

# NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP NESTED-PCR ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH TIÊN MAO TRÙNG GÂY BỞI LOÀI *TRYPANOSOMA EVANSI* TRÊN NGỰA

Đào Thị Hà Thanh<sup>1\*</sup>, Dương Như Ngọc<sup>1</sup>, Nguyễn Hoài Nam<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Trường<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Lan Anh<sup>1</sup>, Đỗ Thị Thu Thủy<sup>1</sup>, Đoàn Hữu Hoàn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Thủy<sup>1</sup>

\*Tác giả liên hệ email: dienthanh0307@gmail.com

## TÓM TẮT

*Trypanosoma evansi*, loài ký sinh trùng đường máu gây bệnh tiên mao trùng (TMT) cho các loài động vật nhai lại, ngựa và con người tại Việt Nam. Nhiều phương pháp chẩn đoán phát hiện *T. evansi* như tiêm máu ngựa nhiễm hoặc không nhiễm bệnh này vào chuột nhắt trắng, nhuộm giemsa, ELISA, dot-ELISA, PCR cho đến nay đã được phát triển và sử dụng. Tuy nhiên, do đặc tính luôn biến đổi kháng nguyên bề mặt của các loài TMT nên mỗi phương pháp chẩn đoán đều có những hạn chế nhất định. Nested PCR (nPCR) có thể khắc phục được nhược điểm của các phương pháp chẩn đoán *T. evansi* trước đây. Để thiết lập phản ứng nPCR chẩn đoán phát hiện *T. evansi*, hai cặp mồi đặc hiệu NTE-F1/NTE-R1 và NTE-F2/NTE-R2 nhân gen VSG của loài *T. evansi* đã được thiết kế. Hai cặp mồi thiết kế này đã được kiểm tra độ gắn mồi chính xác, xác định nhiệt độ gắn mồi tối ưu (57°C ở PCR vòng 1; và 58°C ở nested PCR), và xác định số vòng khuếch đại tối thiểu (Cycle Threshold, Ct = 35 vòng). Phản ứng nPCR đã được thiết lập chu trình nhiệt, xác định độ nhạy (100%) và độ đặc hiệu (100%); và được ứng dụng chẩn đoán phát hiện loài *T. evansi* thành công cho 100 mẫu máu ngựa. Chỉ số tương đồng của kết quả chẩn đoán giữa phản ứng nPCR thiết lập và phương pháp tiêm chuột nhắt trắng là 98% (Kappa = 0,95; p < 0,0001).

Từ khoá: *T. evansi*, nPCR, ngựa, mồi đặc hiệu, chỉ số tương đồng.

## Study on setting up a nested PCR applying in diagnosis of *Trypanosoma evansi* in horses

Dao Thi Ha Thanh, Duong Nhu Ngoc, Nguyen Hoai Nam, Nguyen Duc Trung, Nguyen Thi Lan Anh, Do Thi Thu Thuy, Doan Huu Hoan, Nguyen Thi Bích Thủy

## SUMMARY

*Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), a haemoparasite causes trypanosomiasis for ruminants, horses, and humans in Viet Nam. Many diagnostic methods, such as: injecting horse blood into the white mice, giemsa staining, ELISA, dot-ELISA, PCR have been developed and applied so far for detecting of *T. evansi*. However, due to the change of its antigen namely the variant surface glycoprotein (VSG), those developed diagnostic methods have certain limitations. The nested PCR (nPCR) could overcome the disadvantages of previous methods of *T. evansi* detection. To establish a nPCR to detect *T. evansi*, two pairs of specific primers NTE-F1/NTE-R1 and NTE-F2/NTE-R2 (20 nucleotides each) amplifying the VSG gene of *T. evansi* were designed. These two designed primer pairs were tested for correct primer binding. The optimal annealing temperature of designed primers were determined (57°C in round 1 PCR; 58°C in nested PCR). And the cycle threshold (Ct) of the nPCR was (Ct = 35). The nPCR was thermally programmed. The sensitivity and specificity of the nPCR were both 100%. The established nPCR reaction was successfully applied to diagnose *T. evansi* species for 100 horse blood samples. The similarity level of diagnostic results between nPCR and mice inocular diagnostic method was 98% (Kappa = 0.95; p < 0.0001).

Keywords: *T. evansi*, nPCR, horse, specific primers, Kappa value.

<sup>1</sup> Viện Thú y

<sup>2</sup> Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam