

THỬ NGHIỆM KIT CATT ĐỂ CHẨN ĐOÁN BỆNH TIÊN MAO TRÙNG CHO TRÂU TẠI TỈNH TUYÊN QUANG

Phạm Thị Trang^{1*}, Nguyễn Thị Kim Lan¹, Phạm Công Hoạt²

¹Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên

²Bộ Khoa học và Công nghệ

TÓM TẮT

Thử nghiệm Kit CATT trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng trên trâu nhiễm và không nhiễm tiên mao trùng tại tỉnh Tuyên Quang. Kết quả cho thấy:

Kit CATT sau khi chế tạo có độ nhạy của phản ứng là 100%, độ đặc hiệu của phản ứng là 98,68%. So sánh hiệu quả sử dụng của Kit CATT với kỹ thuật ELISA, PCR và tiêm truyền chuột nhất trắng trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho thấy: phương pháp tiêm truyền chuột phát hiện 100% số trâu nhiễm hoặc không nhiễm tiên mao trùng, kỹ thuật PCR có độ nhạy là 100% và độ đặc hiệu là 98,35%, kỹ thuật ELISA là 98,48% và 97,11%, Kit CATT là 98,48% và 97,52%.

Từ khóa: Bệnh tiên mao trùng, Kit CATT, độ nhạy, độ đặc hiệu, chẩn đoán

MỞ ĐẦU

Hàng năm, bệnh tiên mao trùng thường xuyên xảy ra trên đàn trâu, bò nuôi tại Việt Nam. Theo số liệu của Phạm Sỹ Lăng và cs. (2008) [3], Nguyễn Thị Kim Lan (2012) [1], bệnh tiên mao trùng xuất hiện ở nhiều vùng trên cả nước, với tỷ lệ mắc khá cao: Trên trâu là 13 - 30%, trên bò là 7 - 14%, tỷ lệ gia súc mắc bệnh chết có thể lên tới 6,3 - 20%, gây thiệt hại lớn cho người chăn nuôi. Các phương pháp thường quy thường mất nhiều thời gian, dẫn đến hiệu quả chẩn đoán và điều trị bệnh thấp. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu chế tạo Kit CATT từ kháng nguyên tái tổ hợp RoTAT 1.2 của loài tiên mao trùng *Trypanosoma evansi* để phục vụ công tác chẩn đoán bệnh, góp phần phát hiện nhanh và điều trị bệnh kịp thời cho gia súc, từ đó góp phần làm giảm thiệt hại do bệnh gây ra.

Nhằm xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của Kit CATT chế tạo trong năm 2015 - 2016, chúng tôi đã nghiên cứu thử nghiệm Kit CATT để chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho trâu tại tỉnh Tuyên Quang.

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nội dung nghiên cứu

- Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của Kit CATT sau khi chế tạo.

- Thử nghiệm Kit CATT chế tạo từ kháng nguyên tái tổ hợp RoTAT 1.2 để chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho trâu ở tỉnh Tuyên Quang, so sánh hiệu quả chẩn đoán bệnh bằng Kit CATT với kỹ thuật ELISA, PCR và tiêm truyền chuột.

Vật liệu

- Mẫu huyết thanh của trâu đã được gây nhiễm tiên mao trùng và mẫu đối chứng.

- Mẫu huyết thanh của trâu nhiễm và không nhiễm tiên mao trùng ở tỉnh Tuyên Quang đã được xác định bằng phương pháp tiêm truyền chuột nhất trắng.

- Kit CATT chế tạo từ kháng nguyên tái tổ hợp RoTAT 1.2 của loài tiên mao trùng *Trypanosoma evansi*. Thành phần của KIT gồm: 1 tuýp có nắp màu đỏ chứa 1 ml kháng thể đối chứng dương, 1 tuýp có nắp màu xanh chứa 1 ml kháng thể đối chứng âm, 1 tuýp có nắp màu vàng chứa kháng nguyên RoTAT 1.2 phủ lên hạt latex, 1 ống falcon chứa 20 ml dung dịch để pha loãng huyết thanh, 5 bản nhựa (card) mỗi bản có 10 ô tròn để thực hiện phản ứng, 5 que nhựa để khuấy trộn kháng nguyên và kháng thể, 1 bản hướng dẫn sử dụng Kit.

- Các loại hóa chất và dụng cụ thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định trâu nhiễm và trâu không nhiễm tiên mao trùng

* Tel: 0948 429425, Email: phamthitrang@tuaf.edu.vn

Các mẫu máu trâu thu thập ở tỉnh Tuyên Quang được tiêm truyền cho chuột nhắt trắng (mỗi mẫu sau khi lấy được tiêm ngay 0,2 ml vào xoang phúc mạc chuột). Theo dõi biểu hiện của chuột thí nghiệm sau tiêm truyền. Hàng ngày kiểm tra máu chuột thí nghiệm để phát hiện tiên mao trùng. Nếu trong máu chuột xuất hiện tiên mao trùng thì kết luận trâu đã bị nhiễm tiên mao trùng. Ngược lại thì kết luận là trâu không nhiễm tiên mao trùng.

Phần máu còn lại cho vào ống nghiệm và để nghiêng sao cho diện tích bề mặt máu rộng tối đa. Cố định ống nghiệm cho đến khi máu đông, chặt lấy huyết thanh. Bảo quản huyết thanh ở nhiệt độ lạnh - 20° C, sử dụng huyết thanh để thử nghiệm Kit CATT.

Phương pháp sử dụng Kit CATT gồm 6 bước sau:

- Bước 1: Chuyển KIT về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Bước 2: Dùng micropipet lấy 0,5 ml dung dịch pha loãng huyết thanh vào eppendorf.
- Bước 3: Lấy 0,1 ml huyết thanh cần chuẩn đoán vào ống eppendorf có chứa dung dịch pha loãng huyết thanh và lắc đều.

- Bước 4: Nhỏ lên các ô tròn trên card phản ứng, mỗi ô một giọt (10 µl) dung dịch kháng nguyên (chứa trong ống nắp màu vàng).

- Bước 5: Nhỏ các mẫu huyết thanh cần chẩn đoán (đã chuẩn bị ở bước 3), huyết thanh dương tính chuẩn (chứa trong ống nắp màu đỏ), huyết thanh âm tính chuẩn (chứa trong ống nắp màu xanh) vào các ô đã chứa kháng nguyên. Mỗi ô một giọt (10 µl) dung dịch huyết thanh, hoặc huyết thanh cần chẩn đoán, hoặc huyết thanh dương tính chuẩn, hoặc huyết thanh âm tính chuẩn.

- Bước 6: Dùng que khuấy, trộn đều các giọt kháng nguyên và kháng thể. Giữ card phản ứng trong 10 phút rồi đọc kết quả dựa trên sự hình thành các đám ngưng kết. Có hiện tượng ngưng kết tức là mẫu kiểm tra dương tính (+) với tiên mao trùng. Không có hiện tượng ngưng kết là mẫu âm tính (-). Trường hợp hiện tượng ngưng kết nhưng không rõ là trường hợp nghi ngờ, cần tiến hành lại để có kết luận chính xác.

Phương pháp xác định độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính, giá trị dự báo âm tính của phản ứng

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng được xác định theo bảng 1 và công thức dưới đây:

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm của phản ứng khi sử dụng Kit

Kết quả xét nghiệm bằng KIT	Mẫu nhiễm tiên mao trùng (+)	Mẫu không nhiễm tiên mao trùng (-)	Tính chung
Xét nghiệm (+)	a	b	a + b
Xét nghiệm (-)	c	d	c + d
Tổng số	a + c	b + d	a+b+c+d

Công thức tính độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính và giá trị dự báo âm tính như sau:

$$\text{Độ nhạy của Kit (Se)} = a/a + c$$

$$\text{Độ đặc hiệu của Kit (Sp)} = d/b + d$$

$$\text{Giá trị dự báo âm tính (\%)} = [a/(a+b)] \times 100$$

$$\text{Giá trị dự báo dương tính (\%)} = [c/(c+d)] \times 100$$



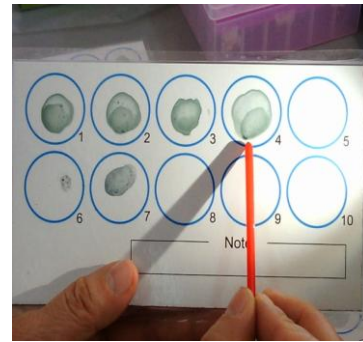
Hình 1. Lấy mẫu máu trâu tại Tuyên Quang



Hình 2. Tiêm truyền chuột nhắt trắng



Hình 3. Kit CATT chế tạo



Hình 4. Đọc kết quả phản ứng sau khi sử dụng Kit CATT

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2007.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả xác định độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng khi sử dụng Kit CATT

Ngay sau khi chế tạo Kit, để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng CATT trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng trên trâu, chúng tôi đã sử dụng 125 mẫu huyết thanh trâu thí nghiệm, trong đó có: 49 mẫu dương tính với tiên mao trùng (49 mẫu huyết thanh trâu được gây nhiễm tiên mao trùng), 76 mẫu huyết thanh của trâu âm tính với tiên mao trùng được xác định thông qua phương pháp tiêm truyền chuột nhất trắng.

Kết quả phản ứng khi sử dụng Kit CATT với các mẫu huyết thanh nói trên được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phản ứng sử dụng Kit CATT phát hiện kháng thể kháng *T. evansi* trong huyết thanh trâu

Các xét nghiệm	Mẫu huyết thanh trâu nhiễm <i>T. evansi</i>	Các mẫu huyết thanh trâu không nhiễm <i>T. evansi</i>	Tổng số
Xét nghiệm (+)	49	1	50
Xét nghiệm (-)	0	75	75
Tổng số	49	76	125

Kết quả bảng 2 cho thấy: Trong các mẫu huyết thanh trâu nhiễm *T. evansi*, Kit CATT đã phát hiện được cả 49 mẫu (số mẫu dương tính thật là 49), không có mẫu nào có kết quả âm tính giả. Trong số 76 mẫu huyết thanh của trâu không nhiễm *T. evansi*, có 75 âm tính thật khi phát hiện bằng Kit CATT, có 1 mẫu dương tính giả.

Từ kết quả trên, độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng như sau:

Độ nhạy của phản ứng (Se) = $(49/49) \times 100 = 100\%$.

Độ đặc hiệu của phản ứng (Sp) = $(75/76) \times 100 = 98,68\%$

Như vậy: Độ nhạy của phản ứng sử dụng Kit CATT với số mẫu như trên là 100%, độ đặc hiệu là 98,68%.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đương với kết quả nghiên cứu của một số tác

giả đã nghiên cứu trong và ngoài nước. Nghiên cứu của Roge S. và cs. (2014) [7] cho thấy, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp rLATEX lần lượt là 84,2% và 97,7%, của phương pháp CATT là 84,0% và 89,4%. Theo Nguyễn Thị Kim Lan và cs. (2015) [2], phản ứng CATT cho kết quả đồng dương tính với biện pháp tiêm truyền chuột bạch là 98,24%.

Kết quả thử nghiệm Kit CATT chế tạo từ kháng nguyên tái tổ hợp RoTAT 1.2 để chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho trâu ở tỉnh Tuyên Quang

Để so sánh hiệu quả chẩn đoán bệnh của Kit CATT với kỹ thuật ELISA, PCR và phương pháp tiêm truyền chuột, chúng tôi đã sử dụng 550 mẫu huyết thanh của trâu ở tỉnh Tuyên Quang, trong đó, có 66 mẫu dương tính và 484 mẫu âm tính đã xác định qua phương pháp tiêm truyền chuột.

Kết quả thử nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. So sánh hiệu quả chẩn đoán bệnh tiên mao trùng của Kit CATT với kỹ thuật ELISA, PCR và phương pháp tiêm truyền chuột

Phương pháp chẩn đoán	Kết quả	Các mẫu huyết thanh trâu nhiễm tiên mao trùng	Các mẫu huyết thanh trâu không nhiễm tiên mao trùng	Tổng số
Kit CATT	Xét nghiệm (+)	65	12	77
	Xét nghiệm (-)	1	472	473
	Tổng số	66	484	550
Phản ứng ELISA	Xét nghiệm (+)	65	14	79
	Xét nghiệm (-)	1	470	471
	Tổng số	66	484	550
Phản ứng PCR	Xét nghiệm (+)	66	8	74
	Xét nghiệm (-)	0	476	476
	Tổng số	66	484	550
Phương pháp tiêm truyền chuột	Xét nghiệm (+)	66	0	66
	Xét nghiệm (-)	0	484	484
	Tổng số	66	484	550

Từ kết quả của bảng 3, chúng tôi đã xác định độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo âm tính và giá trị dự báo dương tính của các phương pháp. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. So sánh hiệu quả sử dụng Kit CATT với kỹ thuật ELISA, PCR và phương pháp tiêm truyền chuột

Phương pháp chẩn đoán	Độ nhạy (%)	Giá trị dự báo dương tính (%)	Độ đặc hiệu (%)	Giá trị dự báo âm tính (%)
Kit CATT	98,48	84,42	97,52	99,79
Phản ứng ELISA	98,48	82,50	97,11	99,79
Phản ứng PCR	100	89,19	98,35	100
Phương pháp tiêm truyền chuột	100	100	100	100

Kết quả ở bảng 3 và 4 cho thấy:

Phương pháp tiêm truyền chuột có thể phát hiện được 100% số trâu nhiễm và không nhiễm *T. evansi*. Như vậy, khả năng phát hiện tiên mao trùng của phương pháp này đạt 100%. Qua đó, có thể xác định phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu đều là 100%.

Kit CATT đã phát hiện được 65/66 trâu dương tính, có 12/484 trâu âm tính với tiên mao trùng nhưng lại cho kết quả dương tính giả. Độ nhạy của phản ứng khi sử dụng Kit CATT là 98,48%, độ đặc hiệu là 97,52%.

Trong khi đó, phương pháp PCR cũng phát hiện được 100% số trâu dương tính, nhưng với số trâu âm tính lại cho kết quả dương tính giả 8/484 con. Như vậy, kỹ thuật PCR có độ nhạy là 100% và độ đặc hiệu là 98,35%

Phương pháp ELISA phát hiện được 65/66 trâu dương tính, song với 484 trâu âm tính với tiên mao trùng lại cho kết quả dương tính giả 14 con. Từ đó, có thể xác định kỹ thuật

ELISA có độ nhạy là 98,48% và độ đặc hiệu là 97,11%.

Bên cạnh đó, với kết quả thu được của các giá trị dự báo dương tính và âm tính cho thấy: Khả năng để dự đoán một cá thể trâu nào đó thực sự mắc bệnh tiên mao trùng khi kết quả xét nghiệm dương tính bằng Kit CATT là 84,42%, phản ứng ELISA là 82,5%, phản ứng PCR là 89,19%. Khả năng để dự đoán một cá thể trâu nào đó thật sự không mắc bệnh tiên mao trùng khi kết quả xét nghiệm âm tính bằng phản ứng CATT là 99,79%, phản ứng ELISA là 99,79%, phản ứng PCR là 100%.

Như vậy, xác suất chẩn đoán chính xác mẫu huyết thanh dương tính với *T. evansi* bằng phản ứng sử dụng Kit CATT cao hơn so với phản ứng ELISA và thấp hơn phản ứng PCR. Cũng trong bảng 3 và 4 cho thấy, xác suất chẩn đoán chính xác mẫu âm tính bằng phản ứng PCR cao hơn so với Kit CATT và phản ứng ELISA.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả của một số tác giả trong và ngoài nước.

Nghiên cứu ứng dụng phương pháp ELISA trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng, Phạm Thị Tâm và cs. (2013) [4] cho biết, độ nhạy của phản ứng ELISA là 97,96%, độ đặc hiệu là 98,68%. Ligi M. và cs. (2016) [6] đã sử dụng phản ứng ELISA và thấy, độ nhạy của phản ứng là 95,8%, độ đặc hiệu là 94,4%. Rudramurthy G. R. và cs. (2017) [8] đã xác định được phương pháp ELISA có độ nhạy là 98,8%, độ đặc hiệu là 99,2%.

Nghiên cứu về phương pháp PCR, Sharma A. và cs. (2015) [9] cho biết, phương pháp duplex PCR có độ chính xác cao với độ nhạy là 100% và độ đặc hiệu là 92,66%.

Birhanu H. và cs. (2015) [5] đã nghiên cứu ứng dụng một số phương pháp chẩn đoán bệnh tiên mao trùng và thấy, phản ứng Surra Sero K-SeT có độ đặc hiệu là 94,8%, độ nhạy là 98,1%, phản ứng CATT có độ đặc hiệu là 98,3% và độ nhạy là 84,4%.

KẾT LUẬN

Sử dụng Kit CATT đã chế tạo trên 125 mẫu huyết thanh (trong đó có 49 mẫu huyết thanh của trâu gây nhiễm tiên mao trùng và 76 mẫu đối chứng) thấy độ nhạy của phản ứng là 100% và độ đặc hiệu của phản ứng là 98,68%.

Sử dụng Kit CATT, kỹ thuật ELISA, PCR và phương pháp tiêm truyền chuột trên 550 mẫu huyết thanh trâu ở Tuyên Quang (trong đó có 66 mẫu huyết thanh trâu nhiễm tiên mao trùng và 484 mẫu huyết thanh không nhiễm tiên mao trùng) thấy: Phương pháp tiêm truyền chuột phát hiện 100% số trâu nhiễm hoặc không nhiễm tiên mao trùng, kỹ thuật PCR có độ nhạy là 100% và độ đặc hiệu là 98,35%, kỹ thuật ELISA là 98,48% và 97,11%, Kit CATT là 98,48% và 97,52%. Kit CATT chế tạo có thể sử dụng trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho trâu, bò tại tỉnh Tuyên Quang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Kim Lan (2012), *Giáo trình Ký sinh trùng và bệnh ký sinh trùng thú y*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Nguyễn Thị Kim Lan, Nguyễn Thị Ngân, Nguyễn Văn Quang, Trần Nhật Thắng, Phạm Diệu Thùy, Phạm Thị Tâm (2015), “Thử nghiệm Kit TUAF - ELISA và TUAF - CATT chế tạo trong nước chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho gia súc”, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, số tháng 11/2015, tr. 168 - 173.
3. Phạm Sỹ Lăng, Hoàng Văn Năm, Nguyễn Hữu Nam, Nguyễn Bá Hiên, Nguyễn Văn Diên (2008), *Một số bệnh quan trọng gây hại cho trâu, bò*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Phạm Thị Tâm, Bùi Thị Hải Hòa, Nguyễn Thị Kim Lan, Đỗ Thị Vân Giang (2013), “Nghiên cứu thiết lập phản ứng ELISA chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho trâu, bò Việt Nam”, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, kỳ 2, tháng 8, năm 2013, tr. 41 - 45.
5. Birhanu H., Roge S., Simon T., Baelmans R., Gebrehiwot T., Goddeeris B. M., Buscher P. (2015), “Surra Sero K-SeT, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in domestic animals”, *Vet. Parasitol.*, 211 (3 - 4), pp. 153 - 157.
6. Ligi M., Sengupta P. P., Rudramurthy G. R., Rahman H. (2016), “Flagellar antigen based CI-ELISA for sero-surveillance of surra”, *Vet. Parasitol.*, 219, pp. 17 - 23.
7. Roge S., Baelmans R., Claes F., Lejon V., Guisez Y., Jacquet D., Buscher P. (2014), “Development of a latex agglutination test with recombinant variant surface glycoprotein for serodiagnosis of surra”, *Vet. Parasitol.*, 205 (3 - 4), pp. 460 - 465.
8. Rudramurthy G. R., Sengupta P. P., Ligi M., Rahman H. (2017), “An inhibition enzyme immuno assay exploring recombinant invariant surface glycoprotein and monoclonal antibodies for surveillance of surra in animals”, *Biologicals*, 10, pp. 45 - 56.
9. Sharma A., Das Singla L., Tuli A., Kaur P., Bal M. S. (2015), “Detection and assessment of risk factors associated with natural concurrent infection of *Trypanosoma evansi* and *Anaplasma marginale* in dairy animals by duplex PCR in eastern Punjab”, *Trop. Anim. Health Prod.*, 47 (1), pp. 251 - 257.

SUMMARY

**EXPERIMENT KIT CATT IN THE DIAGNOSIS TRYPANOSOMIASIS
IN BUFFALOES OF TUYEN QUANG PROVINCE****Pham Thi Trang^{1*}, Nguyen Thi Kim Lan¹, Pham Cong Hoat²**¹*University of Agriculture and Forestry - TNU*²*Ministry of science and technology*

The purpose of this study is to evaluate experiment Kit Card Agglutination Test for *Trypanosomiasis* (CATT) on infected and uninfected buffaloes in Tuyen Quang province. Our results showed that:

The sensitivity and specificity of Kit CATT are 100% and 98.68%, respectively.

Compared the efficacy of Kit CATT with ELISA, PCR and mice inoculation in the diagnosis of trypanosomiasis showed that the mouse inoculation test was the most sensitive test for *Trypanosomiasis* and the sensitivity and specificity are 100%. PCR has a sensitivity of 100% and a specificity of 98.35%, The sensitivity and specificity of ELISA are 98.48% and 97.11%, and those of Kit CATT are 98.48% and 97.52%, orderly.

Key words: *Trypanosomiasis, Kit CATT, sensitivity, specificity, diagnosis.*

Ngày nhận bài:21/6/2017; Ngày phản biện:02/7/2017; Ngày duyệt đăng: 31/7/2017

* Tel: 0948 429425, Email: phamthitrang@tuaf.edu.vn