

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8400-35:2015**

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -  
PHẦN 35: BỆNH THEILERIA Ở TRÂU BÒ**

*Animal diseases - Diagnostic procedure - Part 35: Bovine theileriosis*

**HÀ NỘI - 2015**

## Lời nói đầu

TCVN 8400-35:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo OIE (2010), *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, Chapter 2.4.16 *Theileriosis*;

TCVN 8400-35:2015 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương - Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8400 *Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán* gồm 38 phần:

- TCVN 8400-1 : 2010, *phần 1: Bệnh lở mồm long móng*;
- TCVN 8400-2 : 2010, *phần 2: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus suis gây ra trên lợn*;
- TCVN 8400-3 : 2010, *phần 3: Bệnh giun xoắn*;
- TCVN 8400-4 : 2010, *phần 4: Bệnh Niu Cát Xon*;
- TCVN 8400-5 : 2011, *phần 5: Bệnh tiên mao trùng*;
- TCVN 8400-6 : 2011, *phần 6: Bệnh xuất huyết thỏ*;
- TCVN 8400-7 : 2011, *phần 7: Bệnh đậu cừu và đậu dê*;
- TCVN 8400-8 : 2011, *phần 8: Bệnh nấm phổi do Aspergillus ở gia cầm*;
- TCVN 8400-9 : 2011, *phần 9: Bệnh viêm gan vịt type I*;
- TCVN 8400-10 : 2011, *phần 10: Bệnh lao bò*;
- TCVN 8400-11 : 2011, *phần 11: Bệnh dịch tả vịt*;
- TCVN 8400-12 : 2011, *phần 12: Bệnh bạch li và thương hàn ở gà*;
- TCVN 8400-13 : 2011, *phần 13: Bệnh sảy thai truyền nhiễm do brucela*;
- TCVN 8400-14 : 2011, *phần 14: Bệnh tụ huyết trùng ở trâu bò*;
- TCVN 8400-15 : 2011, *phần 15: Bệnh xoắn khuẩn do Leptospira*;
- TCVN 8400-16 : 2011, *phần 16: Bệnh phù ở lợn do vi khuẩn E.coli*;

## **TCVN 8400-35 : 2015**

- TCVN 8400-17 : 2011, phần 17: Bệnh do vi khuẩn *staphylococcus aureus* gây ra ở gà;
- TCVN 8400-18 : 2014, phần 18: Bệnh phù đầu gà (*coryza*);
- TCVN 8400-19 : 2014, phần 19: Bệnh phó thương hàn lợn;
- TCVN 8400-20 : 2014, phần 20: Bệnh đóng dấu lợn;
- TCVN 8400-21 : 2014, phần 21: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS);
- TCVN 8400-22 : 2014, phần 22: Bệnh giả dại ở lợn;
- TCVN 8400-23 : 2014, phần 23: Bệnh ung khí thán;
- TCVN 8400-24 : 2014, phần 24: Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm;
- TCVN 8400-25 : 2014, phần 25: Bệnh cúm lợn;
- TCVN 8400-26 : 2014, phần 26: Bệnh cúm gia cầm H5N1;
- TCVN 8400-27 : 2014, phần 27: Bệnh sán lá gan;
- TCVN 8400-28 : 2014, phần 28: Bệnh viêm ruột hoại tử do vi khuẩn *Clostridium perfringens* ;
- TCVN 8400-29 : 2015, phần 29: Bệnh *Lympho leuko* ở gà;
- TCVN 8400-30 : 2015, phần 30: Bệnh Marek ở gà;
- TCVN 8400-31 : 2015, phần 31: Bệnh Tụ huyết trùng gia cầm;
- TCVN 8400-32 : 2015, phần 32: Bệnh Gumboro ở gia cầm;
- TCVN 8400-33 : 2015, phần 33: Bệnh Lê dạng trùng ở trâu bò;
- TCVN 8400-34 : 2015, phần 34: Bệnh Biên trùng ở trâu bò;
- TCVN 8400-35 : 2015, phần 35: Bệnh *Theileria* ở trâu bò;
- TCVN 8400-36 : 2015, phần 36: Hội chứng suy mòn ở lợn sau cai sữa do *Circo virus typ 2*;
- TCVN 8400-37 : 2015, phần 37: Bệnh viêm phổi địa phương ở lợn;
- TCVN 8400-38 : 2015, phần 38: Bệnh tiêu chảy ở lợn do *Corona virus*.

## Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 35: Bệnh Theileria ở trâu bò

*Animal diseases - Diagnostic procedure -*

*Part 35: Bovine theileriosis*

**CẢNH BÁO** – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh Theileria ở trâu bò do một số loài *Theileria* spp. gây ra.

Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng để chẩn đoán bệnh Theileria cho các gia súc khác như dê, cừu.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

#### 2.1

##### **Bệnh Theileria (Theileriosis)**

Bệnh do một số loài đơn bào *Theileria* spp. như *Theileria parva*, *Theileria annulata*, *Theileria taurotragi*, gây ra.

CHÚ THÍCH: Khi con vật mắc bệnh, có biểu hiện đặc trưng như: sốt cao, lách và hạch lympho sưng to. Mầm bệnh *Theileria* spp. được truyền từ con vật bệnh sang con vật khỏe qua một số loài ve *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp...

### 3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích, sử dụng nước cất, nước khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

## **TCVN 8400-35 : 2015**

### **3.1 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp nhuộm Giemsa**

**3.1.1 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS), 0,01 M, pH 7,0 (xem A.1).**

**3.1.2 Dung dịch Giemsa, 10 % (xem A.2).**

**3.1.3 Metanol tuyệt đối**

### **3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp PCR**

**3.2.1 Kit tách chiết ADN (axit deoxyribonucleic), dùng cho mẫu máu hoặc mẫu mô.**

**3.2.2 Kit nhân gen.**

**3.2.3 Cặp mồi (primers).**

**3.2.4 Agarose.**

**3.2.5 Dung dịch đệm TAE (tris axetat EDTA) hoặc TBE (tris borat EDTA) (xem A.3)**

**3.2.6 Chất nhuộm màu, ví dụ: Sybr safe hoặc etidi bromua.**

**3.2.7 Loading dye 6X (chất đệm tải mẫu).**

**3.2.8 Dung dịch đệm TE (Tris-axit etylendiamintetraaxetic).**

**3.2.9 Thang chuẩn ADN (Ladder, marker).**

**3.2.10 Nước tinh khiết, không có nuclease.**

### **3.3 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp ELISA (phép thử miễn dịch liên kết enzym)**

Hiện nay các kit ELISA thương mại có sẵn trên thị trường dùng để phát hiện kháng thể *Theileria*. Khi sử dụng phương pháp ELISA cần theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

### **3.4 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp kháng thể huỳnh quang gián tiếp (IFAT)**

**3.4.1 Dung dịch PBS, pH 7,2 (xem A.4).**

**3.4.2 Axeton.**

**3.4.3 Formaldehyd.**

**3.4.4 Natri azide.**

**3.4.5 Eosin hoặc trypan blue.**

**3.4.6 Glyxerol.**

**3.4.7 Lymphocyte lysate.**

**4 Thiết bị, dụng cụ**

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm sinh học và những thiết bị, dụng cụ sau:

**4.1 Thiết bị, dụng cụ sử dụng chung**

**4.1.1 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 80 °C.**

**4.1.2 Tủ lạnh, có thể duy trì nhiệt độ 2 °C đến 8 °C.**

**4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp nhuộm Giemsa**

**4.2.1 Phiến kính, vô trùng.**

**4.2.2 Lamén, vô trùng.**

**4.2.3 Kính hiển vi quang học, vật kính dầu 100 X.**

**4.3 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp PCR**

**4.3.1 Máy nhân gen (PCR).**

**4.3.2 Máy ly tâm, có thể đạt gia tốc ly tâm 900 g, 6 000 g và 20 000 g.**

**4.3.3 Máy lắc trộn vortex.**

**4.3.4 Máy spindown.**

**4.3.5 Bộ điện-di, gồm bộ nguồn và bể chạy điện di.**

**4.3.6 Máy đọc gel (blue light transilluminator).**

**4.4 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp ELISA**

**4.4.1 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở 37 °C.**

**4.4.2 Máy đọc ELISA, có thể đọc ở bước sóng 405 nm.**

**4.5 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp IFAT**

**4.5.1 Máy ly tâm lạnh, có thể ly tâm với gia tốc 200 g, 500 g.**

**4.5.2 Kính hiển vi huỳnh quang.**

## **TCVN 8400-35 : 2015**

### **5 Chẩn đoán lâm sàng**

#### **5.1 Đặc điểm dịch tễ**

- Bệnh Theileria thường gặp ở trâu bò ở những vùng có khí hậu nóng, ẩm;
- Trâu bò sau khi khỏi bệnh Theileria thường là những con mang trùng;
- Bệnh lây lan mạnh vào các tháng nóng ẩm khi ve phát triển, đặc biệt từ tháng 5 đến tháng 8.

#### **5.2 Triệu chứng lâm sàng**

##### **5.2.1 Thể cấp tính**

- Sốt cao 42 °C, mất điều hòa thân nhiệt;
- Trâu bò chảy nước mắt, có dử mắt;
- Viêm hạch;
- Ía chảy;
- Nước tiểu không có huyết sắc tố, không có hiện tượng hoàng đản;
- Niêm mạc mắt, miệng xuất huyết điểm và sung huyết;
- Trước khi chết thân nhiệt giảm nhanh, khó thở do phổi tích dịch;
- Tỷ lệ chết có thể đến 90% tùy thuộc vào giống, tuổi, và các yếu tố dịch tễ khác;
- Trâu bò thường chết sau 15 ngày tới 25 ngày mắc bệnh.

##### **5.2.2 Thể mãn tính**

- Trâu bò gầy, sức sản xuất về mặt sinh sản, thịt, sữa... kém ở giai đoạn trưởng thành;
- Có dấu hiệu thần kinh nhẹ;
- Vàng da và niêm mạc.

#### **5.3 Bệnh tích**

- Niêm mạc mắt, mũi chứa nhiều dịch;
- Hạch lympho sưng to, xuất huyết và phù nề. Trong giai đoạn bệnh cấp tính hạch lympho phù nề và sung huyết; giai đoạn bệnh mãn tính hạch lympho bị teo và hoại tử;

- Phổi, khí quản phù nề, tích dịch;
- Xoang ngực, bụng chứa nhiều dịch;
- Tủy xương đóng thành chất keo, màu tro vàng nhạt;
- Lách, thận có điểm hoại tử màu trắng;
- Gan, lách sưng to;
- Đường tiêu hóa bị loét và xuất huyết, đặc biệt phần dạ múi khế.

## 6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

### 6.1 Phương pháp nhuộm Giemsa kiểm tra hình thái Theileria

#### 6.1.1 Lấy mẫu

Dùng xylanh 5 ml và kim tiêm 20 G (hoặc 18 G) vô trùng, lấy từ 1,5 ml đến 2 ml máu ở tĩnh mạch cổ hoặc động mạch đuôi của trâu bò nghi ngờ bệnh cho vào ống có chất chống đông (EDTA, natri xitrat hoặc heparin), ghi ký hiệu mẫu lên thành ống.

Đối với trâu bò bệnh được mổ khám: lấy 3 gam đến 5 gam hạch lympho, phổi, thận, gan, lách cho vào túi vô trùng, dán kín ghi ký hiệu mẫu.

#### 6.1.2 Bảo quản mẫu

Tất cả các mẫu bệnh phẩm đều được bảo quản trong thùng lạnh (nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C) chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 48 h. Trong trường hợp chưa xét nghiệm ngay mẫu máu chống đông và phủ tạng bảo quản trong tủ lạnh (4.1.2).

CHÚ THÍCH: Đồng thời kèm theo Phiếu gửi bệnh phẩm ghi rõ yêu cầu xét nghiệm và những thông tin về dịch tễ, các biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của bệnh.

#### 6.1.3 Chuẩn bị mẫu

Mẫu bệnh phẩm là mẫu máu,, phủ tạng.

#### 6.1.4 Cách tiến hành

##### 6.1.4.1 Chuẩn bị tiêu bản

##### a) Đối với mẫu máu (6.1.1)

- Nhỏ 1 giọt máu (6.1.1) (tương đương 5 µl đến 10 µl) lên một đầu của phiến kính (4.2.1);



## **TCVN 8400-35 : 2015**

- Dàn mỏng giọt máu bằng lamên (4.2.2) hoặc một phiến kính khác (4.2.1);
- Tiêu bản để khô tự nhiên sau đó cố định bằng metanol tuyệt đối (3.1.3) trong 1 min. Để khô.

b) Đối với mẫu phủ tạng (hạch lympho, phổi, thận, gan, lách);

- Phết nhẹ mẫu phủ tạng (6.1.1) lên phiến kính (4.2.1).
- Tiêu bản để khô tự nhiên sau đó cố định bằng metanol tuyệt đối (3.1.3) trong 1 min. Để khô.

### **6.1.4.2 Nhuộm tiêu bản**

- Đặt tiêu bản (6.1.4.1) vào cốc đựng dung dịch giemsa 10 % (3.1.2) trong 30 min;
- Rửa tiêu bản bằng nước sạch từ 3 lần đến 4 lần;
- Để khô tiêu bản ở nhiệt độ phòng.

### **6.1.5 Xem hình thái Theileria**

Nhỏ 1 giọt dầu vào tiêu bản (6.1.4.2) và xem bằng kính hiển vi quang học (4.2.3), quan sát Theileria có hình thái sau:

- Theileria thể hạt lựu có màu xanh lam nhạt, nhân tế bào bắt màu tím đối với mẫu phủ tạng;
- Theileria có hình cầu, hình gậy hoặc dấu phẩy bắt màu xanh nằm bên trong hồng cầu.

## **6.2 Phương pháp PCR phát hiện kháng nguyên Theileria**

### **6.2.1 Lấy mẫu**

Xem 6.1.1.

### **6.2.2 Bảo quản mẫu**

Xem 6.1.2.

### **6.2.3 Chuẩn bị mẫu**

Mẫu bệnh phẩm là máu hoặc phủ tạng (6.2.1)

- Đối với mẫu phủ tạng (6.2.1): lấy khoảng 5 g mẫu, nghiền mẫu phủ tạng với dung dịch PBS (xem A.1) bằng cối chày sứ vô trùng. Ly tâm ở gia tốc 900 g bằng máy ly tâm (4.3.2) trong 10 min, thu phần dịch nổi để xét nghiệm PCR;
- Đối với mẫu máu (6.2.1): không cần xử lý mẫu.

## 6.2.4 Cách tiến hành

### 6.2.4.1 Tách chiết ADN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.1) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: dùng kit tách chiết DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506)<sup>1)</sup> (xem Phụ lục B).

### 6.2.4.2 Chuẩn bị môi

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.3.1) theo phương pháp PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu Tams1 của *T. annulata* sử dụng cặp môi (3.2.3) được nêu trong Bảng 1.

**Bảng 1 – Trình tự cặp môi <sup>(1)</sup>**

Gen đích	Cặp môi	Trình tự 5'-3' <i>T. annulata</i>	Kích thước sản phẩm
Tams1	Môi xuôi (forward primer)	ATGCTGCAAATGAGGAT	785 bp
	Môi ngược (reverse primer)	GGACTGATGAGAAGACGATGAG	

Cặp môi dùng để khuếch đại đoạn gen của *T. annulata* có kích thước sản phẩm 785 bp

Môi được chuẩn bị như sau:

- Chuẩn bị môi gốc: môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.3.4) ở gia tốc 6 000 g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng dung dịch đệm TE (3.2.8) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM làm môi gốc.
- Chuẩn bị môi sử dụng ở nồng độ 20 µM, pha loãng môi gốc bằng nước (3.2.10) (20 µl môi gốc và 80 µl nước).

### 6.2.4.3 Tiến hành phản ứng

Sử dụng cặp môi đã được chuẩn bị (6.2.4.2).

Sử dụng kit nhân gen (3.2.2) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

<sup>1)</sup> Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

## TCVN 8400-35 : 2015

Ví dụ: dùng bộ kit Taq PCR master mix, Qiagen (Cat. No. 201443)<sup>2)</sup>

Thành phần cho một phản ứng được nêu trong Bảng 2.

**Bảng 2 – Thành phần phản ứng PCR**

Thành phần	Thể tích (µl)
Taq PCR Master Mix kit	12,5
Mồi xuôi, 20 µM	0,5
Mồi ngược, 20 µM	0,5
Nước tinh khiết không có nuclease	6,5
Tổng thể tích	20

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

- Mẫu kiểm chứng dương: cho 5 µl mẫu ADN có kích cỡ sản phẩm đã biết vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm chứng âm: cho 5 µl nước (3.2.10) vào ống phản ứng;
- Mẫu bệnh phẩm: cho 5 µl mẫu ADN bệnh phẩm (6.2.4.1) vào ống phản ứng.

CHÚ THÍCH :

- Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu bệnh phẩm, mẫu kiểm chứng dương và mẫu kiểm chứng âm;
- Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (PCR) (4.3.1) đã được cài đặt chu trình nhiệt được nêu trong Bảng 3.

**Bảng 3 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR**

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
94 °C	3 min	1
94 °C	1 min	40
60 °C	1 min	

<sup>2)</sup> Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương. Tuy nhiên, thành phần và thể tích của phản ứng PCR có thể thay đổi phù hợp với từng phòng thí nghiệm.

**Bảng 3 (kết thúc)**

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
72 °C	1 min	40
72 °C	10 min	1

**6.2.4.4 Điện di****6.2.4.4.1 Chuẩn bị bản gel**

Pha agarose (3.2.4) với nồng độ agarose từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.5) (từ 1,5 gram đến 2 gram agarose với 100ml TAE 1X hoặc TBE 1X) vào chai thủy tinh 250 ml, lắc cho tan.

Sau đó đun dung dịch agarose sôi, để nguội đến khoảng 40 °C đến 50 °C thì bổ sung 10 µl chất nhuộm màu (3.2.6) cho 100 ml thạch. Lắc nhẹ để chất nhuộm màu tan đều, tránh tạo bọt.

Tiến hành đổ dung dịch agarose vào khay điện di đã được cài lược; không nên đổ bản gel dày quá 0,8 cm.

Khi bản agarose đông lại thì tiến hành gỡ lược khỏi bản gel.

Chuyển bản gel vào bể điện di (4.3.5), đổ dung dịch đệm (TBE 1X hoặc TAE 1X) (3.2.5) (cùng loại với dung dịch agarose đã đun) vào bể điện di cho tới khi ngập bản gel.

Có thể dùng các sản phẩm có sẵn chất nhuộm ADN để pha agarose (ví dụ: Sybr safe ADN gel stain<sup>3)</sup>) và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

**6.2.4.4.2 Chạy điện di**

Chuyển 2 µl Loading dye 6X (3.2.7) vào 8 µl mỗi loại mẫu (kiểm chứng âm, dương) (6.2.4.3) và sản phẩm PCR (6.2.4.3) ra trộn đều và cho vào các giếng trên bản gel (6.2.4.4.1).

Đưa gel vào chạy điện di trong bộ điện di (4.3.5) với thang chuẩn ADN (marker) (3.2.9) để dự đoán kích thước sản phẩm khuếch đại. Chuyển 10 µl thang chuẩn ADN (marker) (3.2.9) vào một giếng trên bản gel.

<sup>3)</sup> Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

## **TCVN 8400-35 : 2015**

Điện di ở hiệu điện thế 100 V trong thời gian 30 min.

Bản gel sau khi điện di xong được lấy ra và đọc kết quả trên máy đọc gel (blue light transilluminator) (4.3.6).

### **6.2.5 Đọc kết quả**

Đặt bản gen lên trên máy đọc gel (4.3.6):

- Mẫu dương tính có hiển thị vạch sản phẩm giống như mẫu kiểm chứng dương và có kích thước 785 bp với điều kiện mẫu kiểm chứng âm không có vạch sản phẩm xuất hiện;
- Mẫu âm tính giống mẫu kiểm chứng âm và không có vạch sản phẩm xuất hiện;
- Mẫu nghi ngờ hiển thị vạch sản phẩm không rõ nét hoặc hiển thị nhiều hơn 1 vạch sản phẩm. Trường hợp này cần xét nghiệm lại hoặc sử dụng các phương pháp khác để khẳng định.

## **6.3 Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể Theileria**

### **6.3.1 Lấy mẫu**

Sử dụng xylanh 5 ml và kim tiêm 20 G (hoặc 18 G) vô trùng, lấy từ 1,5 ml đến 2 ml máu ở tĩnh mạch cổ hoặc động mạch đuôi của trâu bò nghi mắc bệnh Theileria. Sau khi lấy, rút pittong lùi ra để tạo khoảng trống (hoặc bơm máu vào ống nghiệm vô trùng), ghi ký hiệu mẫu trên xylanh hoặc ống nghiệm rồi đặt nằm nghiêng 45° trong hộp đựng mẫu, để đông máu trong 1 h đến 2 h ở nhiệt độ bình thường, tránh ánh nắng trực tiếp.

### **6.3.2 Bảo quản mẫu**

Tất cả các mẫu bệnh phẩm đều được bảo quản trong thùng lạnh (nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C) chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 48 h. Trong trường hợp chưa xét nghiệm ngay, mẫu huyết thanh phải được ly tâm, chất lấy phần huyết thanh sang ống khác, bảo quản trong tủ lạnh âm sâu (4.1.1)

### **6.3.3 Chuẩn bị mẫu**

Chất huyết thanh từ xylanh (6.3.1) sang ống nghiệm vô trùng, kể từ lúc lấy máu đến lúc chất huyết thanh không quá 24 h, ghi ký hiệu của mẫu lên ống chứa huyết thanh.

### **6.3.4 Cách tiến hành**

VÍ DỤ: dùng bộ kit phát hiện kháng thể Theileria ở trâu bò của hãng SVANOVA<sup>4)</sup>

---

<sup>4)</sup> Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

**6.3.4.1 Chuẩn bị nguyên liệu**

- Dung dịch đệm: pha loãng dung dịch PBS - Tween 20 X với nước cất theo tỷ lệ 1/20 (cho 25 ml PBS Tween 20 X vào 475 ml nước cất), lắc đều. Bảo quản dung dịch đệm ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C;
- Dung dịch kháng kháng thể bò: pha loãng dung dịch kháng kháng thể bò với 11,5 ml dung dịch đệm (pha xong dùng ngay). Sau khi pha loãng bảo quản ở âm 20 °C. Dung dịch kháng kháng thể bò đông tan tối đa 3 lần;
- Pha loãng mẫu kiểm chứng (âm, dương) và mẫu bệnh phẩm (6.3.3) với dung dịch đệm theo tỷ lệ 1/100 (cho 5 µl mẫu kiểm chứng hoặc mẫu bệnh phẩm vào 495 µl dung dịch đệm).

**6.3.4.2 Tiến hành phản ứng**

- Các thuốc thử để ở nhiệt độ phòng từ 18 °C đến 25 °C trước khi sử dụng;
- Nhỏ 100 µl mẫu kiểm chứng (âm, dương) đã pha loãng (6.3.4.1) vào các giếng được chọn (mỗi mẫu thực hiện trên 2 giếng, vị trí của mẫu kiểm chứng đã được đánh dấu trong đĩa);
- Nhỏ 100 µl mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (6.3.4.1) vào giếng được chọn (mỗi mẫu có thể làm 1 giếng hoặc 2 giếng, tùy nhiên trong trường hợp xác định lại mỗi mẫu nên làm 2 giếng);
- Phủ kín đĩa và ủ ở tủ ấm (4.4.1) trong vòng 30 min;
- Rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch đệm (6.3.4.1);
- Nhỏ 100 µl dung dịch kháng kháng thể bò đã pha loãng (6.3.4.1) vào từng giếng;
- Phủ kín đĩa và ủ trong tủ ấm (4.4.1) trong 30 min;
- Rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch đệm (6.3.4.1);
- Nhỏ 100 µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng;
- Phủ kín đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 min;
- Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng;
- Phủ kín đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 min;
- Đọc đĩa ở bước sóng 405 nm bằng máy đọc ELISA (4.4.2) trong vòng 15 min.

**6.3.5 Đọc kết quả**

- Tính giá trị mật độ quang học (OD) của mẫu kiểm chứng (âm, dương) và mẫu bệnh phẩm.

## TCVN 8400-35 : 2015

- Tính tỷ lệ giá trị OD giữa mẫu bệnh phẩm hoặc mẫu kiểm chứng âm với mẫu kiểm chứng dương (PP) theo công thức sau:

$$PP = \frac{\text{OD mẫu bệnh phẩm hoặc mẫu kiểm chứng âm}}{\text{OD mẫu kiểm chứng dương}} \times 100$$

Giá trị mẫu kiểm chứng nằm trong khoảng giới hạn sau:

- 1) OD của mẫu kiểm chứng dương: trong khoảng từ 1,1 đến 2,3
  - 2) PP của mẫu kiểm chứng âm: nhỏ hơn 15
- Đánh giá kết quả đối với mẫu bệnh phẩm:
    - 1) PP nhỏ hơn 20: mẫu âm tính
    - 2) PP lớn hơn hoặc bằng 20: mẫu dương tính

CHÚ THÍCH: Kit phát hiện kháng thể *Theileria* không thể phân biệt được kháng thể do nhiễm tự nhiên hay kháng thể do tiêm vắc xin.

## 6.4 Phương pháp IFAT phát hiện kháng thể *Theileria*

### 6.4.1 Lấy mẫu

Xem 6.3.1.

### 6.4.2 Bảo quản mẫu

Xem 6.3.2.

### 6.4.3 Chuẩn bị mẫu

Xem 6.3.3.

### 6.4.4 Cách tiến hành

#### 6.4.4.1 Chuẩn bị kháng nguyên schizont

##### 6.4.4.1.1 Kháng nguyên schizont trên phiến kính

- Sử dụng kháng nguyên schizont được lấy từ dòng tế bào lympho khi gây nhiễm với *T. parva* hoặc dòng tế bào đại thực bào khi gây nhiễm với *T. annulata*;
- Nuôi cấy 200 ml đến 1 lít tế bào nhiễm schizont của loài *T. parva* hoặc *T. annulata* ở nồng độ  $10^6$  tế bào/ml. Kiểm tra khi thấy 90 % tế bào bị nhiễm là đạt yêu cầu;

- Ly tâm dung dịch nuôi cấy ở gia tốc 200 g bằng máy ly tâm lạnh (4.5.1) trong 20 min ở 4 °C. Bỏ dung dịch phía trên. Thu lấy phần cặn và hòa trong 100 ml dung dịch PBS lạnh (4 °C), pH 7,2 (3.4.1). Sau đó lặp lại bước này 3 lần;
- Thu phần cặn, hòa tan với dung dịch PBS (xấp xỉ 100 ml) để có nồng độ  $10^7$  tế bào/ml;
- Nhỏ dung dịch pha loãng ở trên thành lớp tế bào mỏng lên phiến kính đã chia thành nhiều ô nhỏ. Khi kiểm tra ở vật kính 40X thấy mỗi ô chứa khoảng 50 tế bào đến 80 tế bào;
- Để khô phiến kính trong không khí, cố định bằng axeton (3.4.2) trong 10 min. Bao gói và bảo quản phiến kính trong tủ lạnh âm sâu (4.1.1), được ít nhất 1 năm.

#### 6.4.4.1.2 Kháng nguyên schizont huyền phù

- Lấy khoảng 500 ml tế bào nhiễm *T. parva*, *T. annulata* hoặc *T. taurotragi* ở nồng độ  $10^6$  tế bào/ml đem ly tâm ở gia tốc 200 g bằng máy ly tâm lạnh (4.5.1) trong 10 min ở 4 °C, phần cặn thu được rửa 2 lần trong 100 ml dung dịch PBS lạnh. Có thể kiểm tra các tế bào bằng thuốc nhuộm eosin hoặc trypan blue (3.4.5);
- Phần cặn được hòa tan bằng cách nhỏ từng giọt dung dịch pha loãng (axeton và formaldehyd 0,1 % (3.4.3) theo tỷ lệ 4/1). Đảo nhẹ nhàng và liên tục đến khi đạt huyền phù. Để ổn định các tế bào dạng huyền phù trong tủ lạnh âm sâu (4.1.1) trong 24 h;
- Rửa, ly tâm ở gia tốc 200 g bằng máy ly tâm lạnh (4.5.1) trong 20 min ở 4 °C các tế bào trên 3 lần với dung dịch nước muối sinh lý 0,9 % lạnh. Phần cặn cuối cùng được pha với dung dịch nước muối sinh lý 0,9 % để đạt dạng huyền phù với nồng độ  $10^7$  tế bào/ml;
- Kháng nguyên được bảo quản trong dung dịch natri azide 0,2 % (3.4.4) (dung dịch chống phân hủy) ở tủ lạnh (4.1.2) trong 2 tuần hoặc ở tủ lạnh âm sâu (4.1.1) nếu lưu giữ trong thời gian dài.

#### 6.4.4.2 Chuẩn bị kháng nguyên piroplasm

##### 6.4.4.2.1 Kháng nguyên piroplasm trên phiến kính

- Kiểm tra máu của con vật gây nhiễm, khi lượng piroplasm trong máu đạt khoảng 10 % thì lấy 100 ml máu từ tĩnh mạch cổ vào ống chống đông chứa heparine hoặc EDTA, lắc nhẹ nhàng;
- Cho thêm 2 lít dung dịch PBS. Ly tâm dung dịch ở gia tốc 500 g bằng máy ly tâm lạnh (4.5.1) trong 10 min ở 4 °C. Bỏ phần dung dịch phía trên thu lấy phần cặn (hồng cầu). Lặp lại bước này 3 lần;
- Sau khi rửa xong, pha loãng hồng cầu trong PBS theo tỷ lệ 1/2. Nhỏ 5  $\mu$ l dung dịch pha loãng lên từng điểm trên phiến kính;
- Phiến kính được làm khô ở nhiệt độ phòng;



## TCVN 8400-35 : 2015

- Cố định phiến kính trong aceton lạnh 4 °C trong 10 min. Bao gói và bảo quản phiến kính ở tủ lạnh âm sâu (4.1.1) ít nhất 1 năm.

CHÚ THÍCH: Do không thể nuôi cấy giai đoạn piroplasm của *Theileria* spp. nên kháng nguyên piroplasm được lấy từ máu của con vật nhiễm bệnh. Đối với loài *T. parva*, *T. annulata* hoặc *T. taurotragi*, gây nhiễm thực nghiệm trên bê cật lách bằng cách tiêm dưới da hoặc gây nhiễm trên ve. Đối với loài *T. sergenti*, *T. buffeli*, *T. orientalis*, *T. mutan* hoặc *T. velifera* thường gây nhiễm trên bê cật lách qua đường tĩnh mạch hoặc ve.

### 6.4.4.2 Kháng nguyên piroplasm huyền phù

- Phương pháp này áp dụng cho *T. parva*;
- Lấy 100 ml máu của con vật gây nhiễm *T. parva* ở mức cao và làm tương tự như kháng nguyên schizont huyền phù.

### 6.4.4.3 Chuẩn hóa kháng nguyên

- Pha loãng kháng nguyên schizont (6.4.4.1.2) hoặc piroplasm ở dạng huyền phù (6.4.4.2.2) trong dung dịch PBS theo nồng độ từ 1/2 đến 1/16. Ở nồng độ pha loãng nào mà có khoảng 50 tế bào đến 80 tế bào nhiễm schizont hoặc 150 đến 200 hồng cầu nhiễm được nhìn thấy dưới vật kính 40 X thì dùng nồng độ đó để chuẩn hóa kháng nguyên;
- Kiểm tra kháng nguyên với huyết thanh kiểm chứng âm và huyết thanh kiểm chứng dương tính để xác định mức độ dương tính mạnh, trung bình và yếu.
- Đánh giá kết quả:
  - 1) Huyết thanh kiểm chứng dương: có màu huỳnh quang;
  - 2) Huyết thanh kiểm chứng âm: không có màu huỳnh quang.

### 6.4.4.4 Tiến hành phản ứng IFAT

#### 6.4.4.4.1 Đối với kháng nguyên schizont hoặc piroplasm trên phiến kính

- Bước 1: giải đông phiến kính phủ kháng nguyên ở 4 °C trong 30 min và sau đó để tiếp 30 min ở nhiệt độ phòng;
- Bước 2: vô hoạt mẫu bệnh phẩm trong 30 min trong nồi hấp ướt ở 56 °C;
- Bước 3: pha loãng mẫu bệnh phẩm, huyết thanh kiểm chứng (âm, dương) ở nồng độ 1/40 và 1/80 (có thể pha loãng ở các nồng độ cao hơn);
- Bước 4: nhỏ 25 µl của mỗi huyết thanh pha loãng vào từng điểm kháng nguyên;
- Bước 5: ủ phiến kính trong hộp ẩm ở nhiệt độ phòng trong 30 min;

- Bước 6: rửa bỏ huyết thanh thừa từ phức hợp kháng nguyên - kháng thể ở trên bằng cách nhúng phiến kính liên tiếp trong 2 lọ dung dịch PBS, mỗi lần 10 min;
- Bước 7: cho vào mỗi giếng 20 µl dung dịch kháng kháng thể bò được gắn chất màu huỳnh quang (fluorescein isothiocyanat - FITC) ở độ pha loãng thích hợp (nồng độ pha loãng phụ thuộc vào từng phòng thí nghiệm);
- Bước 8: để phiến kính trong hộp ẩm ở nhiệt độ phòng trong 30 min;
- Bước 9: gắn lamên lên trên phiến kính bằng một giọt dung dịch chứa PBS và glycerol (3.4.6) (tỷ lệ PBS/glycerol là 1/1);
- Bước 10: đọc phiến kính bằng kính hiển vi huỳnh quang (4.5.2).

#### 6.4.4.4.2 Đối với kháng nguyên schizont huyền phù

- Bước 1: giải đông kháng nguyên ở nhiệt độ phòng;
- Bước 2: nhỏ kháng nguyên huyền phù vào các điểm đã chia sẵn trên phiến kính;
- Bước 3: để khô phiến kính ở nhiệt độ phòng hoặc 37 °C;
- Bước 4: pha loãng huyết thanh kiểm chứng (âm, dương) và mẫu bệnh phẩm ở nồng độ 1/40 trong dung dịch lymphocyte lysate (3.4.7) (195 µl lymphocyte lysate với 5 µl huyết thanh);
- Bước 5: giống từ bước 4 đến bước 10 trong mục 6.4.4.4.1.

#### 6.4.4.4.3 Đối với kháng nguyên piroplasm huyền phù

- Bước 1: đánh tan kháng nguyên piroplasm huyền phù. Pha loãng kháng nguyên theo các bước đã chuẩn hóa ở trên (6.4.4.3);
- Bước 2: để phiến kính khô ở nhiệt độ phòng hoặc 37 °C (4.4.1);
- Bước 3: pha loãng huyết thanh kiểm chứng (âm, dương) và mẫu bệnh phẩm ở nồng độ 1/40 trong dung dịch lymphocyte lysate (3.4.7) (195 µl lymphocyte lysate với 5 µl huyết thanh);
- Bước 4: giống từ bước 4 đến bước 10 trong mục 6.4.4.4.1.

#### 6.4.5 Đọc kết quả

Kiểm tra phiến kính bằng kính hiển vi huỳnh quang (4.5.2)

- Mẫu dương tính đối với Theileria khi có màu huỳnh quang giống với màu của đối chứng dương;

## **TCVN 8400-35 : 2015**

- Mẫu âm tính đối với Theileria khi không có màu huỳnh quang giống với màu của đối chứng âm.

### **7 Kết luận**

Trâu bò được kết luận là mắc bệnh Theileria khi có các đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đại thể của bệnh và có kết quả xét nghiệm kháng nguyên hoặc kháng thể dương tính bằng một trong những phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

**Phụ lục A**

(Quy định)

**Thành phần và chuẩn bị thuốc thử****A.1 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS), 0,01 M, pH 7,0****A.1.1 Thành phần**

Natri hydrophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	9,47 g
Kali dihydrophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	9,08 g
Nước cất	900 ml

**A.1.2 Chuẩn bị**

Hòa tan natri hydrophosphat và kali dihydrophosphat trong 900 ml nước cất. Chỉnh pH đến 7,0 bằng axit clohydric.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng PBS thương mại và chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

**A.2 Dung dịch Giemsa, 10 %**

Dung dịch Giemsa (azur-eosin-methylen blue)	1 phần
Dung dịch PBS 0,01 M, pH 7,0 (A.1)	9 phần

CHÚ THÍCH: Nồng độ dung dịch Giemsa có thể thay đổi theo các phòng thí nghiệm.

**A.3 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE****A.3.1 Thành phần**

Dung dịch TBE 10X	100 ml
Nước khử ion	900 ml

**A.3.2 Chuẩn bị**

Lấy 100 ml dung dịch TBE 10X hoà chung với 900 ml nước khử ion, khuấy và lắc đều.

Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

**TCVN 8400-35 : 2015**

**A.4 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS), pH 7,2**

**A.4.1 Thành phần**

Natri clorua (NaCl)	8 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Dinatri hidrophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1,15 g
Kali dihidrophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,2 g
Nước cất	1 000 ml

**A.4.2 Chuẩn bị**

Hòa tan các thành phần trong nước. Chính pH đến 7,2 bằng axit clohydric.

Bảo quản ở 4 °C.

**Phụ lục B**  
(Tham khảo)

**Quy trình tách chiết ADN**

**CẢNH BÁO:** Việc tách chiết ADN có sử dụng hoá chất nguy hiểm và có khả năng gây hại nếu thao tác không cẩn thận. Do vậy, nên tránh tiếp xúc trực tiếp với da và hít phải hơi của các hoá chất này. Luôn luôn đeo găng tay, khẩu trang, mặc quần áo bảo hộ khi thực hiện các thao tác này.

Quy trình tách chiết ADN sử dụng kit DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506) như sau:

**B.1 Pha dung dịch**

- Dung dịch AW 1 (Wash buffer 1): thêm 125 ml etanol từ 96 % đến 100 % (thể tích) (3.2.5) vào 95 ml dung dịch AW1 đậm đặc;
- Dung dịch AW 2 (Wash buffer 2): thêm 160 ml etanol từ 96 % đến 100 % (thể tích) (3.2.5) vào 66 ml dung dịch AW2 đậm đặc.

**B.2 Cách tiến hành**

- Bước 1: ly giải mẫu
  - Với mẫu phủ tạng (6.2.3): nhỏ 180 µl dung dịch ATL vào ống 1.5 ml chứa phần dịch nổi sau khi được xử lý (6.1.4.1); nhỏ 20 µl protease K vào ống. Trộn đều bằng máy lắc trộn vortex (4.3.3), ủ ở 56 °C đến khi kết thúc quá trình ly giải, và trộn lại bằng máy lắc trộn vortex (4.3.3) 15 s trước khi chuyển sang bước 2;
  - Với mẫu máu (6.2.3): nhỏ 20 µl proteinase K vào ống 1.5 ml; thêm vào đó 50 µl đến 100 µl mẫu máu chống đông vào ống; thêm dung dịch PBS để được 220 µl. Tiến hành tiếp bước 2;
- Bước 2: nhỏ 200 µl dung dịch AL vào ống; trộn đều bằng máy lắc trộn vortex (4.3.3) trong 15 s. Ủ mẫu ở 56 °C trong 15 min;
- Bước 3: nhỏ 200 µl etanol từ 96 % đến 100 % (thể tích) vào ống, trộn đều bằng máy lắc trộn vortex (4.3.3).
- Bước 4: chuyển toàn bộ dung dịch trong ống vào cột lọc có ống thu; ly tâm cột lọc và ống thu ở gia tốc 6 000 g bằng máy ly tâm (4.3.2) trong 1 min, loại bỏ ống thu;

## **TCVN 8400-35 : 2015**

- Bước 5: chuyển cột lọc sang ống thu mới; nhỏ 500 µl dung dịch AW 1, ly tâm ở gia tốc 6 000 g bằng máy ly tâm (4.3.2) trong 1 min, loại bỏ ống thu;
- Bước 6: chuyển cột lọc sang ống thu mới; nhỏ 500 µl dung dịch AW 2, ly tâm ở gia tốc 20 000 g bằng máy ly tâm (4.3.2) trong 3 min, loại bỏ ống thu;
- Bước 7: chuyển cột lọc sang ống 1,5 ml hoặc 2 ml sạch;
- Bước 8: nhỏ 50 µl dung dịch AE vào giữa màng cột lọc, ủ 1 min ở nhiệt độ phòng (từ 15 °C đến 25 °C); ly tâm cột lọc và ống 1,5 ml hoặc 2 ml ở gia tốc 6 000 g bằng máy ly tâm (4.3.2) trong 1 min;
- Bước 9: bỏ cột lọc, giữ lại ống 1,5 ml hoặc 2 ml có chứa ADN;

Bảo quản ADN trong tủ lạnh (4.1.2) nếu thực hiện phản ứng PCR ngay hoặc trong tủ lạnh âm sâu (4.1.1) nếu thực hiện phản ứng PCR sau 24 h.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Hooshmand Rad P, Zwegarth E, Gerstenberg C, Phipps P, Brown CG. *Detection of Theileria annulata in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences*. Parasitology. 2000 Mar, 120(Pt3):245-54.
  - [2] *Theileria parva (T.parva-Ab)*. Available at:  
[http://www.veritastk.co.jp/attached/853/Insert\\_T\\_parva\\_19-2990-00-03.pdf](http://www.veritastk.co.jp/attached/853/Insert_T_parva_19-2990-00-03.pdf)
  - [3] Phạm Văn Khuê và Phan Lục, 1996, *Giáo trình kỹ sinh trùng thú y*. NXB Đại học Nông nghiệp I. 240-242.
  - [4] Carina M Hall., Joseph D Busch., Glen A Scoles., Kristina A Palma-Cagle., Massaro W Ueti., Lowell S Kappmeyer and David M Wagner, *Genetic characterization of Theileria equi infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S. introductions*. *Parasites & Vectors* 2013, 6:35
  - [5] Doliveira C., Vandermerve M., Habela M., Jacquiet P. & Jongejan F., 1995. *Detection of Theileria annulata in blood samples of carrier cattle by PCR*. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2665–2669.
  - [6] *Identification of Theileria species and characterization of Theileria parva stocks*. Available at:  
<http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5549e/x5549e0t.htm>
-