

# 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 Truong, Nguyen Thi Lan Anh, Do Thi Thu Thuy, Doan Huu Hoan, Nguyen Thi Bich Thuy

## 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

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tiên mao trùng (surra), một bệnh ký sinh trùng đường máu gây nên bởi các loài *Trypanosoma*, gây sệt cân nhanh và chết đối với trâu, bò, ngựa, dê, lạc đà và chó. Một số loài tiên mao trùng được ghi nhận là gây bệnh truyền lây với bệnh lý nghiêm trọng và chết trên người tại châu Phi (bệnh ngủ-sleeping sickness).

Để chẩn đoán bệnh, trước đây chủ yếu dựa vào phương pháp ký sinh trùng học như hematocrit và nhuộm giemsa và các phương pháp huyết thanh học như CTF, IFAT, CATT, hay ELISA. Tuy nhiên do loài tiên mao trùng có kháng nguyên biến đổi bề mặt VSG (Variant Surface Glycose Protein) có khả năng biến đổi theo chu kỳ và lẫn trốn hệ thống miễn dịch, làm hệ thống miễn dịch không phát hiện được mầm bệnh. Đồng thời, trong giai đoạn bệnh mạn tính, tiên mao trùng cũng không xuất hiện trong máu vật chủ mà ẩn náu tại các cơ quan nội tạng của vật chủ như hạch bạch huyết, lách... , gây khó khăn cho việc chẩn đoán xét nghiệm bệnh bằng phương pháp ký sinh trùng hay huyết thanh học [1, 2]. Gần đây, việc chẩn đoán bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử sử dụng kỹ thuật PCR được áp dụng, khắc phục được các hạn chế này. Mặc dù vậy với kỹ thuật PCR thông thường, việc cần phải giải trình tự gen để xác định loài gây tổn kém kinh phí và thời gian chờ kết quả lâu [3]. Do đó, việc thiết lập phản ứng nested PCR (nPCR) bao gồm hai vòng phản ứng (pre-PCR và nested PCR) sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu cho kết quả chẩn đoán bệnh qua hai vòng phản ứng PCR, chẩn đoán bệnh ở giai đoạn nhiễm sớm với độ nhạy và độ đặc hiệu vượt trội là cần thiết.

Ở Việt Nam, loài *T. evansi* được ghi nhận trên người, chó, trâu, bò và ngựa. Các nghiên cứu về chẩn đoán bệnh TMT trước đây chủ yếu được tiến hành trên trâu và bò [4, 5]. Ngựa bạch tại khu vực phía Bắc gần đây được chú trọng chăn nuôi do mang lại hiệu quả kinh tế cao từ việc nấu cao ngựa. Tuy nhiên, ngựa cũng là loài mẫn cảm với các loài ký sinh trùng đường máu, đặc biệt là tiên mao trùng. Để góp phần cải tiến phương pháp chẩn đoán bệnh TMT và bảo vệ sức khỏe vật nuôi khỏi bệnh TMT, chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu thiết lập phản ứng nested-PCR ứng dụng trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng gây bởi loài *Trypanosoma evansi* trên ngựa”.

## II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

- Thiết lập quy trình phản ứng nested PCR (nPCR) phát hiện *T. evansi*:

+ Thiết kế cặp mồi đặc hiệu phát hiện *T. evansi*.

+ Thiết lập chu trình nhiệt và số vòng khuếch đại tối thiểu Ct (Cycle Threshold) của phản ứng nPCR.

+ Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng nPCR.

- Ứng dụng phản ứng nPCR thiết lập vào chẩn đoán *T. evansi* trên ngựa.

### 2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

- 100 mẫu máu ngựa thu thập ngẫu nhiên tại Hà Nội và Thái Nguyên.

- Các mẫu máu ngựa nhiễm và không nhiễm *T. evansi* đã được xác định bằng phương pháp tiêm chuột nhất trắng.

- Các chuỗi gen, mẫu dương chuẩn của các loài ký sinh trùng đường máu: *Trypanosoma evansi*, *Babesia* spp, *Anaplasma* spp.

- Chuột bạch, kính hiển vi, máy PCR, bộ điện di ngang và máy đọc gel, kit chiết tách DNA (Qiagen, Đức), Master Mix (Thermo, Đức), DNA ladder, lamen, lam kính, ...

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Lấy máu

Ngựa được cố định và lấy 3-5 ml máu tĩnh mạch cổ sử dụng kim 20G. Mẫu máu được đưa vào ống nhựa có chất chống đông EDTA; lắc nhẹ ống máu, đánh số mẫu và bảo quản mát 4°C/-20°C.

#### 2.3.2. Tiêm truyền chuột nhất trắng

Tiêm 0,2 ml máu chống đông vào xoang phúc mạc chuột nhất trắng. Từ ngày thứ 3 sau tiêm, lấy máu đuôi chuột kiểm tra dưới kính hiển vi độ phóng đại từ 400 – 800 lần để kiểm tra sự xuất hiện của TMT. Chuột được kiểm tra máu hằng ngày đến hết ngày thứ 30 sau tiêm.

#### 2.3.3. Thiết kế 2 cặp mồi đặc hiệu

Cặp mồi ngoài (outer-primers) dùng cho phản ứng PCR vòng ngoài (pre-PCR) và cặp mồi trong (inner-

primers) dùng cho phản ứng PCR vòng trong (nested-PCR) được thiết kế sử dụng phần mềm Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

**2.3.4. Chạy PCR giả định trên phần mềm Serial Cloner 2.6**

Hai cặp mồi đặc hiệu thiết kế được kiểm tra sự hoạt động (khả năng gắn mồi và gắn mồi đặc hiệu) bằng cách cho từng cặp mồi gắn lần lượt với các chuỗi gen khác nhau của loài *T. evansi* và các loài ký sinh trùng đường máu thường gặp khác như *Anaplasma* spp., *Babesia* spp.

**2.3.5. Tối ưu hoá nhiệt độ gắn mồi của cặp mồi thiết kế**

Hai cặp mồi thiết kế sau khi chạy PCR giả định thành công, được tối ưu hoá nhiệt độ gắn mồi bằng việc chạy PCR biên độ nhiệt (gradient) với 10 mức nhiệt độ gắn mồi khác nhau (từ 53 °C đến 62 °C), để xác định nhiệt độ gắn mồi tối ưu nhất cho phản ứng.

**2.3.6. Thiết lập chu trình nhiệt phản ứng nPCR và chỉ số Ct**

Dựa trên chu trình nhiệt thông thường của phản ứng PCR cho loài TMT, điều chỉnh (1) nhiệt độ giãn xoắn và thời gian giãn xoắn, (2) nhiệt độ biến tính và thời gian biến tính, (3) thời gian kéo dài khuếch đại của mỗi chu trình nhiệt (vòng phản ứng) và (4) chỉ số Ct của phản ứng PCR vòng ngoài (pre-PCR) và PCR vòng trong (nested PCR).

**2.3.7. Giải trình tự gen Sanger**

Các sản phẩm nested PCR ở mỗi bước được gửi đi giải trình tự gen và blast trên Ngân hàng Gen (GenBank) để xác định chính xác sản phẩm nested PCR thu được là của loài *T. evansi*.

**2.3.8. Chuẩn bị mẫu máu ngựa nhiễm TMT và không nhiễm TMT**

Mẫu máu ngựa được tiêm truyền và truyền tiếp đời cho chuột nhắt trắng theo phương pháp tiêm truyền ở trên (tiêm 3 đời chuột và theo dõi sự xuất hiện TMT máu chuột trong 30 ngày). Sau 30 ngày theo dõi, chuột được tiêm mẫu máu của ngựa nào có sự xuất hiện TMT trong máu được xác định là ngựa đó bị nhiễm TMT; ngược lại, chuột được tiêm mẫu máu của ngựa nào không có sự xuất hiện TMT thì ngựa đó được xác định là không bị nhiễm TMT.

**2.3.9. Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng**

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng được xác định theo bảng tính 2 x 2 như sau:

Kết quả	Bị nhiễm TMT	Không bị nhiễm TMT	Tổng số
Xét nghiệm (+)	a	b	a + b
Xét nghiệm (-)	c	d	c + d
<b>Tổng số</b>	<b>a + c</b>	<b>b + d</b>	<b>a + b + c + d</b>

Độ nhạy của phản ứng (Se) = a/(a + c)

Độ đặc hiệu của phản ứng (Sp) = d/(b + d)

**2.3.10. Tính chỉ số tương quan giữa hai phương pháp chẩn đoán**

Phương pháp nPCR thiết lập trong nghiên cứu này và phương pháp tiêm chuột được phân tích sử dụng chỉ số Kappa (Cohen’s K-coefficient), sử dụng phần mềm STATA 14.0. Chỉ số Kappa cần đạt từ 0,75-1.

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả thiết lập cặp mồi đặc hiệu**

Hai cặp mồi đặc hiệu NTE-F1/NTE-R1 và NTE-F2/NTE-R2 nhân gen VSG của loài *T. evansi* đã được thiết lập, kiểm tra độ bám mồi và bám mồi đặc hiệu bằng chạy PCR giả định trên phần mềm Serial Cloner và chạy PCR biên độ nhiệt (gradient PCR) để xác định nhiệt độ bám mồi tối ưu của hai cặp mồi thiết kế này. Kết quả thể hiện ở bảng 1, hình 1 và 2.

Mỗi mồi thiết kế (bảng 1) đều có độ dài 20 nucleotide, là độ dài hợp lý nhất đối với mồi dùng cho nhân gen trong phản ứng PCR. Nhiệt độ bám mồi tự thân giữa các mồi đơn không chênh lệch cho phép (2°C, mức cho phép là <5°C). Kết quả chạy PCR giả định cho thấy, hai cặp mồi NTE-F1/NTE-R1 và NTE-F2/NTE-R2 chỉ nhân gen *T. evansi*, mà không nhân gen của các loài ký sinh trùng đường máu khác là *Anaplasma* spp. hay *Babesia* spp. Độ dài của sản phẩm PCR vòng 1 (572 bp) và PCR vòng 2 (325 bp) (hình 1) đúng với thiết kế, thể hiện chất lượng tốt của cặp mồi thiết kế NTE-F1/NTE-R1 và NTE-F2/NTE-R2.

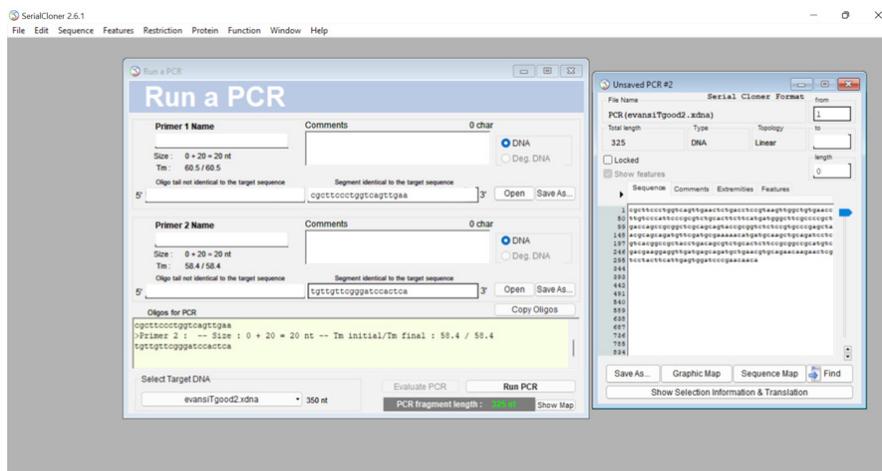
Kết quả chạy PCR biên độ nhiệt với mẫu dương chuẩn *T. evansi* trong hình 2 cho thấy, cặp mồi NTE-F1/NTE-R1 (PCR vòng 1) và NTE-F2/NTE-R2 (nested PCR) đều cho kết quả PCR có độ

dài sản phẩm giống nhau ở vòng 1 là 572 bp (hình 2A) và ở vòng 2 là 325 bp (hình 2B), đúng với độ dài sản phẩm PCR của cặp mồi được thiết kế. Yêu cầu

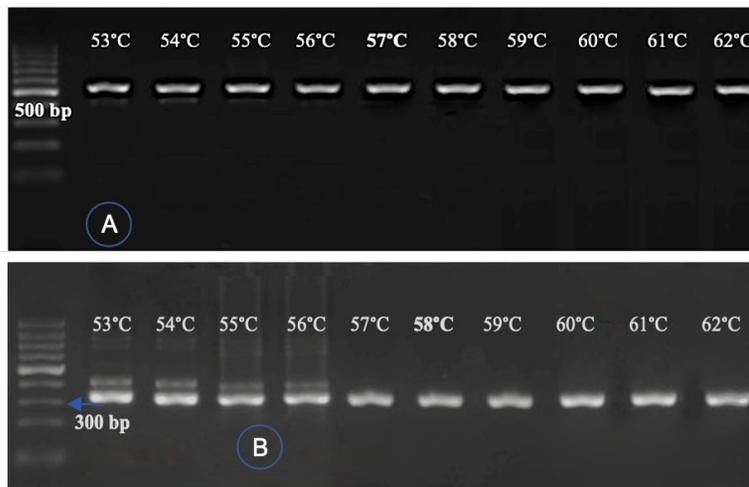
đối với sản phẩm PCR phải là vạch đơn sáng trên gel, nhiệt độ bám mồi được chọn cho phản ứng PCR vòng 1 là 57 °C và nPCR là 58 °C (hình 2).

**Bảng 1. Tên và trình tự hai cặp mồi thiết kế dùng thiết lập phản ứng nested PCR chẩn đoán phát hiện *T. evansi***

TT	Tên mồi	Trình tự nucleotide	Độ dài của mồi (nu)	Nhiệt độ bám mồi tự thân (°C)	Độ dài sản phẩm PCR (bp)	Ghi chú
1	NTE-F1	5'-GTCAGCAAGGAATGGCGATC-3'	20	60,5	572	PCR vòng 1
2	NTE-R1	3'-TGCGTTGACATGTGCTTTGG-5'	20	58,5		
3	NTE-F2	5'-GCAGACCAGCCTTCAGAGA-3'	20	60,5	325	PCR vòng 2 (Nested PCR)
4	NTE-R2	3'-GTCCCCGAGCACATAGACAT-5'	20	60,5		



**Hình 1. Kết quả chạy PCR giả định với cặp mồi thiết kế NTE-F2/NTE-R2**



**Hình 2. Kết quả chạy gradient PCR vòng 1 (A) và vòng 2 (B)**

Kết quả blast chuỗi gen giải trình tự từ sản phẩm PCR vòng 1 và 2 (nested PCR) cho thấy kết quả nhân gen là gen VSG của *T. evansi*, đúng theo yêu cầu.

**3.2. Kết quả thiết lập chu trình nhiệt và số vòng khuếch đại tối thiểu Ct (Cycle Threshold) của phản ứng nPCR thiết lập**

Kết quả thiết lập chu trình nhiệt và số vòng khuếch đại tối thiểu Ct (Cycle Threshold) của phản ứng nPCR sử dụng hai cặp mồi thiết kế NTE-F1/NTE-R1 và NTE-F2/NTE-R2 phát hiện *T. evansi* được thể hiện trong bảng 2.

**Bảng 2. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng nPCR thiết lập**

STT	PCR vòng 1	572 bp	Nested-PCR	325 bp
1	<b>Thành phần phản ứng</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Thành phần phản ứng</b>	<b>Số lượng</b>
	PCR MM	25 ul	PCR MM	25 ul
	Mồi NTE-F1	2 ul	Mồi NTE-F2	2 ul
	Mồi NTE-R1	2 ul	Mồi NTE-R2	2ul
	DNA khuôn mẫu	5 ul	Sản phẩm PCR vòng 1	5 ul
	Nước không chứa DNA	16 ul	Nước không chứa DNA	16 ul
	Tổng phản ứng	50 ul	Tổng phản ứng	50 ul
2	<b>Chu trình nhiệt</b>		<b>Chu trình nhiệt</b>	
	95°C/ 5 phút		95°C/ 5 phút	
	95°C/60 giây		95°C/30 giây	
	57°C/45 giây	35 vòng	58°C/45 giây	35 vòng
	72°C/1 phút		72°C/1,5 phút	
	72°C/5 phút		72°C/10 phút	

Thành phần phản ứng nPCR thiết lập bao gồm mồi nồng độ 10 pmol/ul, DNA khuôn mẫu (PCR vòng 1)/ sản phẩm PCR vòng 1 (nested PCR), PCR master mix và nước không chứa DNA. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR vòng 1 và nested PCR với số vòng phản ứng Ct=35.

**3.3. Kết quả xác định độ nhạy và đặc hiệu của phản ứng nPCR thiết lập**

**Bảng 3. Kết quả xác nhận độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng nPCR thiết lập**

Kết quả	Bị nhiễm TMT	Không bị nhiễm TMT	Tổng số
Xét nghiệm (+)	30	0	30
Xét nghiệm (-)	0	30	30
<b>Tổng số</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>60</b>

- Độ nhạy của phản ứng =  $30/30 \times 100 = 100\%$
- Độ đặc hiệu của phản ứng =  $30/30 \times 100 = 100\%$

Tổng cộng 60 mẫu, trong đó 30 mẫu nhiễm TMT và 30 mẫu không nhiễm TMT được xác định bằng phương pháp tiêm truyền chuột bạch đã được thiết lập để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng nPCR thiết lập. Kết quả thể hiện trong bảng 3.

Kết quả xác định độ nhạy và độ đặc hiệu cho thấy, phản ứng nPCR thiết lập phát hiện *T. evansi* đối với 30/30 mẫu bị nhiễm TMT, và không phát hiện *T. evansi* đối với mẫu không bị nhiễm TMT. Kết quả này của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác, phản ứng PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu 100%, cao hơn phương pháp chẩn đoán huyết thanh học như CATT, ELISA [4-8].

**3.4. Kết quả áp dụng phản ứng nPCR thiết lập chẩn đoán phát hiện *T. evansi* trên mẫu máu ngựa**

**Bảng 4. Kết quả chẩn đoán phát hiện *T.evansi* bằng phương pháp tiêm truyền chuột nhất trắng và phản ứng nPCR thiết lập**

Phương pháp chẩn đoán	Số mẫu chẩn đoán	Số mẫu dương tính	Chỉ số Kappa
Tiêm truyền chuột bạch	100	27	0,95 (P < 0,0001)
nPCR	100	29	

Kết quả áp dụng phản ứng nPCR thiết lập vào chẩn đoán phát hiện *T. evansi* cho 100 mẫu máu ngựa thu thập ở tỉnh Thái Nguyên và thành phố Hà Nội cho thấy, có 29 mẫu dương tính với *T. evansi*. Trong khi đó, phương pháp tiêm truyền chuột nhất trắng phát hiện 27/100 mẫu kiểm tra. Tất cả các mẫu máu ngựa dương tính với *T. evansi* khi chẩn đoán bằng phản ứng nPCR thiết lập đều là các mẫu dương tính với *T. evansi* bằng phương pháp tiêm truyền chuột bạch. Độ tương đồng kết quả của hai phương pháp chẩn đoán là 98% với chỉ số Kappa đạt 0,95 (P < 0,0001) là chỉ số tương đồng rất cao.

#### IV. KẾT LUẬN

- Thiết kế thành công cặp mồi đặc hiệu NTE-F1/NTE-R1 và NTE-F2/NTE-R2 phát hiện *T. evansi*.

- Thiết lập thành công phản ứng nPCR chẩn đoán phát hiện loài *T. evansi* với độ nhạy và đặc hiệu của phản ứng là 100 %.

- Ứng dụng thành công phản ứng nPCR thiết lập chẩn đoán phát hiện *T. evansi* trên mẫu máu ngựa (chỉ số tương quan kết quả chẩn đoán *T. evansi* của phản ứng nPCR và phương pháp chuẩn (gold standard) tiêm chuột nhất trắng là 98%; Kappa = 0,95; P < 0,0001).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nantulya VM, 1990. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Rev Sci Tech.* 1990 Jun;9(2):357-67. doi: 10.20506/rst.9.2.507. PMID: 2132685.
- Gerrit J. Viljoen, Antony G. Luckins, 2012. The role of nuclear technologies in the diagnosis and control of livestock diseases-a review. *Trop Anim Health Prod* 44: 1341–1366.

- Elshafie E. I., Sani R. A., Hassan L., Sharma R., Bashir A., Abubakar I. A., 2013. Active infection and morphometric study of *Trypanosoma evansi* among horses in Peninsula Malaysia. *Trop. Biomed.*, 30 (3): 444 - 450.
- 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.
- Phạm Thị Trang, Nguyễn Thị Kim Lan, Phạm Công Hoạt, 2017. Thử nghiệm kit catt để chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho trâu tại tỉnh Tuyên Quang. *Tạp chí Khoa học & công nghệ* 168(08): 125 – 13.
- 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.
- 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.
- Nguyễn Thị Kim Lan, Nguyễn Thị Ngân, Nguyễn Văn Quang, Trần Nhật Thăng, 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.

Ngày nhận: 8-8-2023

Ngày phản biện: 11-8-2023

Ngày đăng: 1-1-2024