

CHẨN ĐOÁN PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH DANH SINH HỌC PHÂN TỬ ĐỐI VỚI ĐƠN BÀO KÝ SINH ĐƯỜNG MÁU (*THEILERIA* SPP.) TRÊN ĐỘNG VẬT NHAI LẠI (TRÂU, BÒ, DÊ) VÀ NGỰA TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM

Dương Như Ngọc¹, Phạm Ngọc Duẩn², Trương Thị Quý Dương¹, Nguyễn Thị Lan Anh¹, Nguyễn Thị Bích Thủy¹, Sándor Hornok³, Róbert Farkas³, Đào Thị Hà Thanh^{1*}

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

TÓM TẮT

Trùng đơn bào (protozoan) ký sinh ở đường máu (*Theileria* spp.) lây truyền qua ve ixodid, gây bệnh cho các loài động vật có vú, bao gồm vật nuôi và động vật hoang dã. Ở Việt Nam, 3 loài *Theileria* đã được công bố. Từ tháng 6/2022 đến tháng 5/2023, 2.400 mẫu máu chống đông thu thập từ vật nuôi nhai lại (trâu, bò, dê) và ngựa tại 3 tỉnh phía Bắc đã được điều tra, phát hiện và định danh *Theileria* spp. bằng sinh học phân tử nhằm xác định thành phần loài đơn bào ký sinh đường máu này. Phương pháp nhân gen nested PCR (nPCR) và giải trình tự Sanger đoạn gen 18S rDNA đã được áp dụng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 4 loài vật nuôi: trâu, bò, dê và ngựa đều nhiễm *Theileria* spp. ở mức trung bình 15,4% (95%CI: 14,0-16,9). Bò được xác định là loài vật nuôi nhiễm *Theileria* spp. cao nhất (19,7%; 95%CI: 16,6-22,7), và dê nhiễm *Theileria* spp. với tỷ lệ thấp nhất (7,7%; 95%CI: 5,5-9,8). Kết quả giải trình tự và phân tích đoạn gen 18S rDNA đã xác định có 5 loài *Theileria* lưu hành trên vật nuôi nhai lại và ngựa tại miền Bắc Việt Nam, bao gồm: *T. annulata*, *T. orientalis*, *T. buffeli*, *T. verlifera* và *T. equi*. Trong đó, 3 loài *T. buffeli*, *T. verlifera* và *T. equi* lần đầu được định danh bằng sinh học phân tử và được báo cáo lưu hành trên vật nuôi tại Việt Nam, nâng số loài *Theileria* lưu hành tại Việt Nam từ 3 loài lên thành 6 loài.

Từ khóa: *Theileria* spp., động vật nhai lại, ngựa, miền Bắc Việt Nam, Piroplasma.

Molecular biology detection and identification for blood protozoan (*Theileria* spp.) in ruminants (cattle, buffalo, goat) and horse in Northern Viet Nam

Dương Như Ngọc, Phạm Ngọc Duan, Trương Thị Quý Dương, Nguyễn Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Bích Thủy, Sandor Hornok, Robert Farkas, Dao Thi Ha Thanh

SUMMARY

Protozoan in the genus *Theileria* are tick-borne parasites that have been found in a range of mammal animals. In Viet Nam, 3 species of *Theileria* have been reported. From June 2022 to May 2023, 2,400 EDTA blood samples were collected from ruminants (buffalo, cattle, and goat), and horse in 3 provinces in Northern Viet Nam, these samples were studied by molecular biology method for detecting and identifying *Theileria* spp. and their species components. Methods of nPCR and the Sanger sequencing of the 18S rDNA gene, following the sequencing analysis were applied. The studied results showed that all 4 animal types: buffalo, cattle, goat and horse were infected with *Theileria* spp. at a moderate prevalence (15.4%; 95%CI: 14.0-16.9). The infection rate of cattle with *Theileria* spp was highest (19.7%; 95%CI: 16.6-22.7), and the infection rate of goat with *Theileria* spp. was lowest (7.7%; 95%CI: 5.5-9.8). Results of the 18S rDNA gene sequencing and analysis demonstrated that there were 5 species of *Theileria*, consisting of *T. annulata*, *T. orientalis*, *T. buffeli*, *T. verlifera* and *T. equi*, they infected in ruminants and horses in Northern Viet Nam. Of which, for the first time 3 species of *T. buffeli*, *T. verlifera* and *T. equi* were identified by molecular biology method and reported in Viet Nam, increasing the number of *Theileria* species occurring in Viet Nam from 3 to 6 species.

Keywords: *Theileria* spp., ruminants, horses, Northern Vietnam, Piroplasma.

¹ Viện Thú y

² Trường Đại học Y Hà Nội

³ Trường Đại học Thú y Budapest, Hungary

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đơn bào đường máu *Theileria* spp. được lây truyền qua ve ixodid, thuộc các chi *Haemaphysalis*, *Hyalomma* và *Rhipicephalus*. *Theileria* spp. gây bệnh cho các loài động vật có vú, bao gồm vật nuôi và động vật hoang dã. Hơn 10 loài *Theileria* đã được chẩn đoán phát hiện trên các loài vật nuôi như trâu nước, bò, cừu và dê. *Theileria parva* gây bệnh sốt Bờ Đông (East Coast fever/ corridor disease) và *T. annulata* gây bệnh theileriosis nhiệt đới, được ghi nhận là hai loài *Theileria* có độc lực cao, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng nhất cho ngành chăn nuôi bò tại châu Âu, châu Phi, Trung Đông, Viễn Đông và châu Á. Dạng cấp tính phổ biến của bệnh có các triệu chứng đặc trưng như sốt, ngừng nhai lại, sưng hạch bạch huyết bề mặt, các vấn đề về tim mạch, tiêu chảy, vàng da và xuất huyết, và tỷ lệ tử vong cao (46–100%). Nhóm *T. orientalis*/*T. buffeli* phân bố rộng rãi, đã gây ra một số đợt bùng phát dịch trên bò ở New Zealand, Úc và các quốc gia khác kể từ năm 2010. Ngoài việc gây thiệt hại trực tiếp, các loài *Theileria* có độc lực cao có thể gây trở ngại cho việc di chuyển vật nuôi giữa các quốc gia và là hạn chế trong việc nhập khẩu giống mới hoặc các đàn giống cải tiến [1-3].

Ở Việt Nam, hai loài *Theileria* độc lực cao là *T. mutan* (hay *T. orientalis*) và *T. annulata* đã được tìm thấy trong máu bò từ những năm 90 với tỷ lệ nhiễm 2,13% [3-4]. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu về *Theileria* spp. rất hạn chế và không định loài *Theileria* lưu hành [5-7]. Năm 2010, KhuKhuu và cs. lần đầu định danh loài *T. orientalis* bằng phương pháp sinh học phân tử trên bò, trâu, cừu và ve tại tỉnh Thừa Thiên - Huế, sử dụng gen MPSP (Major Piroplasma Surface Protein) [8]. Năm 2015, một ổ dịch theileriosis gây bởi loài *T. orientalis* bùng phát tại Thừa Thiên - Huế trên đàn bò hậu bị nhập khẩu từ Úc về Việt Nam, gây sảy thai 439 bò hậu bị và tử vong 58 con [9]. Năm 2016, trong một nghiên cứu khác về đơn bào đường máu trên bò và trâu tại Thừa Thiên-Huế bằng phương pháp sinh học phân tử, nhóm nghiên cứu công bố tìm thấy kiểu gen *T. orientalis* số 7 trên trâu [10]. Cũng trong năm 2016, một nghiên cứu khác tại Đà Nẵng nghiên cứu về đơn bào đường máu trên ve đã công bố thêm loài *T. sinensis* [11]. Như vậy, tính đến thời điểm hiện tại,

số loài *Theileria* lưu hành trên vật nuôi tại Việt Nam được xác nhận là 3 loài. Từ thực tế nhập khẩu bò sống (bò sữa, bò thịt, các giống bò cao sản) vào Việt Nam ngày càng phổ biến, và chim di cư mang theo các loài ve là vector truyền bệnh, nguy cơ du nhập mầm bệnh từ các nước cũng như các châu lục khác vào Việt Nam là hiện hữu [12]. Để cung cấp thêm các thông tin về thực trạng nhiễm và thành phần loài của các loài *Theileria* spp. đang lưu hành trên các loài vật nuôi tại miền Bắc Việt Nam, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Chẩn đoán sinh học phân tử phát hiện *Theileria* spp. trên các loài vật nuôi trâu, bò, dê, và ngựa tại 3 tỉnh/ thành phố phía Bắc (Hà Nội, Sơn La và Thái Nguyên)
- Định danh các loài *Theileria* spp. lưu hành bằng phương pháp sinh học phân tử
- Phân tích phả hệ loài *Theileria* spp.

2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Loài *Theileria* spp. ký sinh trong máu các loài vật nuôi trâu, bò, dê, và ngựa.
- Mẫu vật nghiên cứu: 2.400 mẫu máu chống đông thu thập từ các loài vật nuôi trâu, bò, dê, và ngựa tại 3 tỉnh/thành phố phía Bắc (Hà Nội, Sơn La và Thái Nguyên).
- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 6/2022 đến tháng 12/2023.

- Hoá chất, thiết bị dùng cho nghiên cứu: Kit chiết tách DNA, PCR MM, DNA chuẩn, thuốc nhuộm DNA Syber Safe, Loading dye, Agarose, TBE; Máy gia nhiệt PCR, water bath, bộ điện di, máy đọc gel, tủ lạnh thường, tủ lạnh -30°C...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Lấy mẫu máu: động vật (trâu, bò, dê, ngựa) được cố định và lấy 3-5 ml máu tĩnh mạch cổ sử dụng kim 20G (đối với dê và ngựa)/ 18G (đối với trâu và bò). 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.

Chiết tách DNA tổng số: DNA tổng số được chiết tách từ 200 μ L máu chống đông của từng mẫu máu thu thập, sử dụng kit chiết tách QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (quy trình chiết tách DNA tổng số từ máu) sử dụng công nghệ cột. DNA tổng số thu được được bảo quản -30°C đến khi sử dụng.

Nhân gen nPCR (nested PCR)

- Cặp mỗi nhân đoạn 580 bp gen 18S rDNA [13] gồm hai cặp mỗi: (1) Cặp mỗi cho phản ứng PCR lần 1 (mỗi xuôi: Theil-F 5'-CACAGGGAG-GTAGTGACAAG-3'; mỗi ngược: Bab-R 5'-AAGAATTTACCTCTGACAG-3') và (2) cặp mỗi cho phản ứng PCR lần 2 – nPCR (mỗi xuôi: Theil-F 5'-CACAGGGAGGTAGTGACAAG-3'; mỗi ngược: Theil-R 5'-ATTGCTTGTGTCCCTCCG-3').

- Nhân gen:

Thành phần phản ứng PCR/nPCR gồm: kit PCR Master Mix 2x thông thường (Biobasic, Canada), nước Free DNA (Biobasic, Canada), DMSO (Biobasic, Canada), mỗi xuôi và mỗi ngược, và DNA khuôn tổng số (đối với PCR lần 1), hoặc sản phẩm PCR lần 1 (đối với PCR lần 2 - nPCR). Tổng thể tích phản ứng là 50 μ L.

Chu trình nhiệt: Phản ứng PCR và nPCR được thực hiện trên máy gia nhiệt Mastercycle Nexus GX2 (Đức) ở 95°C trong 5 phút, (95°C trong 30 giây, 58°C trong 45 giây (PCR lần 1 và 56 °C trong 45 giây với nPCR), 72°C trong 60 giây) x 40 vòng, và 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose (Biobasic, Canada) 1,5% có bổ sung thuốc nhuộm Sybr™ Safe (Thermo Fisher, Mỹ) trong dung dịch

đậm TBE 1x (Biobasic, Canada). Bản gel sau khi điện di được đọc kết quả và chụp ảnh trên máy soi gel Uvitec Fire- Reader V4 (Pháp).

Giải trình tự và xử lý chuỗi nucleotide: Các sản phẩm nPCR đạt yêu cầu, được tinh sạch bằng kit tinh sạch GenCatch™ PCR Cleanup kit (Epoch Life Science, Mỹ) và gửi đi giải trình tự gen tại công ty Macrogen - Hàn Quốc (<https://dna.macrogen.com>). Chuỗi gen thu được được sửa chữa trên phần mềm BioEdit, sau đó BLAST chuỗi gen trên NCBI blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) để định loài. Các chuỗi gen 18S rDNA hoàn chỉnh sau đó được nộp lên GenBank lấy số đăng ký.

Phân tích phả hệ: Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp “tiếp cận cực đại” (Maximum Likelihood – ML) trên phần mềm MEGA 6.0, với độ tin cậy (Bootstrap value) 1.000 lần lặp lại [14].

Phân tích số liệu: Số liệu được nhập vào Excel, phân tích đơn biến sử dụng phần mềm STATA 14.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu thập mẫu máu vật nuôi tại 3 tỉnh/thành phố (TP. Hà Nội, tỉnh Thái Nguyên và Sơn La)

Tổng cộng 2.400 mẫu máu của các loài vật nuôi gồm trâu, bò, dê và ngựa đã được thu thập từ 25 xã, thuộc 10 huyện của 3 tỉnh/thành là TP. Hà Nội, tỉnh Thái Nguyên và tỉnh Sơn La. Chi tiết về số lượng mẫu máu đã thu thập của từng loài vật nuôi ở mỗi tỉnh/thành và đặc điểm của quần thể của các loài vật này được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thu thập mẫu máu trâu, bò, dê và ngựa tại 3 tỉnh/TP.

Tỉnh/TP.	Trâu (con)	Bò (con)	Dê (con)	Ngựa (con)	Tổng (con)
Hà Nội	200	223	187	190	800
Sơn La	187	225	210	178	800
Thái Nguyên	209	203	201	187	800
Tổng	596	651	598	555	2.400

Kết quả thể hiện tại bảng 1 cho thấy, số lượng mẫu máu đã thu thập ở mỗi tỉnh/thành là 800 mẫu,

và từ mỗi loài vật nuôi trâu, bò, dê, ngựa tương ứng là 596 con trâu, 651 con bò, 598 con dê và 555 con

ngựa. Giới tính của các loài vật được lấy mẫu chủ yếu là cái, do mục đích chăn nuôi của người dân chủ yếu hướng đến chăn nuôi vật nuôi sinh sản để phát triển kinh tế, và phần lớn (73,4%) số gia súc trong độ tuổi sinh sản tốt (1-5 tuổi).

3.2. Kết quả chẩn đoán sinh học phân tử phát hiện *Theileria* spp.

Tổng cộng 2.400 mẫu DNA tổng số chiết tách từ mẫu máu chống đông của các loài vật nuôi trâu, bò, dê và ngựa đã được nhân gen phát hiện loài *Theileria* spp. Kết quả cho thấy, *Theileria* spp. được phát hiện ở mẫu máu của tất cả các loài vật nuôi kiểm tra, với tỷ lệ nhiễm trung bình 15,4% (95%CI: 14,0-16,9). Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu gần đây tại miền Bắc của hai nhóm tác giả khác, khi hai nhóm tác giả này cho biết tỷ lệ nhiễm *Theileria*

spp. trên bò là 13,68% (tỉnh Hà Nam) và 18,9% (TP Hà Nội) [6-7]. Trong 4 loài vật nuôi kiểm tra, bò là loài vật nuôi có tỷ lệ nhiễm *Theileria* spp. cao nhất (19,7%; 95%CI: 16,6-22,7), dê ít nhiễm *Theileria* spp. nhất (7,7%; 95%CI: 5,5-9,8) (bảng 2). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với đặc tính gây bệnh của loài *Theileria* spp., các loài vật nuôi khác nhau có tính miễn cảm với *Theileria* spp. khác nhau; mặt khác, bò là loài vật nuôi cảm nhiễm với *Rhipicephalus microplus* (ve bò), vector quan trọng truyền mầm bệnh *Theileria* spp. tại Việt Nam [1, 8, 11]. Tỷ lệ nhiễm *Theileria* spp. trên vật nuôi trâu, bò, dê và ngựa tại tỉnh Thái Nguyên (20,3%; 95%CI: 17,5-23,0) cao hơn hẳn so với các loài vật nuôi này tại tỉnh Sơn La (12,9%; 95%CI: 10,6-15,2) và Thành phố Hà Nội (13,0%; 95%CI: 10,7-15,3) (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả chẩn đoán phát hiện *Theileria* spp. trên trâu, bò, dê và ngựa

	Số kiểm tra (con)	Số nhiễm (con)	Tỷ lệ nhiễm (%)	95%CI
Loài vật	2.400	369	15,4	14,0-16,9
Trâu	596	99	16,6	13,6-19,6
Bò	651	128	19,7	16,6-22,7
Dê	598	46	7,7	5,5-9,8
Ngựa	555	96	17,3	14,1-20,4
Tỉnh/TP.	2.400	369	15,4	14,0-16,9
Hà Nội	800	104	13,0	10,7-15,3
Sơn La	800	103	12,9	10,6-15,2
Thái Nguyên	800	162	20,3	17,5-23,0

3.3. Kết quả định danh các loài *Theileria* spp.

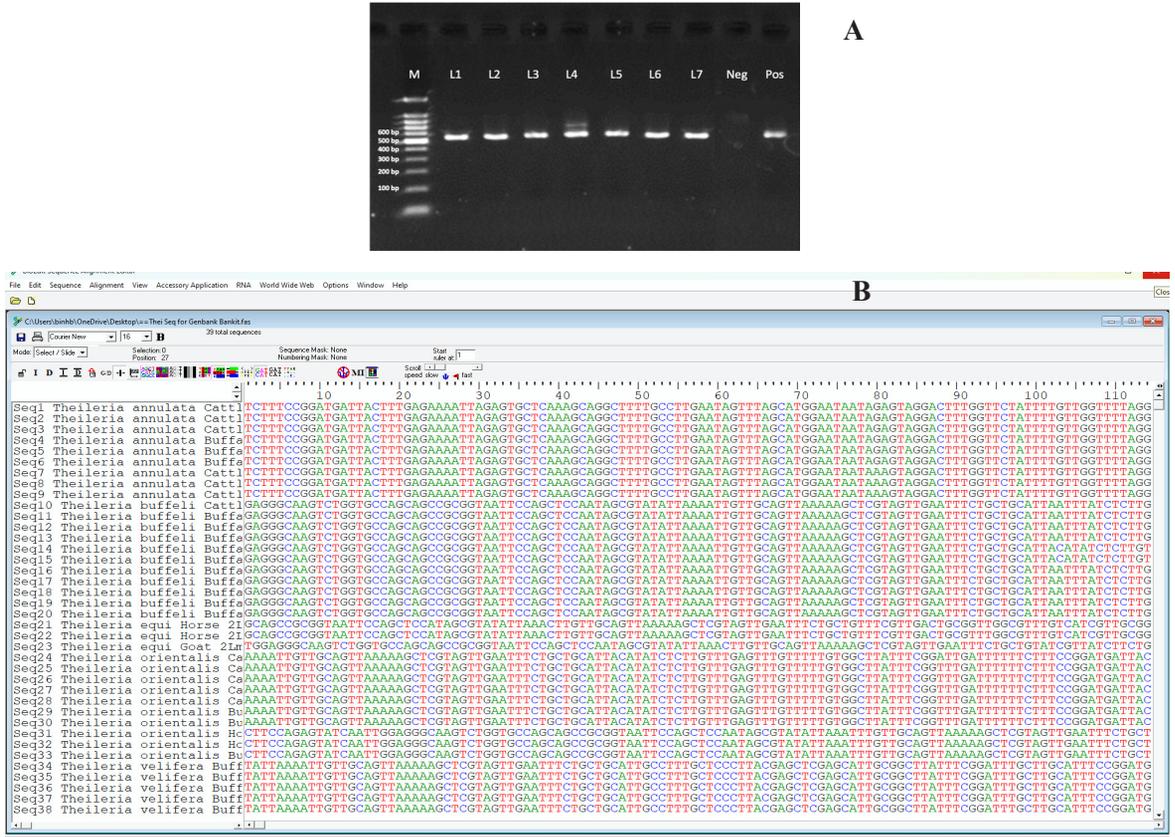
Sản phẩm nPCR tinh sạch đạt yêu cầu (hình 1A) đã được giải trình tự gen (152 mẫu). Các chuỗi gen 18S rDNA sau khi giải trình tự được kiểm tra chất lượng và sửa chữa hoàn thiện trên phần mềm sửa gen BioEdit (hình 1B) phục vụ việc định loài. Kết quả định loài cho thấy, có 5 loài *Theileria* gồm *T. annulata*, *T. orientalis*, *T. buffeli*, *T. verlifera* và *T. equi* lưu hành tại miền Bắc Việt Nam. Trình tự chuỗi gen các loài *Theileria* trong nghiên cứu này của chúng tôi tương đồng từ 99,16% đến 100% với trình tự các chuỗi gen 18S rDNA đã đăng ký trên GenBank. Tổng cộng 49 chuỗi gen 18S rDNA có độ dài từ 319 đến 515 nucleotide đã được nộp

lên GenBank và được cấp số đăng ký chuỗi gen. Số đăng ký có ký hiệu PP và số thứ tự từ 949795 đến 949833 (PP949795 - PP949833).

Các nghiên cứu định danh loài *Theileria* tại Việt Nam trước đây cho biết, *T. mutan* (*T. orientalis*) lưu hành trên các loài vật nuôi nhai lại (bò, trâu, cừu), và ve; *T. annulata* lưu hành trên trâu và bò; và *T. sinensis* chỉ được tìm thấy trong 1 cá thể ve bò *Rhipicephalus microplus* [4, 8, 10, 11]. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, có 5 loài *Theileria* được định danh, *T. orientalis* lưu hành trên trâu, bò và ngựa; *T. annulata* và *T. buffeli* lưu hành trên bò và trâu; *T. equi* lưu hành trên ngựa và dê; và *T. verlifera* chỉ được tìm thấy trên trâu. Như vậy, số

lượng loài *Theileria* lưu hành trên vật nuôi tại Việt Nam đã được nâng từ 3 loài lên thành 6 loài. Lần

đầu tiên, 3 loài *T. bufferi*, *T. equi* và *T. verlivifera* được báo cáo lưu hành tại Việt Nam.



Hình 1. A: Hình ảnh điện di sản phẩm nPCR phát hiện *Theileria* spp. trên gel, B: Hình ảnh giải trình tự chuỗi gen 18S rDNA *Theileria* spp.

Loài *T. annulata* có độc lực cao, gây bệnh theileriosis nhiệt đới, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng nhất cho ngành chăn nuôi bò khắp nơi trên thế giới. Trong khi đó, *T. orientalis* phân bố rộng rãi và đã bùng phát thành các đợt dịch bệnh trên bò ở New Zealand, Úc và các quốc gia khác kể từ năm 2010, gây thiệt hại lớn về kinh tế. Việt Nam là nước nhập số lượng bò từ Úc nhiều thứ 2, với 181.542 con bò năm 2014, chỉ đứng sau Indonesia (730.257 con bò). Cùng năm 2014, Việt Nam cũng đã ghi nhận một đợt bùng phát dịch bệnh theileriosis trên đàn bò hậu bị nhập khẩu từ Úc, gây bởi loài *T. orientalis*; và một số nghiên cứu điều tra sau đó trên vật nuôi khác, bao gồm bò vàng, trâu và cừu cũng đã ghi nhận sự lưu hành của *T. orientalis* trên các loài vật nuôi này tại tỉnh Thừa Thiên-Huế [1, 8, 9, 11].

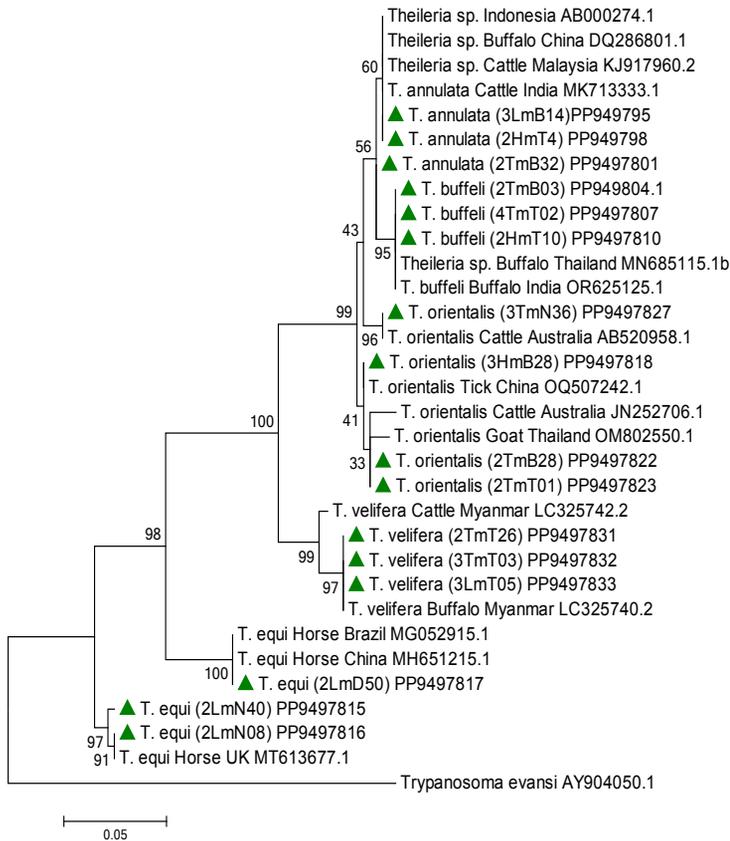
Loài *T. buffeli* có nhiều kiểu gen và phân bố rộng khắp nhất so với các loài *Theileria* khác. Loài này được ghi nhận xuất hiện ở hầu hết các châu lục và gây bệnh cho bò, trâu châu Phi, trâu nước và bò Tây Tạng. Đôi khi có những kiểu gen *T. buffeli* được xếp chung vào nhóm *T. orientalis*/ *T. buffeli*/ *T. sergenti*, hoặc nhóm *T. sinensi*; hoặc bị nhầm lẫn với nhóm *T. verlivifera* và *T. equi* tùy vào vùng địa lý và lịch sử mắc bệnh. Tuy nhiên, *T. buffeli* vẫn được xếp là loài *Theileria* riêng biệt [15]. Và đây là lần đầu tiên, *T. buffeli* được định danh sinh học phân tử và báo cáo lưu hành tại Việt Nam, được phân lập trên bò tại tỉnh Thái Nguyên, và trên trâu ở 3 tỉnh/thành phố Sơn La, Thái Nguyên và Hà Nội.

T. equi chủ yếu gây bệnh trên ngựa, tuy nhiên trong nghiên cứu này của chúng tôi, *T. equi* được tìm thấy trên cả ngựa và dê. Ve bò *Rhipicephalus microplus* được cho là nguồn truyền *T. equi* lớn nhất khi ngựa được chăn thả cùng với bò [16]. Từ thực tế chăn nuôi tại các địa điểm thu thập nói riêng và miền Bắc nói chung, các loài vật nuôi bao gồm cả trâu, bò, dê, ngựa thường được chăn thả chung hoặc sống gần nhau trong cùng một hộ gia đình; và đây cũng là lần đầu tiên *T. equi* được định danh sinh học phân tử và được báo cáo lưu hành tại Việt Nam. Tương tự *T. equi*, *T. verlifera* cũng lần đầu tiên được định danh sinh học phân tử và được báo cáo lưu hành tại Việt Nam. Loài *T. verlifera* chủ yếu được tìm thấy trên trâu và bò. Trong nghiên cứu này, *T. verlifera* chỉ được tìm thấy trên trâu, có thể loài này là kiểu gen *T. verlifera B* vì *T. verlifera*

có nhiều kiểu gen khác nhau, và kiểu gen *T. verlifera B* chỉ lưu hành trên trâu [15].

3.4. Kết quả phân tích phả hệ loài *Theileria* spp.

Cây phả hệ xác định nguồn gốc phát sinh loài các loài *Theileria* được xây dựng từ 320 nucleotides gen 18S rDNA, gồm 16 chuỗi gen 18S rDNA của 5 loài *Theileria* trong nghiên cứu này (*T. annulata*: PP949795, PP949798 và PP949801; *T. buffeli*: PP949804, PP9497807, và PP9497810; *T. orientalis*: PP9497827, PP9497818, PP9497822, và PP9497823; *T. verlifera*: PP9497831, PP9497832, và PP9497833; và *T. equi*: PP9497817, PP9497815, và PP9497816) và 15 chuỗi gen 18S rDNA loài *Theileria* được thu nhận từ GenBank; và loài *Trypanosoma evansi* (AY904050) được dùng để tham chiếu ngoại loài (hình 2).



Hình 2. Cây phả hệ các loài *Theileria* được xây dựng dựa trên gen nhân 18S rDNA (320 nucleotide) trên phần mềm MEGA 6.0, sử dụng phương pháp “tiếp cận cực đại” (Maximum Likelihood – ML) với độ tin cậy (Bootstrap value) 1.000 lần lặp lại

*Chú thích: Các chuỗi gen có đánh dấu hình tam giác màu xanh là các chuỗi gen trong nghiên cứu này.

Có ít nhất 15 loài trong chi *Theileria* (ngành Apicomplexa, bộ Piropasmida) lây nhiễm trên các loài vật nuôi, trong đó, *Theileria annulata* và *T. parva* là hai loài có độc lực cao. Việc phân nhóm các loài *Theileria* hiện nay đôi khi vẫn còn những tranh cãi nhất định, đặc biệt với nhóm *T. orientalis*/*T. buffeli* và *T. sergenti*. Nhóm 3 loài này hiện được cho là cùng một loài, gọi là *T. orientalis* hoặc *T. buffeli*. Tuy nhiên, *T. buffeli* và *T. sergenti* vẫn tồn tại là hai loài riêng biệt [1]. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi thể hiện trên cây phả hệ (hình 2), *T. buffeli* nhóm vào thành một nhánh, và chung nhánh với *T. annulata*, không chung nhánh với *T. orientalis*. *T. sinensis* có thể là một loài riêng biệt hoặc thuộc nhóm *T. buffeli*/*T. orientalis*. Nhóm *T. orientalis*/*T. buffeli* đôi khi được viết tắt là *T. orientalis* và chia thành 11 kiểu gen khác nhau [1, 17]. Ở Việt Nam, *T. orientalis* được báo cáo là có 7 kiểu gen khác nhau dựa trên gen MPSP [9, 11]. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, *T. orientalis* nhóm với nhau thành 3 nhóm riêng biệt trên cây phả hệ (hình 2, 2 trong 3 nhóm kiểu gen này tạo nhánh với *T. orientalis* ở bò - Úc/và dê - Thái Lan; nhóm kiểu gen còn lại tạo nhánh với *T. orientalis* trên ve - Trung Quốc. Như vậy, *T. orientalis* lưu hành ở Việt Nam có mối quan hệ mật thiết với *T. orientalis* ở bò - Úc, điều này có thể bắt nguồn từ bò Úc được nhập vào Việt Nam có trung chuyển qua Thái Lan, và cả Trung Quốc và Việt Nam đều nhập khẩu bò hậu bị từ Úc với số lượng lớn [3, 9].

T. verlifera bao gồm bốn kiểu gen là *T. velifera*, *T. velifera A*, *T. velifera B* và *T. sp.* (một kiểu gen chưa được mô tả ở bò Ấn Độ). *T. velifera* và *T. velifera A* đã được tìm thấy ở trâu và bò, trong khi *T. velifera B* chỉ được tìm thấy ở trâu. Có sự tương đồng đáng kể giữa kiểu gen *T. sp.* và *T. velifera* [16]. *T. verlifera* trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ được tìm thấy ở trâu mà không tìm thấy trên các loài vật nuôi khác, gồm bò, dê và ngựa, như vậy, kiểu gen *T. verlifera* lưu hành ở Việt Nam có thể chỉ có một chủng duy nhất là *T. verlifera B*.

T. equi phân lập trên ngựa và dê tại tỉnh Sơn La trong nghiên cứu này của chúng tôi, phân

thành hai kiểu gen rõ rệt (hình 2), gồm (1) kiểu gen *T. equi C*, phân lập từ dê tạo nhánh với *T. equi* ở ngựa Trung Quốc và Brazil; và (2) kiểu gen *T. equi A*, phân lập từ ngựa tạo nhánh với *T. equi* ở Anh. Các nghiên cứu trước đây về phân loài loài *T. equi* dựa trên gen 18S rDNA cho thấy, *T. equi* chia thành 5 nhánh khác nhau (nhánh A, B, C, D và E) thể hiện sự đa dạng di truyền của loài này. Một số kiểu gen của *T. equi* chỉ được tìm thấy trên ngựa vằn và linh dương, và không được tìm thấy trên ngựa bản địa. Nhiều kiểu gen của *T. equi* thường xuất hiện ở các vùng địa lý đặc trưng, khiến cho việc đánh giá độc lực của từng chủng *T. equi* trở nên khó khăn, với giả định chung rằng tất cả các kiểu gen (chủng) đều có độc lực và bệnh lý tương tự nhau [15, 18].

IV. KẾT LUẬN

Theileria spp. lưu hành ở cả 4 loài vật nuôi trâu, bò, dê, và ngựa ở miền Bắc Việt Nam với tỷ lệ nhiễm ở mức trung bình (15,4%; 95%CI: 14,0-16,9). Bò được xác định là loài vật nuôi nhiễm *Theileria* spp. cao nhất (19,7%; 95%CI: 16,6-22,7).

Có 5 loài *Theileria* lưu hành trên vật nuôi tại miền Bắc Việt Nam, gồm *T. annulata*, *T. orientalis*, *T. buffeli*, *T. verlifera* và *T. equi*. Trong đó, 3 loài *T. buffeli*, *T. verlifera* và *T. equi* lần đầu được báo cáo lưu hành trên vật nuôi tại Việt Nam, nâng số loài *Theileria* lưu hành tại Việt Nam từ 3 loài lên thành 6 loài. ¹

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện theo nhiệm vụ nghị định thư, mã số: NĐT/HU/22/02 (Quyết định số 2822/QĐ - BKHCN ngày 9/11/2021 của Bộ Khoa học và Công nghệ), là hợp tác nghiên cứu giữa Việt Nam và Hungary.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Iowa State University, College of Veterinary Medicine, 2019. *Theileriosis in Cattle and Small Ruminants*.
2. OIE Terrestrial, 2022. Chapter 3.8.13. Theileriosis; In: *Sheep And Goats (Infection With Theileria lestoquardi, T. luwenshuni and T. uilenbergi)*.

3. Lakew BT, Eastwood S, Walkden-Brown SW, 2023. Epidemiology and Transmission of *Theileria orientalis* in Australasia. *Pathogens*. 2023; 12(10):1187.
 4. Hạ Thúy Hạnh, 1999. *Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ, bệnh học và biện pháp phòng trị bệnh huyết bào tử trùng ở bò Việt Nam*. Luận án tiến sĩ Nông nghiệp.
 5. Nguyễn Đức Tân, Lê Đức Quyết, Nguyễn Thị Sâm và Lê Hứa Ngọc Lực, 2004. Điều tra tình hình nhiễm ký sinh trùng đường máu và ứng dụng biện pháp phòng trị thích hợp cho đàn bò ở một số tỉnh Nam Trung Bộ và Tây Nguyên. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Hà Nội. T262-369.
 6. Phùng Quang Trường, Nguyễn Hữu Lương, Tăng Xuân Lưu, Ngô Thành Vinh và Ngô Đình Tân, 2008. Tình hình nhiễm ký sinh trùng đường máu và biện pháp phòng trị trên đàn bò sữa nuôi tại Ba Vì. *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*. 20: 60-65.
 7. 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 friesland nhiễm *Theileria* spp. tại tỉnh Hà Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 2023, 21(11): 1455-1462.
 8. Khukhuu A, Lan DT, Long PT, Ueno A, Li Y, Luo Y, Macedo AC, Matsumoto K, Inokuma H, Kawazu S, Igarashi I, Xuan X, Yokoyama N., 2011. Molecular epidemiological survey of *Theileria orientalis* in Thua Thien Hue Province, Vietnam. *J Vet Med Sci*. 73(5):701-5.
 9. Gebrekidan H, Nelson L, Smith G, Gasser RB, Jabbar A, 2017. An outbreak of oriental theileriosis in dairy cattle imported to Vietnam from Australia. *Parasitology*. 144(6):738-746.
 10. Weerasooriya G, Sivakumar T, Lan DT, Long PT, Takemae H, Igarashi I, Inoue N, Yokoyama N, 2016. Epidemiology of bovine hemoprotozoa parasites in cattle and water buffalo in Vietnam. *J Vet Med Sci*. 78(8):1361-7.
 11. Huynh LN, Diarra AZ, Pham QL, Le-Viet N, Berenger JM, Ho VH, Nguyen XQ, Parola P, 2021. Morphological, molecular and MALDI-TOF MS identification of ticks and tick-associated pathogens in Vietnam. *PLoS neglected tropical diseases* vol. 15,9 e0009813. doi:10.1371/journal.pntd.0009813.
 12. Zhijun H, Xiaoping Z, Wenzhen F, Xiaolin C., 2022. Migration and wintering of vulnerable adult Chinese Egrets (*Egretta eulophotes*) revealed by GPS tracking. *Avian Research*. Vol 13, e100055. doi.org/10.1016/j.avrs.2022.100055.
 13. Mohammadi SM, Esmacilnejad B, Jalilzadeh-Amin G., 2017. Molecular detection, infection rate and vectors of *Theileria lestoquardi* in goats from West Azerbaijan province, Iran. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 8(2), 139–144.
 14. Tamura, Koichiro et al., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* vol. 30,12 (2013): 2725-9.
 15. Mans BJ, Pienaar R, Latif AA, 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 6;4(1):104-18.
 16. Ana MV, Ana PSS, Guilherme BW, Rodrigo CC, and Fábio PL, 2018. Equine Theileriosis: A review. *Annual Reviews and Research*. Vol 3(4).
 17. Watts, JG, MC Playford, and KL Hickey, 2015. *Theileria Orientalis*: A Review. *New Zealand Veterinary Journal* 64 (1): 3–9.
 18. Bishop RP, Kappmeyer LS, Onzere CK, Odongo DO, Githaka N, Sears KP, Knowles DP, Fry LM, 2020. Equid infective *Theileria* cluster in distinct 18S rRNA gene clades comprising multiple taxa with unusually broad mammalian host ranges. *Parasite & Vectors*.13(1):261. doi: 10.1186/s13071-020-04131-0.
- Ngày nhận: 29-7-2024
 Ngày phản biện: 1-8-2024
 Ngày đăng: 1-11-2024