Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Tập 24, Số đặc biệt 1, 2026: 10-19 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.SP01.02
vie.vjas.vn

THIẾT LẬP, TỐI ƯU HOÁ VÀ ỨNG DỤNG PHẢN ỨNG MULTIPLEX PCR PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI *Trypanosoma evansi, Theileria* spp. VÀ *Anaplasma* spp. TRÊN BÒ TẠI VIỆT NAM

Dương Đức Hiếu[1*], Nguyễn Thị Hồng Chiên[1], Vương Hải Nam[1,2], Ngô Phương Anh[1], Nguyễn Thị Thu Hà[1,2]

[1]Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]P-Lab Vietnam Animal Healthcare

[*]Tác giả liên hệ: ddhieu@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 04.04.2026 Ngày chấp nhận đăng: 29.07.2026

TÓM TẮT

Trypanosoma evansi, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. là các tác nhân ký sinh trùng đường máu quan trọng ở bò, gây ảnh hưởng đến sức khỏe đàn và hiệu quả chăn nuôi. Nghiên cứu này nhằm thiết lập phản ứng multiplex PCR để phát hiện đồng thời ba tác nhân trên và đánh giá bước đầu khả năng ứng dụng trên mẫu máu bò thực địa tại Hà Nội. Ba cặp mồi đặc hiệu khuếch đại vùng gen 16S rDNA của *Anaplasma* spp., 18S rRNA của *Theileria* spp. và RoTat 1.2 VSG của *T. evansi* được sử dụng trong phản ứng. Kết quả cho thấy điều kiện tối ưu của multiplex PCR là nhiệt độ gắn mồi 54°C và nồng độ 10,0pmol cho mỗi mồi, tạo các băng khuếch đại rõ ràng, đúng kích thước dự kiến và không ghi nhận phản ứng không đặc hiệu với *Babesia* spp., *Haemoplasma* spp. và *Rickettsia* spp. Phản ứng phát hiện được DNA mục tiêu ở nồng độ 0,2 ng/µl. Khi áp dụng trên 54 mẫu máu bò thu tại trại Phù Đổng, Hà Nội, có 19 mẫu (35,2%) dương tính, trong đó *Theileria* spp. có tỷ lệ phát hiện cao nhất. Kết quả multiplex PCR hoàn toàn phù hợp với simplex PCR trên cùng bộ mẫu. Phản ứng này có tiềm năng ứng dụng trong sàng lọc nhanh đồng thời các tác nhân ký sinh trùng đường máu trên bò trong điều kiện thực địa ở Việt Nam.

Từ khóa: Ký sinh trùng đường máu, bò, chẩn đoán phân tử, đồng nhiễm, Hà Nội.

Establishing, Optimizing and Applying Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of *Trypanosoma evansi*, *Theileria* spp. and *Anaplasma* spp. in Cattle in Vietnam

ABSTRACT

Trypanosoma evansi, *Theileria* spp., and *Anaplasma* spp. are important blood-borne parasites in cattle that adversely affect animal health and production efficiency. This study aimed to establish a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of these three pathogens and to preliminarily evaluate its applicability to field blood samples collected in Hanoi. Three specific primer pairs targeting the 16S rDNA gene of *Anaplasma* spp., the 18S rRNA gene of *Theileria* spp., and the RoTat 1.2 VSG gene of *T. evansi* were used in the assay. The results showed that the optimal multiplex PCR conditions were an annealing temperature of 54°C and a primer concentration of 10.0 pmol for each primer, producing clear amplicons of the expected sizes without non-specific amplification with *Babesia* spp., *Haemoplasma* spp., or *Rickettsia* spp. The assay detected target DNA at concentrations as low as 0.2 ng/µl. When applied to 54 cattle blood samples collected from Phu Dong farm, Hanoi, 19 samples (35.2%) were positive, with *Theileria* spp. showing the highest detection rate. The multiplex PCR results were fully consistent with those of simplex PCR performed on the same samples. These findings suggest that multiplex PCR is a promising tool for rapid simultaneous screening of major blood parasites in cattle under field conditions in Vietnam.

Keywords: Blood parasites, cattle, molecular diagnosis, coinfection, Hanoi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ký sinh trùng đường máu là nhóm tác nhân gây bệnh quan trọng trên trâu bò ở nhiều quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới, trong đó *Trypanosoma evansi*, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. là ba tác nhân thường được quan tâm do khả năng gây thiếu máu, sốt, suy nhược, giảm tăng trọng, giảm sản lượng sữa và làm tăng chi phí điều trị, phòng bệnh (Seangseerattanakulchai & Piratae, 2021). Trong điều kiện chăn nuôi bán chăn thả còn phổ biến ở Việt Nam, gia súc có nguy cơ tiếp xúc thường xuyên với ve, ruồi hút máu và các vật trung gian truyền bệnh khác, từ đó làm gia tăng nguy cơ lưu hành các tác nhân ký sinh trùng đường máu trong đàn. Tại Việt Nam, sự lưu hành của các tác nhân ký sinh trùng đường máu trên đàn gia súc bao gồm *Trypanosoma evansi*, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. đã được ghi nhận khá phổ biến trong nhiều nghiên cứu với tỷ lệ nhiễm khá cao lần lượt là 22,4%; 27,5% và 28% (Ngô Thị Hồng Chiên & cs., 2023; Geurden & cs., 2008; Inoue & cs., 2001; Nguyen & cs., 2013).

Đặc biệt, do cùng chung vector truyền bệnh (ve, ruồi, mòng hút máu) nên tình trạng đồng nhiễm nhiều tác nhân ký sinh trùng đường máu trên cùng một cá thể gia súc là rất phổ biến. Nhiều nghiên cứu khoa học đã chỉ ra tỷ lệ đồng nhiễm tương đối cao trên bò, điển hình như tỷ lệ đồng nhiễm *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. là 26,08% ghi nhận tại Thái Lan và 33,5% tại Ấn Độ (Koonyosying & cs., 2022; Sa & cs., 2024; Weerasooriya & cs., 2016). Điều này càng củng cố thêm tính cấp thiết của việc giám sát đồng thời đối với những mầm bệnh này trên bò tại Việt Nam.

Bên cạnh đó, chẩn đoán lâm sàng các bệnh ký sinh trùng đường máu trên bò thường gặp khó khăn vì biểu hiện không đặc hiệu và dễ nhầm lẫn với nhiều bệnh truyền nhiễm khác. Soi tiêu bản máu nhuộm vẫn là phương pháp thường được sử dụng trong thực hành do đơn giản và chi phí thấp, nhưng độ nhạy hạn chế, nhất là ở giai đoạn mang trùng mạn tính, ký sinh trùng có mật độ thấp hoặc trường hợp đồng nhiễm nhiều tác nhân (Figueroa & cs., 1996). Các kỹ thuật sinh học phân tử, đặc biệt là phản ứng chuỗi polymerase (PCR), đã được chứng minh có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn trong phát hiện mầm bệnh ký sinh trùng đường máu, đồng thời cho phép nhận diện tác nhân ngay cả khi tải lượng DNA thấp (Bilgiç & cs., 2013a).

Tuy nhiên, nếu thực hiện simplex PCR cho từng tác nhân riêng, thời gian thao tác, lượng hóa chất tiêu hao và chi phí xét nghiệm sẽ tăng lên đáng kể khi cần sàng lọc số lượng mẫu lớn. Multiplex PCR là giải pháp có giá trị thực tiễn vì cho phép khuếch đại đồng thời nhiều gen đích trong cùng một phản ứng, qua đó rút ngắn thời gian xét nghiệm và nâng cao hiệu quả sàng lọc (Elnifro & cs., 2000). Trên thế giới, multiplex PCR đã được ứng dụng để phát hiện đồng thời một số tác nhân ký sinh trùng đường máu trên bò, nhưng tại Việt Nam số lượng nghiên cứu thiết lập quy trình phù hợp với điều kiện thực địa còn hạn chế.

Xuất phát từ thực tế đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm thiết lập và tối ưu hoá phản ứng multiplex PCR phát hiện đồng thời *T. evansi*, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. trên bò, đồng thời đánh giá bước đầu độ nhạy, độ đặc hiệu và khả năng ứng dụng của kỹ thuật này trên mẫu thực địa thu tại Hà Nội. Kết quả nghiên cứu được kỳ vọng sẽ cung cấp thêm cơ sở kỹ thuật cho công tác chẩn đoán và sàng lọc nhanh các bệnh ký sinh trùng đường máu trên bò ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Mẫu thực địa

Nghiên cứu sử dụng 54 mẫu máu bò thu ngẫu nhiên tại trại bò Phù Đổng, thành phố Hà Nội, vào tháng 3 năm 2021. Máu được lấy vào ống chống đông EDTA, bảo quản lạnh trong quá trình vận chuyển và lưu giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi tách chiết DNA.

2.1.2. Mẫu đối chứng

Mẫu đối chứng dương là một phần đoạn DNA tinh sạch của mầm bệnh (*Anaplasma* spp., *Theileria* spp. và *T. evansi)* đã được giải trình tự

và lưu giữ ở nhiệt độ -20°C tại Phòng nghiên cứu bệnh truyền lây và vector gieo truyền, Trung tâm Nghiên cứu xuất sắc và Đổi mới sáng tạo, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Ngoài ra, để kiểm tra tính đặc hiệu của phương pháp, nhóm tác giả cũng sử dụng DNA tinh sạch từ các tác nhân gây bệnh đồng nhiễm phổ biến khác như *Babesia* spp., *Haemoplasma* spp. và *Rickettsia* spp.

2.2. Hoá chất và thiết bị nghiên cứu

Phản ứng PCR được thực hiện bằng MyTaq™ HS Mix 2X (Meridian Bioscience/Bioline, Vương quốc Anh). Đây là hỗn hợp thương mại đã được chuẩn hóa sẵn, bao gồm MyTaq HS DNA polymerase, dNTPs, MgCl2 và đệm phản ứng. Do sử dụng hệ mastermix đã tối ưu sẵn của nhà sản xuất, nghiên cứu tập trung khảo sát hai thông số có ảnh hưởng trực tiếp nhất đến hiệu quả multiplex PCR là nhiệt độ gắn mồi và nồng độ mồi.

Các thiết bị chính sử dụng trong nghiên cứu gồm máy luân nhiệt Bioer, hệ thống điện di ngang Cleaver, máy đọc gel GelSMART (Dlab, Trung Quốc), micropipette và các dụng cụ thao tác sinh học phân tử thông dụng.

2.3. Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Các đoạn gen được lựa chọn để thiết kế phản ứng bắt cặp với DNA khuôn được khai thác từ các cơ sở dữ liệu trình tự gen công bố, phù hợp cho việc khuếch đại DNA của *Anaplasma* spp., *Theileria* spp. và *Trypanosoma evansi*. Ba cặp mồi sử dụng trong cả phản ứng simplex PCR và multiplex PCR đều được tham khảo từ các nghiên cứu trước đó. Cặp mồi thứ nhất khuếch đại đoạn có kích thước 345bp thuộc vùng đầu 5' của gen 16S rRNA, có khả năng phát hiện nhiều loài *Anaplasma* khác nhau, bao gồm *A. marginale*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*,... (Martin & cs., 2005). Cặp mồi thứ hai được thiết kế đặc hiệu cho vùng trung tâm biến thiên của gen 18S rRNA của *Theileria* spp. (Allsopp & cs., 1993). Cặp mồi thứ ba đích đến là đoạn gen RoTat 1.2 VSG đặc trưng của *Trypanosoma evansi* (Devi & cs., 2018).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Tách chiết DNA

DNA bộ gen của ký sinh trùng máu được tách chiết từ 50µl máu toàn phần theo nguyên tắc hấp phụ đặc hiệu lên màng silica, sử dụng bộ kit QIAamp Micro Kit (Qiagen, Đức). DNA sau tách chiết được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.4.2. Phương pháp simplex PCR

Phản ứng simplex PCR được tiến hành riêng rẽ cho từng tác nhân ký sinh trùng nhằm kiểm tra hoạt tính của từng cặp mồi và làm cơ sở so sánh với phản ứng multiplex PCR. Phản ứng được thực hiện trong ống PCR với tổng thể tích 25µl, bao gồm 12,5µl Master Mix 2 ×, 8,5µl nước không có nuclease, 1µl mồi xuôi và 1µl mồi ngược (nồng độ 1pmol mỗi mồi), cùng với 2µl DNA khuôn là các đối chứng dương tương ứng. Chu trình nhiệt của phản ứng gồm: biến tính ban đầu ở 98°C trong 2 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ gồm biến tính ở 98°C trong 10 giây, gắn mồi ở các mức nhiệt độ 54°C, 56°C và 58°C trong 10 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây. Sản phẩm PCR sau khuếch đại được bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tác nhân	Gene đích	Trình tự	Kích thước của đoạn gen đích	Nguồn
Anaplasma spp.	16S rDNA	F:GGTACCYACAGAAGAAGTCC R:TAGCACTCATCGTTTACAAGTGC	345bp	Martin & cs. (2005)
Theileria spp.	18S rRNA	F:AGTTTCTGACCTATCAG R:TTGCCTTAAACTTCCTTG	1.095bp	Allsopp & cs. (1993)
Trypanosoma evansi	RoTat 1.2	F:GCGGGGTGTTTAAAGCAATA R:ATTAGTGCTGCGTGTGTTCG	205bp	Devi & cs. (2018)

2.4.3. Thiết lập và tối ưu multiplex PCR

Phản ứng multiplex PCR được thiết lập nhằm khuếch đại đồng thời các đoạn gen đích của ba tác nhân ký sinh trùng đường máu gồm *Trypanosoma evansi*, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. Phản ứng được thực hiện trong ống PCR với tổng thể tích 50µl, bao gồm 25µl Master Mix 2x, 14µl nước không có nuclease, 1µl mỗi mồi xuôi và ngược của từng tác nhân và 5µl DNA khuôn là hỗn hợp đối chứng dương được pha trộn theo tỷ lệ 1:1:1 tương ứng với ba mầm bệnh *Trypanosoma evansi*, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp.

Chu trình nhiệt của multiplex PCR tương tự simplex PCR, trong đó nhiệt độ gắn mồi được khảo sát ở 54°C, 56°C và 58°C. Sau khi lựa chọn được nhiệt độ gắn mồi phù hợp, nồng độ mồi tiếp tục được khảo sát ở bốn mức 1,0; 2,5; 5,0 và 10,0pmol cho mỗi mồi trong một phản ứng nhằm xác định điều kiện tạo băng khuếch đại rõ, đúng kích thước và hạn chế sản phẩm không đặc hiệu.

2.4.4. Điện di và đọc kết quả

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose nồng độ 1,2%. Mỗi mẫu gồm 10µl sản phẩm PCR được trộn với 0,5µl dung dịch loading dye và nạp vào giếng gel. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% có bổ sung thuốc nhuộm an toàn trong đệm TAE 1X ở hiệu điện thế 120V trong 24 phút. Kết quả điện di được quan sát và ghi nhận bằng hệ thống đọc gel GelSMART (Dlab, Trung Quốc). Sự xuất hiện của các vạch DNA đặc hiệu được xác định dựa trên kích thước sản phẩm khuếch đại và so sánh với thang chuẩn DNA (Vazyme, Trung Quốc), từ đó xác định kết quả dương tính đối với *Theileria* spp., *Anaplasma* spp. và *Trypanosoma evansi*.

2.4.5. Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng multiplex PCR

Độ nhạy phản ứng được khảo sát bằng dãy pha loãng nối tiếp DNA đối chứng dương ở các mức 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}. Giới hạn phát hiện được xác định là mức nồng độ DNA thấp nhất sau khi pha loãng vẫn còn xuất hiện băng khuếch đại đặc hiệu có thể quan sát được trên gel điện di sản phẩm. Nồng độ DNA trước và sau pha loãng được xác định bằng cách đo quang phổ $OD_{260/280}$nm với máy Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Mỹ).

Độ đặc hiệu của phản ứng multiplex PCR được đánh giá thông qua việc kiểm tra khả năng khuếch đại không đặc hiệu khi sử dụng DNA khuôn được trộn lẫn cùng các tác nhân ký sinh trùng đường máu khác, bao gồm *Babesia* spp., *Haemoplasma* spp. và *Rickettsia* spp. Bên cạnh đó, các tổ hợp đồng nhiễm chứa hai trong số ba tác nhân mục tiêu, bao gồm: *Anaplasma* spp. và *Theileria* spp., *Theileria* spp. và *Trypanosoma evansi*, *Anaplasma* spp. và *Trypanosoma evansi* với tỷ lệ nồng độ DNA 1:1 cũng được sử dụng.

2.4.6. Ứng dụng multiplex PCR trên mẫu thực địa

DNA tách chiết từ 54 mẫu máu bò thực địa được phân tích bằng cả simplex PCR và multiplex PCR đã được tối ưu. Kết quả thu được từ hai phương pháp được đối chiếu nhằm đánh giá mức độ phù hợp của multiplex PCR trong sàng lọc các tác nhân ký sinh trùng đường máu trên bò.

2.4.7. Xử lý số liệu

Số liệu kết quả xét nghiệm mẫu được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

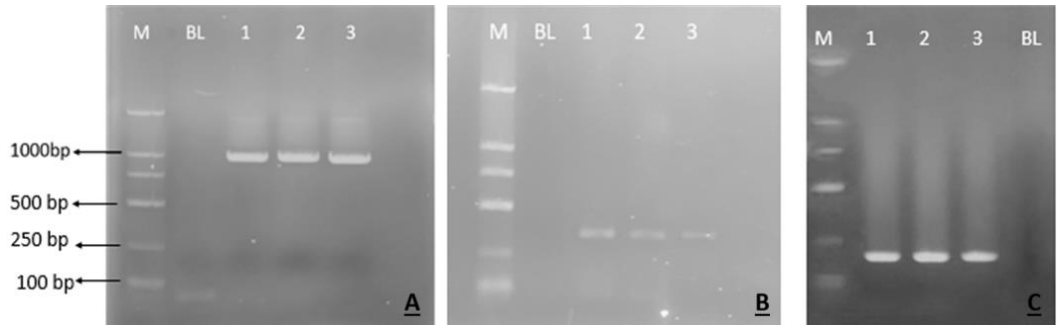
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả kiểm tra hoạt tính và nhiệt độ gắn mồi của từng cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Trước khi kết hợp các cặp mồi trong phản ứng multiplex PCR, mỗi cặp mồi được đánh giá riêng rẽ bằng simplex PCR ở các nhiệt độ gắn mồi 54°C, 56°C và 58°C. Kết quả điện di cho thấy cả ba cặp mồi đều tạo được sản phẩm khuếch đại có kích thước phù hợp với dự kiến, lần lượt khoảng 1.095bp đối với *Theileria* spp., 345bp đối với *Anaplasma* spp. và 205bp đối với *T. evansi* (Hình 1).

Bảng 2. Nồng độ DNA đối chứng dương trước và sau pha loãng

Tác nhân	Nồng độ DNA trước pha loãng (ng/µl)	Nồng độ DNA sau pha loãng (ng/µl)	Tỷ lệ pha loãng
Anaplasma spp.	219	21,9	1×10^{-1}
Theileria spp.	203	20,3	
Trypanosoma evansi	235	23,5	
Anaplasma spp.	219	2,19	1×10^{-2}
Theileria spp.	203	2,03	
Trypanosoma evansi	235	2,35	
Anaplasma spp.	219	0,22	1×10^{-3}
Theileria spp.	203	0,20	
Trypanosoma evansi	235	0,24	
Anaplasma spp.	219	0,02	1×10^{-4}
Theileria spp.	203	0,02	
Trypanosoma evansi	235	0,02	



Ghi chú: (BL): Đối chứng âm; (1): Sản phẩm PCR gắn mồi ở nhiệt độ 54°C; (2): Sản phẩm PCR gắn mồi ở nhiệt độ 56°C; (3): Sản phẩm PCR gắn mồi ở nhiệt độ 58°C cho lần lượt các mầm bệnh Theileria spp. *(A), Anaplasma* spp. *(B), Trypanosoma evansi (C).*

Hình 1. Điện di sản phẩm simplex PCR có chu trình nhiệt với nhiệt độ gắn mồi khác nhau

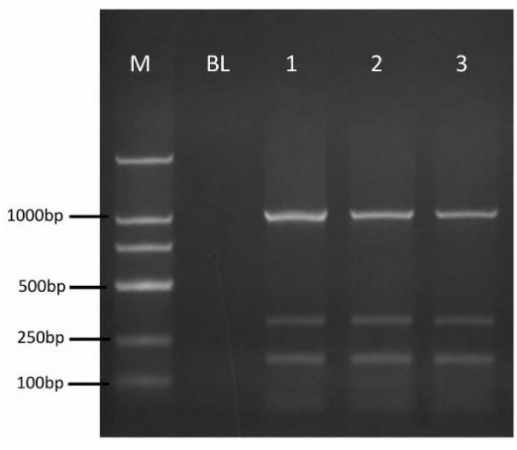
Trong ba mức nhiệt khảo sát, nhiệt độ 54°C cho tín hiệu khuếch đại ổn định và rõ nhất đối với cả ba cặp mồi, đặc biệt là cặp mồi phát hiện *Anaplasma* spp. Do đó, 54°C được xác định là nhiệt độ gắn mồi tối ưu, phù hợp cho việc khuếch đại đồng thời cả ba tác nhân đích.

3.2. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi trong phản ứng multiplex PCR

Ở nhiệt độ gắn mồi 54°C, phản ứng multiplex PCR tạo được ba băng khuếch đại rõ ràng, tách biệt, đúng kích thước dự kiến và không xuất hiện băng phụ. Khi tăng nhiệt độ gắn mồi lên 56°C và 58°C, cường độ băng khuếch đại giảm, đặc biệt đối với một số băng đích có kích thước nhỏ hơn. Kết quả này cho thấy 54°C là nhiệt độ phù hợp nhất để bảo đảm sự gắn mồi đồng thời và hiệu quả của cả ba cặp mồi trong cùng một phản ứng (Hình 2).

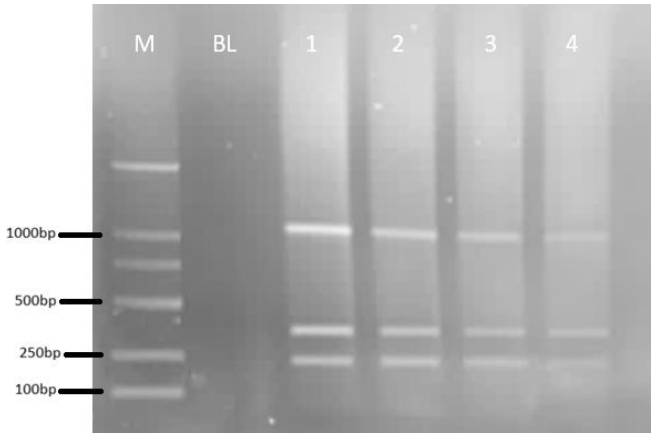
3.3. Kết quả tối ưu nồng độ mồi trong phản ứng multiplex PCR

Bốn mức nồng độ mồi được khảo sát gồm 1,0; 2,5; 5,0 và 10,0pmol cho mỗi mồi, trong điều kiện nhiệt độ gắn mồi được cố định là 54°C. Kết quả điện di cho thấy cả bốn mức nồng độ mồi trong các phản ứng đều cho băng khuếch đại đặc hiệu (Hình 3). Tuy nhiên, ở mức 10,0pmol cho mỗi mồi, ba băng khuếch đại quan sát được rõ nhất, đồng đều hơn và không ghi nhận sản phẩm không đặc hiệu. Vì vậy, nồng độ 10,0pmol cho mỗi mồi được lựa chọn cho quy trình multiplex PCR tối ưu.



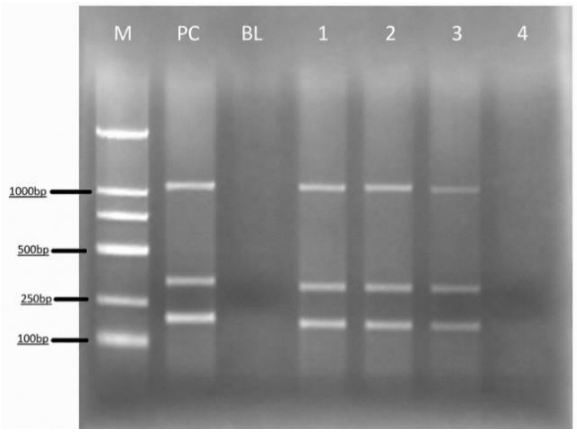
Ghi chú: (BL): Đối chứng âm; (1): Nhiệt độ gắn mồi 54°C; (2): Nhiệt độ gắn mồi 56°C; (3): Nhiệt độ gắn mồi 58°C.

Hình 2. Điện di sản phẩm multiplex PCR với các mức nhiệt độ gắn mồi khác nhau



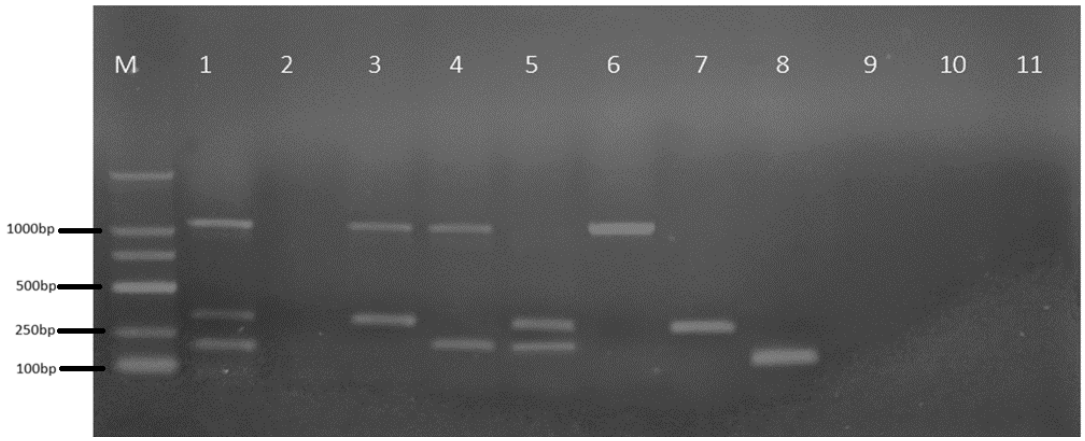
Ghi chú: (BL): Đối chứng âm; (1): Nồng độ mồi 10pmol; (2): Nồng độ mồi 5pmol; (3): Nồng độ mồi 2,5pmol; (4): Nồng độ mồi 1pmol.

Hình 3. Điện di sản phẩm multiplex PCR có các nồng độ mồi khác nhau



Ghi chú: (PC): Đối chứng dương, (BL): Đối chứng âm, (1), (2), (3), (4): Mức pha loãng DNA lần lượt 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}

Hình 4. Điện di sản phẩm multiplex PCR có nồng độ DNA được pha loãng dần theo các nồng độ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} và 10^{-4}



Ghi chú: (1): Đối chứng dương; (2): Đối chứng âm; (3): Mẫu đồng nhiễm với Anaplasma spp. *và Theileria* spp.; *(4): Mẫu đồng nhiễm với Theileria* spp. *và Trypanosoma evansi.; (5): Mẫu đồng nhiễm với Anaplasma* spp. *và Trypanosoma evansi.; (6): Mẫu chỉ dương tính với Theileria* spp.*; (7): Mẫu chỉ dương tính với Anaplasma* spp.; *(8): Mẫu chỉ dương tính với Trypanosoma evansi; (9): Mẫu chỉ dương tính với Babesia* spp.; *(10): Mẫu chỉ dương tính với Rickettsia* spp.; *(11): Mẫu chỉ dương tính với Haemoplasma* spp.

Hình 5. Điện di sản phẩm multiplex PCR với các mầm bệnh

Bảng 3. Kết quả phát hiện tác nhân ký sinh trùng đường máu trên 54 mẫu bò thực địa bằng simplex PCR và multiplex PCR

Mầm bệnh	Số mẫu kiểm tra	Simplex PCR	Multiplex PCR
Theileria spp.	54	14 (25,9%)	14 (25,9%)
Anaplasma spp.	54	1 (1,84%)	1 (1,84%)
Trypanosoma evansi	54	2 (3,7%)	2 (3,7%)
Đồng nhiễm *Anaplasma* spp. và *Theileria* spp.	54	2 (3,7%)	2 (3,7%)
Tổng mẫu dương tính		19 (35,2%)	19 (35,2%)

3.4. Kết quả đánh giá độ nhạy của phản ứng multiplex PCR

Phản ứng multiplex PCR phát hiện được đồng thời cả ba DNA đích ở các mức pha loãng 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} và 10^{-4} của DNA đối chứng dương. Ở mức pha loãng 10^{-3} tương ứng với nồng độ DNA xấp xỉ 0,2 ng/µl, các băng khuếch đại vẫn được quan sát rõ trên gel, trong khi nồng độ 0,02 ng/µl (mức pha loãng 10^{-4}) băng khuếch đại không còn được ghi nhận, cho thấy phản ứng multiplex PCR của nghiên cứu này có khả năng phát hiện DNA mục tiêu ở nồng độ thấp nhất là xấp xỉ 0,2 ng/µl.

3.5. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phản ứng multiplex PCR

Thử nghiệm độ đặc hiệu với DNA của *Babesia* spp., *Haemoplasma* spp. và *Rickettsia* spp. trong các tổ hợp khác nhau khi trộn lẫn với DNA của các tác nhân mục tiêu trong nghiên cứu, phản ứng multiplex PCR không tạo băng khuếch đại không đặc hiệu hay ghi nhận phản ứng chéo.

3.6. Kết quả ứng dụng multiplex PCR trên mẫu thực địa

Khi áp dụng quy trình đã tối ưu trên 54 mẫu máu bò thực địa, có 19 mẫu dương tính với ít nhất một tác nhân ký sinh trùng đường máu, tương ứng tỷ lệ 35,2%. Trong đó, *Theileria* spp. được phát hiện với tỷ lệ cao nhất, gồm 14 mẫu nhiễm đơn (25,9%). *T. evansi* được phát hiện ở hai mẫu nhiễm đơn (3,7%), *Anaplasma* spp. ở một mẫu nhiễm đơn (1,9%) và đồng nhiễm *Theileria* spp. với *Anaplasma* spp. ở 2 mẫu (3,7%). Có 35/54 mẫu âm tính với cả ba tác nhân, tương ứng 64,8%.

Kết quả multiplex PCR trên bộ mẫu thực địa phù hợp với kết quả thu được từ simplex PCR, cho thấy quy trình thiết lập trong nghiên cứu có thể được sử dụng như một công cụ sàng lọc nhanh đồng thời các tác nhân ký sinh trùng đường máu quan trọng trên bò.

4. THẢO LUẬN

Kỹ thuật multiplex PCR đã được phát triển rộng rãi nhằm tối ưu hóa việc phát hiện đồng thời các tác nhân ký sinh trùng đường máu trên gia súc. Nghiên cứu trên thế giới thường tập trung vào *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. và *Theileria* spp. do tỷ lệ lưu hành và khả năng đồng nhiễm cao trong các quần thể vật nuôi (Koonyosying & cs., 2022; Kubelová & cs., 2012; Renneker & cs., 2013). Tuy nhiên, thực tế dịch tễ tại Việt Nam lại ghi nhận sự hiện diện đáng kể của *Anaplasma* spp., *Theileria* spp., *Trypanosoma* spp. (Geurden & cs., 2008; Nguyen & cs., 2013; Weerasooriya & cs., 2016). Sự tồn tại của các tác nhân này không chỉ gây ra nhiều vấn đề về sức khoẻ vật nuôi mà còn là rào cản lớn đối với năng suất của đàn gia súc, hệ quả là gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng trong chăn nuôi (Strydom & cs., 2023).

Nghiên cứu này đã thiết lập và tối ưu thành công phản ứng multiplex PCR phát hiện đồng thời *T. evansi*, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. trên bò trong cùng một phản ứng. Đây là hướng tiếp cận có ý nghĩa thực tiễn vì trong điều kiện chẩn đoán thường quy, đặc biệt ở các phòng thí nghiệm cần sàng lọc nhiều mẫu, việc giảm số lượng phản ứng đơn lẻ sẽ giúp tiết kiệm thời gian thao tác, hóa chất và nhân lực, đồng thời vẫn duy trì khả năng phát hiện đồng nhiễm. Kết quả này phù hợp với nhận định của các nghiên cứu ứng dụng multiplex PCR trước đây trong chẩn đoán tác nhân ký sinh trùng đường máu trên gia súc (Elnifro & cs., 2000; Bilgiç & cs., 2013a; Charaya & cs., 2021).

Trong nghiên cứu này, nhiệt độ gắn mồi 54°C và nồng độ 10,0pmol cho mỗi mồi là điều kiện phù hợp nhất cho phản ứng multiplex PCR. Về nguyên tắc, multiplex PCR đòi hỏi các cặp mồi phải có khả năng hoạt động tương thích trong cùng một phản ứng, nếu nhiệt độ gắn mồi quá cao hoặc nồng độ mồi quá thấp, một số đích có thể bị khuếch đại yếu hơn do cạnh tranh với các đích khác. Việc lựa chọn 54°C giúp duy trì khả năng gắn mồi hiệu quả đối với cả ba cặp mồi, trong khi nồng độ 10,0pmol tạo được cường độ băng rõ và ổn định hơn so với các mức thấp hơn.

Độ nhạy của phản ứng multiplex PCR được kiểm chứng thông qua kết quả nồng độ DNA thấp nhất có thể phát hiện được bằng hình ảnh điện di đối với vật liệu di truyền của *Anaplasma* spp., *Theileria* spp. và *Trypanosoma evansi*, ở nồng độ DNA tương ứng lần lượt là 0,22; 0,20 và 0,24 ng/µl. Kết quả điện di cho thấy phản ứng multiplex PCR vẫn khuếch đại được đồng thời cả ba mầm bệnh ở tất cả các nồng độ DNA khảo sát chứng tỏ quy trình có độ nhạy tương đối cao và ổn định trong điều kiện thí nghiệm. Đồng thời, phản ứng cho kết quả âm tính hoàn toàn với *Babesia* spp., *Haemoplasma* spp. và *Rickettsia* spp., qua đó củng cố độ đặc hiệu của các cặp mồi đối với ba tác nhân đích. Việc lựa chọn các gen đích bảo tồn như 16S rDNA (đối với *Anaplasma* spp.), 18S rRNA (đối với *Theileria* spp.) và RoTat 1.2 (đối với *T. evansi*) đã được nhiều nghiên cứu trước đó chứng minh là phù hợp cho chẩn đoán phân tử với độ đặc hiệu và độ tin cậy cao (Allsopp & cs., 1993; Devi & cs., 2018; Martin & cs., 2005).

Kết quả ứng dụng trên mẫu thực địa cho thấy *Theileria* spp. là tác nhân được phát hiện với tỷ lệ cao nhất. Điều này phù hợp với đặc điểm dịch tễ của chi *Theileria* ở vùng nhiệt đới, nơi ve truyền bệnh lưu hành phổ biến trên đàn bò (Selim & cs., 2022). Việc ghi nhận sự đồng nhiễm *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. cũng có ý nghĩa thực tiễn, bởi đồng nhiễm có thể làm phức tạp biểu hiện lâm sàng và ảnh hưởng đến quyết định điều trị cũng như kiểm soát bệnh trong đàn. Sự phù hợp và đồng nhất về kết quả giữa multiplex PCR và simplex PCR trên cùng một bộ mẫu thực địa bước đầu cho thấy kỹ thuật multiplex PCR thiết lập trong nghiên cứu này có tính ứng dụng cao trong sàng lọc mầm bệnh ký sinh trùng đường máu ở bò trên thực tế.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết lập và tối ưu hoá thành công phản ứng multiplex PCR phát hiện đồng thời *T. evansi*, *Theileria* spp. và *Anaplasma* spp. trên bò. Điều kiện phản ứng phù hợp nhất là nhiệt độ gắn mồi 54°C và nồng độ 10,0pmol cho mỗi mồi. Phản ứng cho các băng khuếch đại rõ, đúng kích thước, không ghi nhận khuếch đại không đặc hiệu với *Babesia* spp., *Haemoplasma* spp. và *Rickettsia* spp.. Đồng thời, trong phạm vi các mức pha loãng thử nghiệm, phản ứng ghi nhận khả năng phát hiện DNA mục tiêu ở nồng độ thấp nhất là xấp xỉ 0,2 ng/µl.

Khi áp dụng trên 54 mẫu máu bò thực địa tại Hà Nội, multiplex PCR cho kết quả tương đồng với simplex PCR và phát hiện được 35,2% mẫu dương tính với ít nhất một tác nhân, trong đó *Theileria* spp. chiếm tỷ lệ cao nhất. Kết quả cho thấy kỹ thuật multiplex PCR này có tiềm năng ứng dụng trong sàng lọc nhanh các tác nhân ký sinh trùng đường máu quan trọng trên bò tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Allsopp B.A., Baylis H.A., Allsopp M.T., Cavalier-Smith T., Bishop R.P., Carrington D.M., Sohanpal B. & Spooner P. (1993). Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. Parasitology. 107(Pt2): 157-165. https://doi.org/10.1017/s0031182000067263

Bilgiç H.B., Karagenç T., Simuunza M., Shiels B., Tait A., Eren H. & Weir W. (2013a). Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. Experimental Parasitology. 133(2): 222-229. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.005

Charaya G., Rakha N.K., Kumar A., Maan S. & Goel P. (2021). End Point Multiplex PCR for Diagnosis of Haemoprotozoan Diseases in Cattle. Acta Parasitologica. 66(1): 91-97. https://doi.org/10.1007/s11686-020-00259-2

Devi A., Shanker D., Sudan V., Jaiswal A., Singh A. & Chaudhary M. (2018). Phylogenetic studies on RoTat 1.2 VSG of Trypanosoma evansi isolate from semi arid India. The Indian Journal of Animal Sciences. 88: 150-152. https://doi.org/10.56093/ijans.v88i2.79290.

Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J. & Klapper P.E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. Clinical Microbiology Reviews. 13(4): 559-570. https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559

Figueroa J.V., Alvarez J.A., Canto G.J., Ramos J.A., Mosqueda J.J. & Buening G.M. (1996). Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. Annals of the New York Academy of Sciences. 791: 117-127. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb53518.x

Geurden T., Somers R., Thanh N.T.G., Vien L.V., Nga V.T., Giang H.H., Dorny P., Giao H.K. & Vercruysse J. (2008). Parasitic infections in dairy cattle around Hanoi, northern Vietnam. Veterinary Parasitology. 153(3): 384-388. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.031

Inoue M., Nguyen D.V., Meas S., Ohashi K., Sen S., Sugimoto C. & Onuma M. (2001). Survey of Theileria Parasite Infection in Cattle in Cambodia and Vietnam Using Piroplasm Surface Protein Gene-Specific Polymerase Chain Reaction. Journal of Veterinary Medical Science. 63(10): 1155-1157. https://doi.org/10.1292/jvms.63.1155

Koonyosying P., Rittipornlertrak A., Chomjit P., Sangkakam K., Muenthaisong A., Nambooppha B., Srisawat W., Apinda N., Singhla T. & Sthitmatee N. (2022). Incidence of hemoparasitic infections in cattle from central and northern Thailand. PeerJ. 10: e13835. https://doi.org/10.7717/peerj.13835.

Kubelová M., Mazancová J. & Siroký P. (2012). *Theileria*, *Babesia*, and *Anaplasma* detected by PCR in ruminant herds at Bié Province, Angola. Parasite (Paris, France). 19(4): 417-422. https://doi.org/10.1051/parasite/2012194417.

Martin A.R., Brown G.K., Hugh Dunstan R. & Roberts T.K. (2005). Anaplasma platys: An improved PCR for its detection in dogs. Experimental Parasitology. 109(3): 176-180. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.11.007.

Nguyễn Thị Hồng Chiên, Hoàng Thanh Trúc, Nguyễn Văn Dương, Bùi Thị Tố Nga, Đào Lê Anh, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Đức Trường & Nguyễn Thị Hoàng Yến (2023). Một số chỉ tiêu huyết học ở bò sữa Holstein Friesian nhiễm Theileria spp. tại tỉnh Hà Nam. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 21(11): 1455-1462.

Nguyen Q., Nguyen T.-T., Pham Q., Le Ngoc M., Nguyen G. & Inoue N. (2013). Seroprevalence of Trypanosoma evansi Infection in Water Buffaloes from the Mountainous Region of North Vietnam

and Effectiveness of Trypanocidal Drug Treatment. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science.75. https://doi.org/10.1292/jvms.12-0533

Renneker S., Abdo J., Bakheit M.A., Kullmann B., Beyer D., Ahmed J., Seitzer U. (2013). Coinfection of sheep with *Anaplasma*, *Theileria* and *Babesia* species in the Kurdistan Region, Iraq. Transboundary and emerging diseases. 60(2). https://doi.org/10.1111/tbed.12148

Sa F., Hn G., Pn M. & Ln S. (2024). Molecular detection of *Anaplasma*, *Babesia*, *Theileria*, and *Trypanosoma* infection in cattle and buffaloes in India. Journal of Parasitic Diseases : Official Organ of the Indian Society for Parasitology. 48(3). https://doi.org/10.1007/s12639-024-01673-3

Seangseerattanakulchai K. & Piratae S. (2021). Drug resistance in blood parasitic infections in cattle: A review. Annals of Parasitology. 67(4): 583-590. https://doi.org/10.17420/ap6704.374

Selim A., Weir W. & Khater H. (2022). Prevalence and risk factors associated with tropical theileriosis in Egyptian dairy cattle. Veterinary World. 15(4): 919-924. doi.org/10.14202/vetworld.2022.919-924.

Strydom T., Lavan R.P., Torres S. & Heaney K. (2023). The Economic Impact of Parasitism from Nematodes, Trematodes and Ticks on Beef Cattle Production. Animals: An Open Access Journal from MDPI. 13(10): 1599. https://doi.org/10.3390/ani13101599

Weerasooriya G., Sivakumar T., Lan D.T.B., Long P.T., Takemae H., Igarashi I., Inoue N. & Yokoyama N. (2016). Epidemiology of bovine hemoprotozoa parasites in cattle and water buffalo in Vietnam. The Journal of Veterinary Medical Science. 78(8): 1361. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0099