

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8400-35:2015

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

Animal diseases - Diagnostic procedure - Part 35: Bovine theileriosis

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 brucella;
- 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 8400-17 : 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.

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 Kít tách chiết ADN (axit deoxyribonucleic), dùng cho mẫu máu hoặc mẫu mô.

3.2.2 Kít 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 kít 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 Lamen, 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.

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;
- Ỉa 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 đông 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 l đến 10 l) lên một đầu của phiến kính (4.2.1);
- Dàn mỏng giọt máu bằng lamén (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)¹⁾ (xem Phụ lục B).

6.2.4.2 Chuẩn bị mẫu

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 mồi (3.2.3) được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 - Trình tự cặp mồi ^[1]

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

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

Mồi được chuẩn bị như sau:

- Chuẩn bị mồi gốc: mồi 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 mồi 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 mồi ở nồng độ 100 M làm mồi gốc.

- Chuẩn bị mồi sử dụng ở nồng độ 20 M, pha loãng mồi gốc bằng nước (3.2.10) (20 I mồi gốc và 80 I nước).

6.2.4.3 Tiến hành phản ứng

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

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

Ví DỤ: dùng bộ kit Taq PCR master mix, Qiagen (Cat. No. 201443)²⁾

¹⁾ 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.

²⁾ 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.

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

Bảng 2 - Thành phần phản ứng PCR

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

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

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