB</i> , <i>tbpA</i> , <i>ToxA</i>	Trâu, Bò	ND	ND	[53]
24		<i>M. haemolytica</i>	<i>Hyp</i> , <i>Core</i> , <i>TupA</i>	Bò	ND	ND	[54]
25		<i>P. multocida</i>	<i>kmt1</i> , <i>gatD</i> , <i>r16S</i>	Gia cầm	ND	ND	[55]
26		LAMP	<i>P. multocida</i>	<i>kmt1</i>	Lợn	10 vi khuẩn/mL	90,9%
27	Trâu bò				5-10 pg/phản ứng	93%	[70]
28	Trâu				10 pg/phản ứng	97%	[71]
29		<i>P. multocida</i> , <i>M. haemolytica</i> , và <i>Histophilus somni</i>	<i>Kmt1</i> , <i>ompP1</i> , <i>omp16</i> , <i>rsmL</i> , <i>rsmC</i> , <i>lktA</i>	Bò	10 ⁴ bản sao/phản ứng	89%	[72]
30	Real-time PCR	<i>M. haemolytica</i> , <i>M. varigena</i> , <i>M. ruminalis</i> , <i>M. granulomatis</i> và <i>M. glucosida</i>	<i>SodA</i>	Chó, gà, lợn, cừu, mèo	10 ³ vi khuẩn/g mô	ND	[76]
31		<i>P. multocida</i>	<i>kmt1</i>	Lợn	1.16-8.25 bản sao/phản ứng	ND	[77]

TT	Phương pháp sử dụng	Tác nhân gây bệnh	Gen đích cho tự huyết trùng	Vật chủ	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	TLTK
32		<i>P. multocida</i>	<i>toxA</i>	Lợn	ND	ND	[78]
33		<i>Peste des petits ruminants virus, Capripoxvirus, P. multocida</i> và <i>Mycoplasma capricolum capripneumoniae</i>	<i>kmt1</i>	Cừu	13 bản sao/phản ứng	ND	[79]
34		Bovine viral diarrhea virus, bovine coronavirus, bovine parainfluenza virus 3, bovine respiratory syncytial virus, influenza D virus, bovine rhinitis A virus, bovine rhinitis B virus, bovine herpesvirus 1, bovine adenovirus 3, bovine adenovirus 7, <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i> , <i>H.somni</i> , <i>Trueperella pyogenes</i> , <i>Mycoplasma bovis</i> và <i>Ureaplasma diversum</i>	<i>SodA, kmt1</i>	Bò	1 CFU/1 phản ứng	ND	[80]
35		<i>P. multocida</i> , <i>M. haemolytica</i> , <i>H. somni</i> và <i>T. pyogenes</i>	Kit thương mại	Bò	4×10^{-1} to 2×10^0 CFU/phản ứng	98.3% cho <i>M. haemolytica</i> và 100% cho <i>P. multocida</i>	[82]
36		<i>M. haemolytica</i> , <i>M. bovis</i> , <i>H. somni</i> , và <i>P. multocida</i>	<i>LktD, Pm1231</i>	Bò	1.2-12CFU/phản ứng	88%	[83]
37		<i>M. haemolytica</i>	Kit thương mại	Bò, cừu, dê	ND	ND	[84]

ND: không xác định

6 Kết luận

Trong bài báo này, chúng tôi đã tổng hợp bốn phương pháp chẩn đoán dựa vào các chỉ thị phân tử để phát hiện nhanh, nhạy và đặc hiệu *P. multocida* và/hoặc *M. haemolytica*, những tác nhân chính gây tụ huyết trùng trên gia súc, gia cầm. Mặc dù các phương pháp này đã được khẳng định có vai trò quan trọng trong chẩn đoán tụ huyết trùng nhưng mỗi phương pháp vẫn còn những hạn chế nhất định dẫn tới việc khó áp dụng ở hiện trường nếu không có đội ngũ kỹ thuật viên có trình độ, có thiết bị phù hợp. Có thể nói trong các kỹ thuật được đề cập, kỹ thuật multilex PCR và LAMP thể hiện nhiều tiềm năng ứng dụng nhất nhưng các kit thương mại hiện nay lại tập trung chủ yếu vào PCR (AccuPower® *Pasteurella multocida* PCR Kit, Bioneer, Hàn Quốc; LiliF® PAS PCR Kit, Intronbio, Hàn Quốc); Real time PCR (*Mannheimia haemolytica* Real Time PCR Kit, Biopremier, Bồ Đào Nha; VetMAX™ *P. multocida* Toxinogenic Kit, Thermofisher, Mỹ; Bio-t kit® *M. haemolytica* & *P. multocida* biosella, Pháp). Vì vậy, các nghiên cứu liên quan vẫn liên tục được thực hiện để tìm ra phương pháp hiệu quả hơn, đơn giản hơn và giá thành thấp hơn để có thể áp dụng rộng rãi trên 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.

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. Christensen H, Bossé J, Angen Ø, Nørskov-Lauritsen N, Bisgaard M. Immunological and molecular techniques used for determination of serotypes in Pasteurellaceae. *Methods in Microbiology*. 2020;47:117-149.
2. Booth SJ. *Pasteurella* Infections. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier Inc.; 2014. p. 1-4.
3. Plummer PJ, Plummer CL, Kelly MS. Diseases of the respiratory system. *Münchener medizinische Wochenschrift* (1950). 1960;102:703-706.
4. Roier S, Fenninger JC, Leitner DR, Rechberger GN, Reidl J, Schild S. Immunogenicity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* outer membrane vesicles. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013;303(5):247-256.
5. Snyder E, Credille B. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in Bovine Respiratory Disease: How Are They Changing in Response to Efforts to Control Them? *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 2020;36(2):253-268.
6. Cozens D, Sutherland E, Lauder M, Taylor G, Berry CC, Davies RL. Pathogenic *Mannheimia haemolytica* invades differentiated bovine airway epithelial cells. *Infection and Immunity*. 2019;87(6):13-15.
7. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: From Zoonosis to cellular microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26(3):631-655.
8. Step DL, Confer AW. *Mannheimia haemolytica*–and *Pasteurella multocida*–Induced Bovine Pneumonia. In: *Food animal practice*. Elsevier; 2009. p. 164-170.
9. Stamp JT, Watt JAA, Thomlinson JR. *Pasteurella haemolytica* septicaemia of lambs. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1955;65:183-196.
10. Dyson DA, Gilmour NJL, Angus KW. Ovine systemic pasteurellosis caused by *Pasteurella haemolytica* biotype T. *Journal of Medical Microbiology*. 1981;14(1):89-95.
11. Gilmour NJL, Thompson DA, Fraser J. The recovery of *Pasteurella haemolytica* from the tonsils of adult sheep. *Research in Veterinary Science*. 1974;17(3):413-414.
12. Gilmour NJ. Pasteurellosis in sheep. *The Veterinary Record*. 1978;102(5):100-102.
13. Smith GR. The pathogenicity of *Pasteurella haemolytica* for young lambs. *Journal of Comparative Pathology*. 1960;70:326-338.
14. Smith GR. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions in sheep. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1961;81(2):431-440.
15. Gilmour NJL, Gilmour JS. Farm Practice Diagnosis of pasteurellosis in sheep. In *Practice*. 1985;7(5):145-149.

16. Davies RL, Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogenetic relationships and diversity within the *Pasteurella haemolytica* complex based on 16S rRNA sequence comparison and outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996;46(3):736-744.
17. Kasten RW, Carpenter TE, Snipes KP, Hirsh DC. Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. *Avian Diseases*. 1997;41(3):676-582.
18. 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; 36:1096-1100.
19. Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16s rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999;49:67-86.
20. Blackall PJ, Mifflin JK. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: A review. *Avian Pathology*. 2000;29(4):271-287.
21. Lee CW, Wilkie IW, Townsend KM, Frost AJ. The demonstration of *Pasteurella multocida* in the alimentary tract of chickens after experimental oral infection. *Veterinary Microbiology*. 2000;72(1-2):47-55.
22. Rocke TE, Smith SR, Miyamoto A, Shaddock DJ. A serotype-specific polymerase chain reaction for identification of *Pasteurella multocida* serotype 1. *Avian Diseases*. 2002;46(2):370-377.
23. Kalorey DR, Yuvaraj S, Vanjari SS, Gunjal PS, Dhanawade NB, Barbuddhe SB, et al. PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;31(6):459-465.
24. Shanthalingam S, Goldy A, Bavananthasivam J, Subramaniam R, Arun Batra S, 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.
25. Abera D, Sisay T, Birhanu T. Isolation and identification of *Mannheimia and Pasteurella* species from pneumonic and apparently healthy cattle and their antibiogram susceptibility pattern in Bedelle District, Western Ethiopia. 2014;6(5):32-41.
26. Chitarra CS, Kagueyama FC, Candido SL, Nakazato L. Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates from swine lungs by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Ciência Rural*. 2016;46:119-125.
27. Abbas AM, Abd El-Moaty DAM, Zaki ESA, El-Sergany EF, El-Sebay NA, Fadl HA, et al. Use of molecular biology tools for rapid identification and characterization of *Pasteurella* spp. *Veterinary World*. 2018;11(7):1006-1014.
28. Kasivalu JK, Omwenga GI, Aboge GO. Molecular Detection and Characterization of *Pasteurella multocida* Infecting Camels in Marsabit and Turkana Counties, Kenya. *International Journal of Microbiology*. 2022;2022:1-6.
29. Nguyen VP, Le CT, Ho XTT, Truong PH, Van Loi B, Nguyen KCT. First Report of Antimicrobial Resistance of *Mannheimia haemolytica* from Phan Rang Sheep in Vietnam. *Pakistan Veterinary Journal*. 2023;43(1):41-48.
30. 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):281-290.
31. 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;72:97-109.
32. Jabbari AR, Esmaelizadeh M. Molecular Typing of Avian *Pasteurella multocida* isolates by PCR-RFLP of ompH Gene. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2005;3(2):99-103.
33. Ghanizadeh A, Jabbari AR, Shayegh J, Sanchuli A, Banihashemi R. Genotyping of *Pasteurella multocida* ovine and bovine isolates from Iran based on PCR-RFLP of ompH gene. *Archives of Razi Institute*. 2015;70(3):151-156.
34. Lee KE, Jeoung HY, Lee JY, Lee MH, Choi HW, Chang KS, et al. Phenotypic characterization and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2012;74(5):567-573.

35. Dziva F, Christensen H, Van Leengoed L, Mohan K, Olsen JE. Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. *Veterinary microbiology*. 2004;102(1–2):117-122.
36. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Tsuboi T, Eguchi M. Molecular typing of Mannheimia (*Pasteurella*) *haemolytica* serotype A1 isolates from cattle in Japan. *Epidemiol Infect*. 2003;131:939-946.
37. Ozbey G, Kilic A, Ertas HB, Muz A. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* strains isolated from cattle, sheep and goats. 2004;2004(3):65-69.
38. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(4):559-570.
39. Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*. 1988;16(23):11141-11156.
40. Chamberlain JS. Multiple PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990;272-281.
41. Rithidech KN, Dunn JJ, Gordon CR. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *Biotechniques*. 1997;23(1):36-44.
42. Shuber AP, Skoletsky J, Stern R, Handelin BL. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human Molecular Genetics*. 1993;2(2):153-158.
43. Corné J, Le Du F, Quillien V, Godey F, Robert L, Bourien H, et al. Development of multiplex digital PCR assays for the detection of PIK3CA mutations in the plasma of metastatic breast cancer patients. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1-12.
44. Bogdan I, Citu C, Bratosin F, Malita D, Romosan I, Gurban CV, et al. The Impact of Multiplex PCR in Diagnosing and Managing Bacterial Infections in COVID-19 Patients Self-Medicating with Antibiotics. *Antibiotics*. 2022;11(4):1-16.
45. Ward DG, Baxter L, Gordon NS, Ott S, Savage RS, Beggs AD, et al. Multiplex PCR and Next generation sequencing for the non-invasive detection of bladder cancer. *PLoS ONE*. 2016;11(2):1-11.
46. Caliendo AM. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(SUPPL. 4):S326-330.
47. Wei B, Cha SY, Kang M, Park IJ, Moon OK, Park CK, et al. Development and application of a multiplex PCR assay for rapid detection of 4 major bacterial pathogens in ducks. *Poultry Science*. 2013;92(5):1164-1170.
48. Ly HM. Application of PCR technique in diagnosis of four respiratory pathogenic bacteria in pigs at the slaughterhouse. *The Journal of Agriculture and Development*. 2019;18(03):35-40.
49. Tabatabaei M, Abdollahi F. Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* by culture and polymerase chain reaction from sheep's pulmonary samples in Shiraz, Iran. *Veterinary World*. 2018;11(5):636-641.
50. Legesse A, Abayneh T, Mamo G, Gelaye E, Tesfaw L, Yami M, et al. Molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* isolates associated with pneumonic cases of sheep in selected areas of Central Ethiopia. *BMC microbiology*. 2018;18(1):1-10.
51. Nguyễn TTT, Nguyễn VP, Nguyễn HT, Nguyễn TO, Trương PH, Nguyễn HL, et al. Nghiên cứu chẩn đoán *Pasteurella multocida* và *Mannheimia haemolytica* bằng kỹ thuật multiplex PCR. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên* Accepted submission; 2023 (In-Press).
52. Harper M, John M, Turni C, Edmunds M, St. Michael F, Adler B, et al. Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(2):477-485.
53. Somshekhar SH, Veeragowda BM, Suryanarayana VVS, Basawaraj A, Isloor S, Rathnamma D. Rapid typing of *Pasteurella multocida* isolates from haemorrhagic septicaemia cases by multiplex PCR for their virulence. *Indian Journal of Biotechnology*. 2016;15:124-126.
54. Klima CL, Zaheer R, Briggs RE, McAllister TA. A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6. *Journal of microbiological methods*. 2017;139:155-160.
55. Ujvári B, Gantelet H, Magyar T. Development of a multiplex PCR assay for the detection of key genes associated with *Pasteurella multocida* subspecies.

- Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2022;34(2):319-322.
56. Xu W, Bai W, Luo Y, Yuan Y, Zhang W, Guo X, et al. A novel common single primer multiplex polymerase chain reaction (CSP-M-PCR) method for the identification of animal species in minced meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008;88(15):2631-2637.
 57. Wen D, Zhang C. Universal Multiplex PCR: a novel method of simultaneous amplification of multiple DNA fragments. *Plant Methods*. 2012;8(1):32.
 58. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000;28:e63.
 59. Seki M, Kilgore PE, Kim EJ, Ohnishi M, Hayakawa S, Kim DW. Loop-mediated isothermal amplification methods for diagnosis of bacterial meningitis. *Frontiers in Pediatrics*. 2018;6(57):1-6.
 60. Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, Hara-Kudo Y. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(11):6730-6735.
 61. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5517-5524.
 62. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*. 2009;15(2):62-69.
 63. Dukes JP, King DP, Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of virology*. 2006;151:1093-1106.
 64. Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, Kim SA, Anh DD, Seki M. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Haemophilus influenzae* type b in cerebrospinal fluid. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(10):3621-3626.
 65. Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, Kim SA, Anh DD, Dong BQ, et al. The enhanced pneumococcal LAMP assay: a clinical tool for the diagnosis of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE*. 2012;7(8):1-8.
 66. Lee D, Kim EJ, Kilgore PE, Kim SA, Takahashi H, Ohnishi M, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid. *PloS one*. 2015;10(4):e0122922.
 67. McKenna JP, Fairley DJ, Shields MD, Cosby SL, Wyatt DE, McCaughey C, et al. Development and clinical validation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Neisseria meningitidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;69(2):137-144.
 68. Takahashi H, Haga M, Sunagawa T, Saitoh T, Kitahara T, Matsumoto S, et al. Meningococcal carriage rates in healthy individuals in Japan determined using loop-mediated isothermal amplification and oral throat wash specimens. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2016;22(7):501-504.
 69. Sun D, Wang J, Wu R, Wang C, He X, Zheng J, et al. Development of a novel LAMP diagnostic method for visible detection of swine *Pasteurella multocida*. *Veterinary Research Communications*. 2010;34:649-657.
 70. Moustafa AM, Bennett MD. Development of loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assays for detection of *Pasteurella multocida* and *Hemorrhagic septicemia*-associated *P. multocida* serotype B: 2. *American journal of veterinary research*. 2017;78(2):134-143.
 71. Akondi S, Arora AK, Sharma NS. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Pasteurella multocida*. *Buffalo Bulletin*. 2022;41(2):318-327.
 72. Mohan S, Pascual-Garrigos A, Brouwer H, Pillai D, Koziol J, Ault A, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni* in bovine nasal samples. *ACS Agricultural Science & Technology*. 2021;1(2):100-108.
 73. Pascual-Garrigos A, Maruthamuthu MK, Ault A, Davidson JL, Rudakov G, Pillai D, et al. On-farm colorimetric detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni* in crude bovine nasal samples. *Veterinary research*. 2021;52:1-12.
 74. Dassanayake RP, Clawson ML, Tatum FM, Briggs RE, Kaplan BS, Casas E. Differential identification

- of *Mannheimia haemolytica* genotypes 1 and 2 using colorimetric loop-mediated isothermal amplification. BMC Research Notes. 2023;16(1):1-7.
75. Hsieh K, Mage P, Csordas A, Eisenstein M, Soh H. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). Chemical communications (Cambridge, England). 2014;50(28):3747-3479.
76. Guenther S, Schierack P, Grobbel M, Lübke-Becker A, Wieler LH, Ewers C. Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. Journal of Microbiological Methods. 2008;75:75-80.
77. Dutra V, Chitarra CS, Paula AJ De, Carolina J, Carolina A, Faria S De, et al. Detection of *Pasteurella multocida* by qPCR associated with pneumonic lung in pigs slaughtered in Mato Grosso Brazil. International Journal of Sciences. 2013;2:25-31.
78. Scherrer S, Frei D, Wittenbrink MM. A novel quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal swabs from swine. Acta Veterinaria Scandinavica. 2016;58.
79. Settyalli TBK, Lamien CE, Spergser J, Lelenta M, Wade A, Gelaye E, et al. One-Step Multiplex RT-qPCR Assay for the Detection of Peste des petits ruminants virus, Capripoxvirus, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma capricolum subspecies* (ssp.) capripneumoniae. PloS one. 2016;11(4):e0153688.
80. Kishimoto M, Tsuchiaka S, Samim Rahpaya S, Hasebe A, Otsu K, Sugimura S, et al. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens. Journal of Veterinary Medical Science. 2017;79(3):517-523.
81. Dutta E, Loy JD, Deal CA, Wynn EL, Clawson ML, Clarke J, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay for predicting macrolide and tetracycline resistance associated with bacterial pathogens of bovine respiratory disease. Pathogens. 2021;10(64):1-21.
82. 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.
83. Loy JD, Leger L, Workman AM, Clawson ML, Bulut E, Wang B. Development of a multiplex real-time PCR assay using two thermocycling platforms for detection of major bacterial pathogens associated with bovine respiratory disease complex from clinical samples. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 2018;30(6):837-847.
84. Arnal JL, Fernández A, Vela AI, Sanz C, Fernández-Garyzábal JF, Cid D. Capsular type diversity of *Mannheimia haemolytica* determined by multiplex real-time PCR and indirect hemagglutination in clinical isolates from cattle, sheep, and goats in Spain. Veterinary microbiology. 2021;258:109121.