

XÁC ĐỊNH LOÀI TIÊN MAO TRÙNG BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TỬ VÀ NGHIÊN CỨU VẬT MÔI GIỚI TRUYỀN BỆNH TIÊN MAO TRÙNG TRÊN ĐÀN TRÂU, BÒ TỈNH BẮC NINH

Nguyễn Thị Kim Lan*, Nguyễn Văn Quang, Nguyễn Thị Ngân,
Phạm Diệu Thủy, Dương Thị Hồng Duyên
Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Phân lập các chủng Tiên mao trùng ở trâu, bò nuôi tại 8 huyện, thành phố và thị xã của tỉnh Bắc Ninh, kết quả cho thấy: Tiên mao trùng ký sinh và gây bệnh trên bò và trâu của tỉnh Bắc Ninh đều thuộc giống *Trypanosoma*, loài *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) [6], với trình tự gene Rotat 1.2 tương đồng tới 99-100% với Genbank. Có 3 loài ruồi, mòng hút máu truyền bệnh Tiên mao trùng trên đàn trâu, bò của tỉnh Bắc Ninh: Loài ruồi *Stomoxys calcitrans* chiếm 53,50% số cá thể thu thập; loài mòng *Tabanus kiangsuensis* chiếm 14,00% và loài mòng *Tabanus rubidus* chiếm 32,50%. Tần suất xuất hiện ở các xã khảo sát đối với loài *Stomoxys calcitrans* là 100%; loài *Tabanus kiangsuensis* là 83,87%; loài *Tabanus rubidus* là 93,55%. Ruồi, mòng hút máu hoạt động mạnh vào mùa Hè và mùa Thu (từ tháng 5 - 9), sau đó giảm dần và ngừng hoạt động vào các tháng lạnh trong năm; bắt đầu hoạt động vào khoảng 6 - 8 giờ và hoạt động mạnh nhất vào 8 - 18 giờ trong ngày.

Từ khóa: ký sinh, máu, mòng, ruồi, tần suất, Tiên mao trùng, trâu, bò

Ngày nhận bài: 25/12/2018; Ngày hoàn thiện: 14/01/2019; Ngày duyệt đăng: 31/01/2019

DETERMINE THE TRYPANOSOMA SPECIE AND TRYPANOSOMIASIS TRANSMITTING VECTOR ON BUFFALO IN TUYEN QUANG PROVINCE

Nguyen Thi Kim Lan*, Nguyen Van Quang,
Nguyen Thi Ngan, Pham Dieu Thuy, Duong Thi Hong Duyen
University of Agriculture and Forestry - TNU

ABSTRACT

Trypanosoma strains were isolated in buffaloes in 10 communes of 3 districts: Yen Son, Chiem Hoa and Ham Yen belong to Tuyen Quang province. The results were obtained: Trypanosomes parasitizes and causes disease on buffaloes in Tuyen Quang province was of trypanosomes genre - *Trypanosoma evansi* specie (Steel, 1885), with RoTat 1.2 gene sequences showed high similarity (99%) between *Trypanosoma evansi* isolates in Tuyen Quang province and known *T. evansi* isolates in Genbank. There were 3 species of blood sucking flies transmitting Trypanosomiasis on buffalo herd in Bắc Ninh province: *Stomoxys calcitrans* specie was 53.50%, *Tabanus kiangsuensis* specie (14.00%) and *Tabanus rubidus* specie (32.50%), with the frequency was 83.87-100%. The sucking flies performed high in summer and in autumn (from May to September), lately they reduced and shutting down in cold months; beginning to perform from 6 am to 8 am and highest performance from 8 am to 6 pm.

Key words: blood, flies, frequency, parasitize, trypanosomes.

Received: 25/12/2018; Revised: 14/01/2019; Approved: 31/01/2019

* Corresponding author: Tel: 0912660317, Email: nguyenthikimlan@tuaf.edu.vn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Tiễn mao trùng do đơn bào đường máu *Trypanosoma evansi* gây ra, bệnh có thể thấy ở nhiều loài gia súc như: Trâu, bò, ngựa, hươu, lạc đà... Trong đó, trâu và bò là hai loại vật nuôi rất mẫn cảm với bệnh Tiễn mao trùng, bệnh gây ra thiệt hại đáng kể về kinh tế. Theo Phan Địch Lân (2004) [3], Phan Văn Chinh (2006) [1], bệnh Tiễn mao trùng xuất hiện ở nhiều vùng trên cả nước, tỷ lệ mắc khá cao trên đàn trâu, bò của nước ta.

Tỉnh Bắc Ninh có khí hậu nhiệt đới gió mùa, thời tiết nóng ẩm, mưa nhiều là điều kiện thích hợp cho ruồi, mòng phát triển. Sự lây truyền Tiễn mao trùng từ trâu, bò đã nhiễm Tiễn mao trùng sang trâu, bò khỏe là nhờ các loài ruồi hút máu (thuộc họ phụ *Stomoxydinae*) và các loài mòng hút máu (thuộc họ *Tabanidae*).

Trong phạm vi bài viết này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu trong năm 2018 nhằm xác định loài Tiễn mao trùng gây bệnh trên đàn trâu, bò nuôi tại tỉnh Bắc Ninh; sự phân bố, quy luật hoạt động của các loài ruồi, mòng hút máu và truyền bệnh Tiễn mao trùng, từ đó có cơ sở khoa học cho việc đề xuất biện pháp phòng chống bệnh Tiễn mao trùng hiệu quả.

VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu máu trâu, bò thu thập tại các huyện, thành phố, thị xã thuộc tỉnh Bắc Ninh; chủng Tiễn mao trùng phân lập từ trâu, bò mắc bệnh; ruồi, mòng hút máu trâu thu thập từ các địa phương nghiên cứu. Các loại hóa chất, dụng cụ và thiết bị phòng thí nghiệm.

Các cặp môi sử dụng trong kỹ thuật phân tử định danh Tiễn mao trùng được cung cấp bởi hãng Invitrogen (America).

Nội dung nghiên cứu

Định danh loài Tiễn mao trùng gây bệnh trên trâu, bò tại tỉnh Bắc Ninh; định danh loài ruồi, mòng hút máu trâu, bò tại các địa phương;

xác định tỷ lệ các loài ruồi, mòng hút máu trong số cá thể ruồi, mòng thu thập; nghiên cứu quy luật hoạt động của các loài ruồi, mòng hút máu theo tháng trong năm và theo giờ trong ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định loài Tiễn mao trùng gây bệnh ở trâu, bò tại Bắc Ninh khóa định loại của Desquesnes M. (2004) [6], thẩm định lại 7 mẫu bằng kỹ thuật phân tử.

Phương pháp thu thập ruồi, mòng: Dùng vợt làm bằng vải thưa, miệng vợt bằng sắt có đường kính 30 cm bắt ruồi, mòng ở những nơi như chuồng nuôi gia súc, bãi chăn thả, nơi làm việc và nghỉ ngơi của gia súc.

Thu thập và làm tiêu bản ruồi, mòng theo phương pháp của Trịnh Văn Thịnh (1967) [4]: Dùng vợt bắt ruồi, mòng và cho bay vào bình có chứa Kalicianua khoảng 10 - 20 phút; sau đó cố định các cá thể ruồi, mòng để phân loại.

Xác định loài ruồi, mòng hút máu thông qua các đặc điểm hình thái, cấu tạo của các cá thể ruồi, mòng theo khóa định loại của Stekhoven Ricardo (1959) (dẫn theo Trịnh Văn Thịnh, 1967 [4], Phan Địch Lân, 1983 [2]).

Sự phân bố, tần suất xuất hiện và quy luật hoạt động của các loài ruồi, mòng trên địa bàn các địa phương của tỉnh Bắc Ninh được thực hiện bằng cách trực tiếp theo dõi, quan sát sự xuất hiện và hoạt động hút máu trên trâu, bò tại khu vực chuồng trại và bãi chăn thả trâu, bò ở các địa phương nghiên cứu.

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học (Nguyễn Văn Thiện, 2008) [5], trên phần mềm Excel 2007 và MINITAB 14.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả định loài Tiễn mao trùng tại Bắc Ninh

Sau khi phân lập được các chủng Tiễn mao trùng ký sinh ở trâu, bò nuôi tại 8 huyện, thành phố, thị xã của tỉnh Bắc Ninh, chúng tôi đã tiến hành định danh các chủng Tiễn mao trùng bằng kỹ thuật phân tử. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Kết quả định danh loài *Tiên mao trùng* ở trâu, bò tại tỉnh Bắc Ninh

Địa phương (Huyện/TP/TX)	Số chủng Tiên mao trùng	Số chủng là loài <i>T. evansi</i>	Tỷ lệ (%)
H. Quế Võ	6	6	100
H. Lương Tài	4	4	100
TX. Từ Sơn	2	2	100
H. Thuận Thành	4	4	100
H. Gia Bình	5	5	100
H. Tiên Du	4	4	100
H. Yên Phong	3	3	100
TP. Bắc Ninh	3	3	100
Tính chung	31	31	100

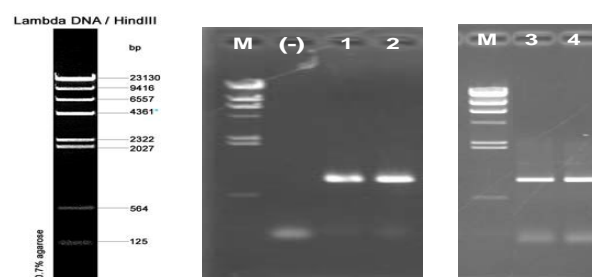
Bảng 1 cho thấy: Sau khi phân lập được các chủng *Tiên mao trùng* ký sinh ở trâu, bò nuôi tại 31 xã, phường thuộc 8 huyện, thành phố, thị xã của tỉnh Bắc Ninh, quan sát hình thái *Tiên mao trùng* dưới kính hiển vi, thấy chúng đều có hình thái đặc trưng của loài *T. evansi*.

Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, chúng tôi đã thẩm định lại 7 chủng *Tiên mao trùng* đại diện cho các chủng thu thập ở các huyện, thành phố, thị xã (trừ huyện Từ Sơn, do chỉ thu được ở đây 01 chủng). Các chủng này được ký hiệu là: Tev-QV-VN; Tev-LT-VN; Tev-TT-VN, Tev-GB-VN, Tev-TD-VN, Tev-YP-VN và Tev-TP-VN.

DNA tổng số của các chủng trên sau khi tách được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR, thu nhận gen 18S ribosome với cặp môi TEVF - TEVR, kích thước của đoạn gen 18S có độ dài khoảng 800 bp. Toàn bộ phân đoạn DNA nói trên đã được thu nhận bằng PCR tiêu chuẩn với bộ hoá chất PCR Master Mix Kit (của hãng Promega). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả được trình bày ở hình 1.

Kết quả ở hình 1 cho thấy, từ nguồn khuôn DNA của các mẫu *Trypanosoma* spp. tổng số đã được tách chiết, thực hiện PCR thu nhận được sản phẩm gen nhân 18S có độ dài khoảng 800 bp. Các sản phẩm PCR đều cho một băng DNA rõ rệt chứng tỏ các thành phần sử dụng trong phản ứng PCR, cặp môi thiết kế đặc hiệu và chu trình nhiệt tối ưu. Sản phẩm PCR có độ dài tương ứng so với dự kiến. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ hoá chất QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc) để dòng hóa vào vector tách dòng và giải trình tự.

Các chuỗi nucleotide cấu trúc nên gen 18S của các mẫu nghiên cứu đã được giải trình tự và sử dụng trực tiếp để BLAST vào Ngân hàng gen (Genbank) và thu nhận các chuỗi gen 18S tương ứng. So sánh trình tự nucleotide của các mẫu *Trypanosoma*, chúng tôi nhận thấy: Gen 18S của 7 chủng *Tiên mao trùng* phân lập từ trâu, bò nuôi tại tỉnh Bắc Ninh là Tev-QV-VN; Tev-LT-VN; Tev-TT-VN, Tev-GB-VN, Tev-TD-VN, Tev-YP-VN và Tev-TP-VN có sự tương đồng rất cao (99 - 100%) so với các chuỗi gen 18S đã công bố trong Ngân hàng gen. Điều này cho phép kết luận 7 mẫu nghiên cứu đều mang gen 18S của *Tiên mao trùng T. evansi*.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen 18S của một số mẫu *Trypanosoma* spp. trên thạch agarose 1%

Ghi chú: M: Thang chuẩn marker Lambda được cắt bằng HindIII; Ký hiệu (-): Mẫu đối chứng âm; 1: Sản phẩm PCR của Tev-QV-VN; 2: Tev-TT-VN; 3: Tev-GB-VN; 4: Tev-TD-VN.

Kết luận: Loài *Tiên mao trùng* ký sinh và gây bệnh trên trâu, bò của tỉnh Bắc Ninh là loài *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885), giống *Trypanosoma* (Gruby, 1843), họ *Trypanosomatidae* (Donein, 1901), bộ *Kinetoplastorida*, lớp *Zoomastigophorasida*, ngành *Sarcomastigophora*.

Kết quả xác định loài vật môi giới truyền bệnh Tiên mao trùng ở trâu, bò tại Bắc Ninh

* Định danh các loài ruồi, mòng hút máu ở các địa phương nghiên cứu

Kết quả định danh loài ruồi, mòng hút máu trâu, bò tại các địa phương của tỉnh Bắc Ninh được trình bày ở bảng 2.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, có 03 loài ruồi, mòng hút máu là môi giới truyền Tiên mao trùng cho đàn trâu, bò tại các địa phương nghiên cứu (ruồi *Stomoxys calcitrans*, mòng *Tabanus kiangsuensis* và *Tabanus rubidus*). Cả 3 loài đều xuất hiện ở các địa phương nghiên cứu, tần suất xuất hiện là 83,87-100%. Đây cũng là các loài côn trùng môi giới truyền bệnh Tiên mao trùng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới.

Vasudeva P. và cs. (2007) [9], Desquesnes M. và cs. (2009) [7] cho biết, bệnh do *Trypanosoma* là bệnh được truyền từ vật bệnh sang vật khỏe thông qua sự hút máu của côn trùng môi giới. Vì vậy, mầm bệnh có thể được truyền đi trong phạm vi không gian rộng lớn.

Theo Muzari M. O. và cs. (2010) [8], mòng *Tabanus* ở Úc là một trong những vật môi

giới phổ biến truyền bệnh do *Trypanosoma evansi* ở động vật.

* Tỷ lệ các loài ruồi, mòng hút máu trong số mẫu thu thập

Bảng 3 cho thấy: Trong tổng số 1.200 cá thể ruồi, mòng thu thập tại các địa phương, đã phát hiện 642 cá thể là loài ruồi *Stomoxys calcitrans*, chiếm 53,50%; 168 cá thể là loài mòng *T. kiangsuensis*, chiếm 14,00% và 390 cá thể là loài mòng *T. rubidus*, chiếm 32,50%.

Như vậy, ở các địa phương của tỉnh Bắc Ninh, loài ruồi *Stomoxys calcitrans* phổ biến hơn hai loài còn lại. Điều này thấy lặp lại ở tất cả các địa phương nghiên cứu. Theo Phan Địch Lân (2004) [3], ở nước ta khí hậu và điều kiện sinh thái thích hợp cho các loài môi giới truyền bệnh Tiên mao trùng thuộc họ mòng *Tabanidea* và giồng ruồi *Stomoxys* phát triển. Có thể điều kiện tự nhiên ở Bắc Ninh thích hợp hơn với loài *Stomoxys calcitrans*.

* Quy luật hoạt động của các loài ruồi, mòng hút máu ở các địa phương nghiên cứu

Kết quả theo dõi được trình bày ở bảng 4 và 5.

Bảng 2. Kết quả định danh, sự phân bố và tần suất xuất hiện các loài ruồi, mòng hút máu

Huyện, thành, thị xã	Địa điểm có loài ruồi, mòng hút máu		
	<i>Stomoxys calcitrans</i>	<i>Tabanus kiangsuensis</i>	<i>Tabanus rubidus</i>
Quế Võ (6 địa điểm)	6/6	6/6	6/6
Lương Tài (4 địa điểm)	4/4	2/4	2/4
Từ Sơn (2 địa điểm)	2/2	0/2	2/2
Thuận Thành (4 địa điểm)	4/4	4/4	4/4
Gia Bình (5 địa điểm)	5/5	5/5	5/5
Tiên Du (4 địa điểm)	4/4	4/4	4/4
Yên Phong (3 địa điểm)	3/3	3/3	3/3
TP. Bắc Ninh (3 địa điểm)	3/3	2/3	3/3
Tần suất xuất hiện (%)	31/31 = 100	26/31 = 83,87	29/31 = 93,55

Bảng 3. Tỷ lệ loài ruồi, mòng trong số mẫu thu thập ở các địa phương nghiên cứu

Địa phương	Số ruồi, mòng thu thập (con)	Loài ruồi, mòng	Số lượng (con)	Tỷ lệ (%)
8 huyện, TP, TX	1.200	<i>Stomoxys calcitrans</i>	642	53,50
		<i>Tabanus kiangsuensis</i>	168	14,00
		<i>Tabanus rubidus</i>	390	32,50

Kết quả bảng 4 cho thấy: Tại các địa phương, ruồi, mòng hút máu hoạt động mạnh nhất (+++) từ tháng 5 - 9, chúng hoạt động ít hơn trong tháng 3, 4, 10 và 11. Theo dõi trong tháng 12, tháng 1 và tháng 2 không thấy các loài ruồi, mòng hút máu trâu, bò ở các khu vực theo dõi.

- Ruồi, mòng hút máu truyền bệnh Tiêm mao trùng trên đàn trâu, bò: ruồi *Stomoxys calcitrans* (53,56%), mòng *Tabanus kiangsuensis* (13,81%) và mòng *Tabanus rubidus* (32,63%), với tần suất xuất hiện là 83,87-100%.

- Ruồi, mòng hút máu hoạt động mạnh vào mùa Hè và mùa Thu (tháng 5 - 9), sau đó giảm dần và ngừng hoạt động vào các tháng lạnh trong năm; bắt đầu hoạt động vào khoảng 6 - 8 giờ và hoạt động mạnh vào 8 - 18 giờ trong ngày. Cần thực hiện các biện pháp diệt ruồi, mòng hút máu để phòng bệnh Tiêm mao trùng cho đàn trâu, bò ở các địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phan Văn Chinh (2006), *Bệnh Tiêm mao trùng do Trypanosoma evansi ở trâu, bò nuôi tại các tỉnh miền Trung và biện pháp phòng trị*, Luận án tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Thú y, Hà Nội.
2. Phan Địch Lâm (1983), *Ve bét và côn trùng ký sinh ở Việt Nam*, tập II, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Phan Địch Lâm (2004), *Bệnh ngã nước trâu bò*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 56 - 73.
4. Nguyễn Văn Thiện (2008), *Thống kê sinh vật học ứng dụng trong chăn nuôi*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Trịnh Văn Thịnh (1967), *Điều tra cơ bản về côn trùng Thú y*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật Nông nghiệp.
6. Desquesnes M. (2004), *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*, CIRAD - EMVT publication, OIE, Paris, France, pp. 174.
7. Desquesnes M., Biteau-Coroller F., Bouyer J., Dia M. L., Foil L. (2009), "Development of a mathematic model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids", *International Journal for Parasitology*, 39 (3), pp. 333 - 346.
8. Muzari M. O., Burgess G. W., Skerratt L. F., Jones R. E., Duran T. L. (2010), "Host preferences of tabanid flies based on identification of blood meals by ELISA", *Vet Parasitol*, 174(3-4), pp. 191 - 198.
9. Vasudeva P., Hedge S., Veer V. (2007), "Tabanid flies (Diptera: Tabanidae) of Rajiv Gandhi National Park, Karnataka, India", *Journal of the Entomological Research Society*, 32 (3), pp. 53 - 62.