

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GIEMSA TRONG CHẨN ĐOÁN LỢN MẮC BỆNH DO *Mycoplasma suis*

Nguyễn Phương Nhung, Phạm Hồng Trang

1. Nguyên vật liệu

Ba mươi mẫu máu của lợn nái ra giống lợn lai F1 (Yorkshire × Landrace). Trong đó sử dụng phương pháp Realtime PCR xác định 15 mẫu lợn bệnh (dương tính với *M. suis*) và 15 mẫu lợn khỏe (âm tính với *M. suis*) được sử dụng làm đối chứng. Mỗi mẫu máu được chia đều vào 2 ống chứa EDTA và heparin, vận chuyển lạnh về Phòng Thí nghiệm trong vòng 24 giờ.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp Realtime PCR xác định sự có mặt của *M. suis*

DNA được tách chiết bằng kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification trên hệ thống máy tách chiết tự động KingFisher™ Duo Prime Purification của hãng Thermo Fisher Scientific, các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng Realtime PCR xác định sự có mặt của *M. suis* trong mẫu máu lợn sử dụng cặp mồi và đoạn dò theo Guimaraes & cs. (2011) để xác định gene 16S rRNA của *M. suis*.

Hỗn hợp phản ứng được chi tiết trong bảng 2.

Thực hiện phản ứng theo chu trình nhiệt ở bảng 3.

Bảng 1. Trình tự mồi và đoạn dò

Tên	Trình tự (5' - 3')	Nguồn
Mồi xuôi	CCCTGATTGTACTAATTGAATAAG	
Mồi ngược	GCGAACACTTGTTAAGCAAG	Guimaraes & cs. (2011)
Đoạn dò	FAM-TGRATACACAYTTCAG-MGBNFQ	

Bảng 2. Thành phần hỗn hợp phản ứng

Thành phần phản ứng	Thể tích cần lấy (μl)
Platinum SuperMix UDG	12,5
Mồi xuôi (10μM)	1

Môi ngược (10 μ M)	1
Đoạn dò (10 μ M)	0,5
Nước (xử lý DEPC)	5
Mẫu DNA	5
Tổng thể tích	25

Bảng 3. Chu trình nhiệt phản ứng Realtime PCR

Giai đoạn	Bước tổng hợp	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Duỗi mạch	50	2 phút	1
		95	3 phút	
2	Duỗi mạch	95	15 giây	40
	Gắn môi	60	30 giây	

2.2. Phương pháp nhuộm tiêu bản máu sử dụng thuốc nhuộm Giemsa

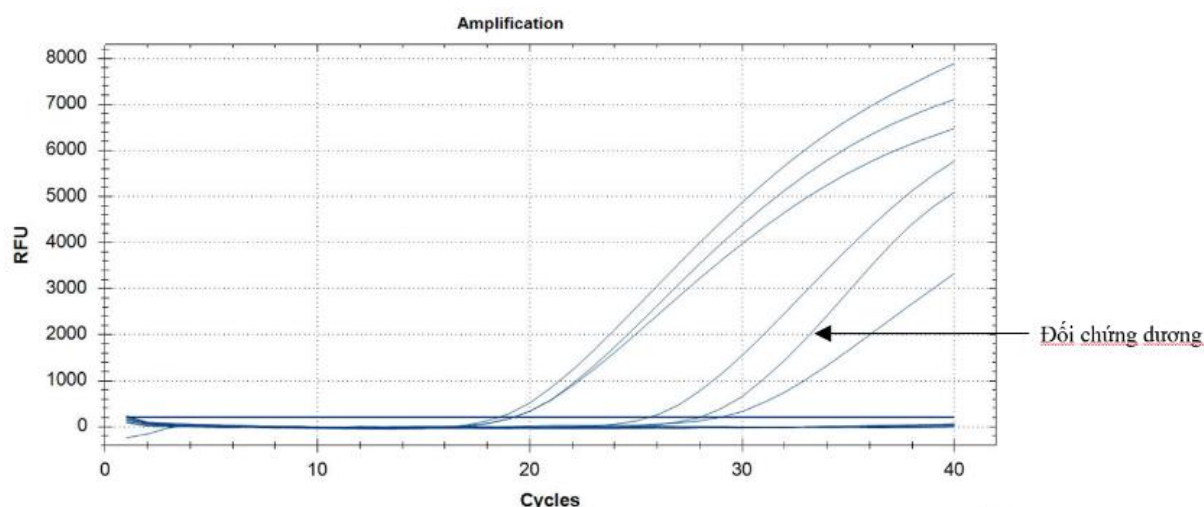
Thực hiện phết tiêu bản máu sử dụng mẫu chống đông trong ống EDTA theo phương pháp thường quy, lựa chọn tiêu bản có các tế bào máu được dàn đều một lớp và để khô tự nhiên trước khi tiến hành nhuộm.

Phương pháp nhuộm Giemsa theo hướng dẫn của CDC (2016) được thực hiện theo quy trình (có chỉnh sửa) sau: Chuẩn bị dung dịch Giemsa 10% theo hướng dẫn của nhà sản xuất, lọc cặn (nếu có) bằng giấy lọc. Thuốc nhuộm pha để sử dụng trong ngày, không sử dụng thuốc nhuộm cũ. Cố định tiêu bản máu bằng Methanol 100% trong 1-2 phút; Để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng; Nhuộm tiêu bản trong dung dịch Giemsa 10% trong 10 phút, đảm bảo lượng thuốc nhuộm trong khay nhuộm phủ kín toàn bộ tiêu bản; Rửa tiêu bản dưới vòi nước lọc (qua lõi lọc), chảy tràn trên bề mặt tiêu bản trong 1-2 phút; Để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Tiêu bản được kiểm tra sử dụng kính hiển vi quang học Carl Zeiss Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Đức) vật kính dầu với độ phóng đại 1000 lần. Kết quả dương tính được xác định với sự có mặt của *M. suis* hình tròn hoặc bầu dục, bắt màu xanh tím, bám trên bề mặt hồng cầu hoặc nằm tự do trong tiêu bản. Hồng cầu có thể bị biến dạng (Hình sao) ở nhiều mức độ khác nhau.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả xác định *M. suis* sử dụng phương pháp Realtime PCR

Căn cứ kết quả Realtime PCR để lựa chọn 15 mẫu máu lợn dương tính với *M. suis* và 15 mẫu máu lợn âm tính với *M. suis* phục vụ cho phương pháp nhuộm Giemsa.

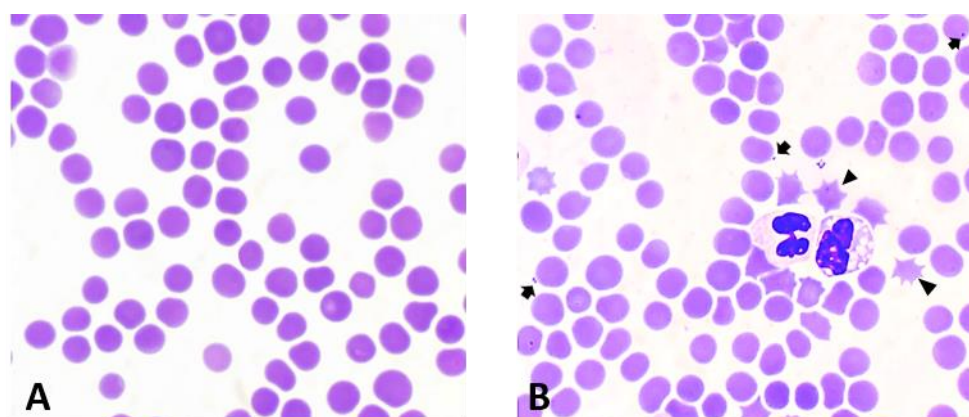


Hình 1. Hình ảnh đồ thị Realtime PCR xác định sự có mặt của *M. suis*

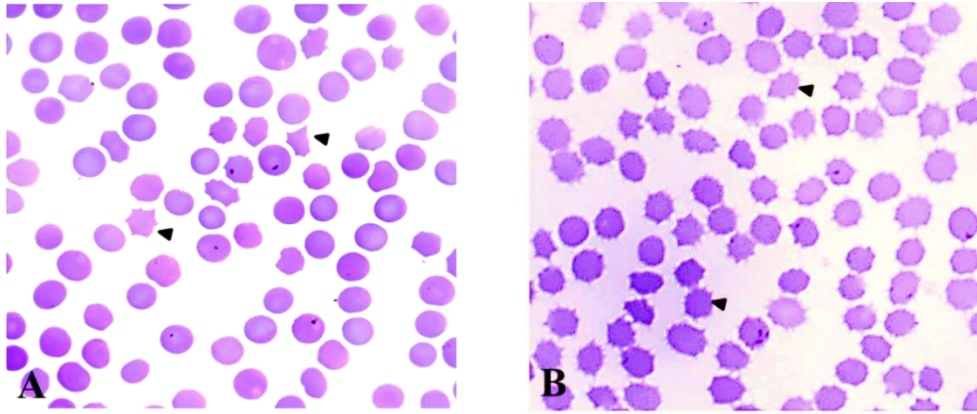
3.2. Kết quả xác định *M. suis* trong mẫu máu sử dụng thuốc nhuộm Giemsa

M. suis xuất hiện trong tất cả các mẫu máu của lợn bệnh với dạng hình tròn hoặc bầu dục, nhuộm màu xanh tím. Chúng có thể bám trên bề mặt hồng cầu hoặc nằm tự do trong tiêu bản. Mật độ của *M. suis* có thể khác nhau giữa các tiêu bản, từ thưa thớt, rải rác cho tới tụ tập với nhau thành từng đám.

Trong các mẫu máu của lợn mắc bệnh do *M. suis* thể hiện cấp độ tổn thương hồng cầu khác nhau. Sự thoái hoá của hồng cầu được ghi nhận từ tất cả các mẫu bao gồm biến dạng hình sao, bắt màu nhạt với thuốc nhuộm. Bên cạnh một số mẫu ghi nhận sự xuất hiện rải rác của hồng cầu bị thoái hoá, thì một số mẫu máu ghi nhận mức độ tổn thương rất nặng với hầu hết toàn bộ hồng cầu bị biến dạng (Hình 3).



Hình 2. Hồng cầu lợn khoẻ (A) và lợn mắc *M. suis* (B) với sự xuất hiện của *M. suis* (mũi tên) có dạng hình tròn màu xanh tím trên bề mặt hồng cầu hoặc nằm tự do (Hình ảnh hồng cầu biến dạng hình sao (đầu mũi tên) ở nhiều mức độ khác nhau (Giemsa, 100X))



Hình 3. Hình ảnh hồng cầu biến dạng hình sao (đầu mũi tên) ở nhiều mức độ khác nhau: rải rác (A) và biến dạng hầu hết toàn bộ (B) (Giemsa, 100X)