

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH
GAN THẬN MỦ TRÊN CÁ TRA VIỆT NAM
PANGASIUS HYPOPHthalmus BẰNG KỸ THUẬT LAMP
(LOOP – MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION)

1. Họ và tên nghiên cứu sinh: **TRẦN THỊ THANH HUYỀN**

2. Giới tính: Nữ

3. Ngày sinh: 10/01/1982

4. Nơi sinh: Hải Dương

5. Quyết định công nhận nghiên cứu sinh số: 2385/SĐH, ngày 29 tháng 6 năm 2007 của Giám đốc Đại học Quốc gia Hà Nội

6. Các thay đổi trong quá trình đào tạo: Văn bản điều chỉnh tên đề tài luận án số 2716/QĐ-SĐH ngày 31 tháng 12 năm 2008 của Hiệu trưởng Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

7. Tên đề tài luận án: Nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh gan thận mủ trên cá tra Việt Nam *Pangasius hypophthalmus* bằng kỹ thuật LAMP (Loop – mediated isothermal amplification)

8. Chuyên ngành: Vi sinh vật học

9. Mã số: 62.42.40.01

10. Cán bộ hướng dẫn khoa học: 1. GS.TS Trương Nam Hải; 2. PGS.TS Kiều Hữu Ảnh

11. Tóm tắt các kết quả mới của luận án

- Vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu kí hiệu E5, E7, E40 được phân lập từ các mẫu gan thận, tỳ tạng cá tra có biểu hiện bệnh và được xác định là vi khuẩn *E. ictaluri* dựa vào việc phân tích trình tự gen rADN 16S. Đã chứng minh được các mẫu vi khuẩn *E. ictaluri* này là một trong những tác nhân chính gây bệnh gan thận mủ trên cá tra Việt Nam *Pangasius hypophthalmus* bằng định đề Koch.

- Gen eip18 đặc hiệu vi khuẩn *E. ictaluri* đã được phân lập, tách dòng được sử dụng như một chỉ thị phân tử để phân loại *E. ictaluri* và *E. tarda*: Gen eip18 của các mẫu vi khuẩn phân lập tại Việt Nam tương đồng 100% với nhau, tương đồng 98% với vi khuẩn *E. ictaluri* ATCC 33202, 99 % với gen eip18

của vi khuẩn *E. ictaluri* được công bố trên NCBI với số đăng ký NC_012779.1 và khác biệt khá lớn (tương đồng 87%) với trình tự gen *evpC* của vi khuẩn *E. tarda* với số đăng ký trên NCBI là NC_013508.1).

- Dựa trên trình tự gen *eip18* đặc trưng của vi khuẩn *E. ictaluri*, đã thiết kế được bộ mồi đặc hiệu phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập tại Việt Nam bằng kỹ thuật LAMP với thời gian phản ứng tối thiểu là 35 phút ở nhiệt độ từ 55 đến 69°C, nồng độ dNTPs 0,5 mM, Betain 0,1 M, tỷ lệ về nồng độ mồi ngoài bằng 1/2 đến 1/8 mồi trong. Đồng thời đã ứng dụng thành công việc phát hiện phản ứng bằng mắt thường với sự có mặt của Calcein kết hợp với nồng độ Mg^{2+} ban đầu trong phản ứng tối thiểu là 4 mM. Bộ mồi LAMP khuếch đại gen *eip18* là hoàn toàn đặc hiệu cho vi khuẩn *E. ictaluri* với giới hạn phát hiện là 9,4 fg tương ứng với 3 cfu/ml ($1,98 \times 10^4$ bản copy), cao gấp 100 lần so với phương pháp PCR và có độ đặc hiệu 100%.

- Bước đầu đã sản xuất được bộ kit phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra Việt Nam *P. hypophthalmus* bằng mắt thường dựa vào sự thay đổi màu sắc từ cam sang xanh của chỉ thị Calcein có sẵn trong phản ứng. Thử nghiệm trong phòng thí nghiệm ban đầu trên các mẫu mô cá bệnh cho thấy. Bộ kit có khả năng phát hiện 98% các mẫu nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* cao hơn so với phương pháp PCR và Nested PCR (92%) và phương pháp nuôi cấy vi sinh thông thường (80%).

12. Khả năng ứng dụng trong thực tiễn

- Kỹ thuật LAMP với chỉ thị Calcein lần đầu tiên được nghiên cứu và chuẩn hóa có thể được sử dụng để áp dụng cho các nghiên cứu chẩn đoán các tác nhân gây bệnh khác như vi khuẩn, nấm, nguyên sinh động vật...

- Kit chẩn đoán vi khuẩn *E. ictaluri* đơn giản, dễ thao tác, không cần các thiết bị máy móc đắt tiền, công kênh đi kèm nên có khả năng ứng dụng thực tế ngoài đồng ruộng, cho kết quả nhanh và chính xác với giá thành rẻ hơn hẳn so với các phương pháp chẩn đoán khác hiện có.

13. Những hướng nghiên cứu tiếp theo

- Tiếp tục thử nghiệm bộ sinh phẩm phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* với số mẫu lớn hơn .

- Hoàn thiện quy trình sử dụng LAMP kit và thử nghiệm trực tiếp tại một số tỉnh nuôi trồng cá tra khu vực Đồng bằng sông Cửu Long.

14. Các công trình đã công bố có liên quan đến luận án:

[1] Trần Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải (2010), “Tách dòng và xác định trình tự gen *eip18* của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập ở Việt Nam”, Tạp chí Công nghệ sinh học 8(A), tr.581-586.

[2] Trần Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải (2010), “Loop-mediated isothermal amplification – a novel method applied to detect *Edwardsiella ictaluri* causing Edwardsiellosis in Tra catfish in Vietnam”, VNU Journal of Science 26 (4S), tr. 575-581.

[3] Trần Thị Thanh Huyền, Lê Nguyễn Nguyên Hạ, Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải (2010), “Ứng dụng phương pháp LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) phát hiện nhanh vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* nhiễm trên cá tra Việt Nam (*Pangasius hypophthalmus*)”, Tạp chí Công nghệ sinh học 8(2), tr. 153-160.

[4] Trần Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải (2011), “Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá tra Việt nam bằng kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction)”, Tạp chí Công nghệ sinh học 9(1), tr. 169-177.