

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



ĐỖ ĐỨC THÀNH

**GIẢI MÃ GEN KHÁNG NGUYÊN H, PHÂN TÍCH
ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ VÀ XÁC ĐỊNH PHẢ HỆ
NGUỒN GỐC CỦA *CANINE DISTEMPER VIRUS*
GÂY BỆNH CARE Ở CHÓ TẠI HÀ NỘI**

Ngành: Thú y

Mã số ngành: 8.64.01.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ THÚ Y

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Đặng Thị Mai Lan - Đại học Nông Lâm Thái Nguyên
2. TS. Đoàn Thị Thanh Hương - Viện Công nghệ sinh học

Thái Nguyên - 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi được thực hiện với sự giúp đỡ của:

- Ths. Đỗ Thị Roan, Ths. Nguyễn Thị Khuê, Ths. Phạm Thị Khánh Linh, KS. Nguyễn Thị Thu Hiền cùng các anh, chị, em Phòng Miễn dịch học - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Chủ các Phòng khám Thú y tại quận Hà Đông, Nam Từ Liêm, Cầu Giấy - Hà Nội đã luôn tạo điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận văn.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin cam đoan rằng các thông tin trích dẫn trong luận văn đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2020

Tác giả

Đỗ Đức Thành

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, cùng với sự nỗ lực, cố gắng của bản thân, tôi xin được đặc biệt bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới cô giáo: TS. Đặng Thị Mai Lan và TS. Đoàn Thị Thanh Hương, người đã trực tiếp hướng dẫn và truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu cho tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin được chân thành cảm ơn tới Ths. Đỗ Thị Roan, Ths. Nguyễn Thị Khuê, Ths. Phạm Thị Khánh Linh, KS. Nguyễn Thị Thu Hiền cùng các anh, chị, em Phòng Miễn dịch học - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Nhân dịp này tôi cũng xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu nhà trường, Ban Chủ nhiệm Khoa Chăn nuôi Thú y, các thầy cô, các anh chị em đồng nghiệp khoa Chăn nuôi Thú y, Chủ các Phòng khám Thú y tại quận Hà Đông, Nam Từ Liêm, Cầu Giấy - Hà Nội đã luôn tạo điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận văn.

Lời sau cùng, xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới những người bạn, người thân trong gia đình và nhất là bố, mẹ đã luôn kịp thời động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành luận văn.

Xin trân trọng cảm ơn tất cả sự giúp đỡ quý báu này.

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2020

Đỗ Đức Thành

MỤC LỤC

| | |
|---|-------------|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN | ii |
| MỤC LỤC | iii |
| DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT | vi |
| DANH MỤC CÁC BẢNG BIỂU | vii |
| DANH MỤC CÁC HÌNH | viii |
| MỞ ĐẦU | 1 |
| 1. Tính cấp thiết của đề tài | 1 |
| 2. Mục tiêu nghiên cứu..... | 2 |
| 3. Ý nghĩa của đề tài..... | 3 |
| 3.1. Ý nghĩa khoa học | 3 |
| 3.2. Ý nghĩa thực tiễn..... | 3 |
| Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 4 |
| 1.1. Cơ sở khoa học của vấn đề nghiên cứu..... | 4 |
| 1.1.1. Nguyên nhân gây bệnh..... | 4 |
| 1.1.2. Con đường xâm nhập và cách lây lan | 4 |
| 1.1.3. Cơ chế gây bệnh..... | 5 |
| 1.1.4. Triệu chứng lâm sàng và bệnh tích | 6 |
| 1.1.5. Chẩn đoán và phòng, trị bệnh | 8 |
| 1.2. Cơ sở pháp lý của vấn đề nghiên cứu | 14 |
| 1.2.1. Đặc điểm sinh học của virus <i>Canine Distemper</i> (CDV)..... | 14 |
| 1.2.2. Tầm quan trọng của việc giải mã hệ gen virus Care..... | 17 |
| 1.3. Tổng quan về tình hình nghiên cứu trên thế giới..... | 20 |
| 1.4. Tổng quan về tình hình nghiên cứu ở Việt Nam | 22 |
| CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP | |
| NGHIÊN CỨU | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu..... | 24 |
| 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu..... | 24 |
| 2.1.2. Phạm vi nghiên cứu..... | 24 |
| 2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu | 24 |
| 2.2. Nội dung nghiên cứu | 24 |
| 2.2.1. Tình hình chó mắc bệnh Care tại một số quận trên địa bàn Hà Nội..... | 24 |
| 2.2.2. Thu nhận mẫu bệnh phẩm nhiễm CDV | 24 |
| 2.2.3. Thu nhận gen kháng nguyên H bằng kỹ thuật PCR..... | 24 |
| 2.2.4. Giải trình tự nucleotide và amino acid của gen H | 24 |
| 2.2.5. So sánh tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid của chủng CDV Việt Nam với các chủng của thế giới..... | 24 |
| 2.2.6. Xác định phả hệ nguồn gốc của các chủng CDV Việt Nam | 24 |
| 2.3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu | 25 |
| 2.3.1. Vật liệu nghiên cứu | 25 |
| 2.3.2. Phương pháp nghiên cứu..... | 26 |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN..... | 34 |
| 3.1. Kết quả về tình hình chó mắc bệnh Care tại một số Quận trên địa bàn Hà Nội | 34 |
| 3.1.1. Tình hình chó mắc bệnh Care tại một số Quận ở Hà Nội..... | 34 |
| 3.1.2. Tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo giống..... | 35 |
| 3.1.3. Tỷ lệ mắc bệnh Care theo lứa tuổi | 37 |
| 3.1.4. Tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo mùa..... | 39 |
| 3.1.5. Tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo nhóm đã được tiêm phòng và chưa được tiêm phòng vaccine | 40 |
| 3.1.6. Những triệu chứng lâm sàng của chó mắc bệnh Care | 42 |
| 3.2. Kết quả về số mẫu xét nghiệm và thu nhận gen H của chó mắc bệnh Care | 43 |
| 3.3. Kết quả phản ứng PCR và giải trình tự nucleotide, amino acid của gen H | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4. Kết quả phân tích gen H và so sánh với các chủng của thế giới..... | 49 |
| 3.5. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc của các chủng CDV Việt Nam..... | 55 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ | 58 |
| 1. Kết luận..... | 58 |
| 2. Đề nghị..... | 59 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 60 |

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

| | |
|-------------|---|
| <i>CDV:</i> | <i>Canine Distemper Virus</i> |
| bp: | base pair (cặp base) |
| DNA: | Deoxyribonucleic acid |
| RNA: | Ribonucleic acid |
| CPE | Cyto pathogenic Effect |
| ELISA | Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay |
| IHC | Immunohistochemistry |
| IF | Immuno Fluorescent test |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymesase Chain Reaction |
| RT | Reverse Transcriptase |
| msf | multiple sequence file |
| dNTPs: | deoxynucleotide triphosphate |
| MEGA | Molecular Evolutionary Genetics Analysis |
| Epp: | Eppendorf |
| NCBI: | Ngân hàng gen |
| PCR: | Polymerase Chain Reaction |

DANH MỤC CÁC BẢNG BIỂU

| | |
|--|----|
| Bảng 2.1. Bộ mồi thu nhận gen H..... | 25 |
| Bảng 2.2: Các bước tách chiết RNA tổng số | 27 |
| Bảng 2.3: Thành phần phản ứng chuyển đổi cDNA từ RNA tổng số | 28 |
| Bảng 2.4: Thành phần của phản ứng PCR..... | 28 |
| Bảng 2.5: Các bước tinh sạch sản phẩm PCR..... | 31 |
| Bảng 3.1. Tỷ lệ chó mắc bệnh Care tại 3 Quận ở Hà Nội..... | 34 |
| Bảng 3.2. Tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo giống | 36 |
| Bảng 3.3. Tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo lứa tuổi..... | 37 |
| Bảng 3.4. Tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo mùa | 39 |
| Bảng 3.5. Tỷ lệ chó mắc bệnh theo nhóm đã được tiêm và chưa được tiêm phòng vaccine..... | 40 |
| Bảng 3.6. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của chó mắc bệnh Care | 42 |
| Bảng 3.7. Các mẫu virus CDV sử dụng trong nghiên cứu | 44 |
| Bảng 3.8. Nồng độ RNA tổng số được đo bằng máy Nanodrop | 45 |
| Bảng 3.9. Danh sách các chủng CDV của Việt Nam và thế giới sử dụng trong nghiên cứu..... | 49 |
| Bảng 3.10. Tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid giữa các chủng CDV nghiên cứu và các chủng của thế giới | 53 |

DANH MỤC CÁC HÌNH

| | |
|--|----|
| Hình 1.1. Mô hình cấu trúc của virus Canine Distemper (CDV) | 15 |
| Hình 1.2. Hình thái của virus Canine Distemper | 16 |
| Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu | 26 |
| Hình 2.2: Chu trình nhiệt của phản ứng PCR | 29 |
| Hình 3.1. Biểu đồ tỷ lệ chó mắc bệnh Care tại 3 Quận ở Hà Nội..... | 34 |
| Hình 3.2. Biểu đồ tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo giống | 36 |
| Hình 3.3. Biểu đồ tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo lứa tuổi | 38 |
| Hình 3.4. Biểu đồ tỷ lệ chó mắc bệnh Care theo mùa..... | 39 |
| Hình 3.5. Biểu đồ tỷ lệ chó mắc bệnh theo nhóm đã được tiêm và chưa được tiêm phòng vaccine..... | 41 |
| Hình 3.6. Sản phẩm điện di RNA các chủng CDV thu thập được..... | 43 |
| Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen H của 2 mẫu CDV nghiên cứu | 45 |
| Hình 3.8. Trình tự nucleotide và amino acid (suy diễn) của gen H chủng CDVHN7..... | 47 |
| Hình 3.9. Trình tự nucleotide và amino acid (suy diễn) của gen H chủng CDVHN6..... | 48 |
| Hình 3.10. Sai khác nucleotide ở cuối gen H dẫn đến sự khác biệt của chủng virus vaccine so với chủng virus nghiên cứu | 54 |
| Hình 3.11. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ nguồn gốc giữa các chủng CDV nghiên cứu và các chủng của thế giới | 56 |

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh Care hay còn được gọi là bệnh sài sốt ở chó là một bệnh truyền nhiễm cấp tính do virus Canine Distemper (*Canine Distemper Virus - CDV*) gây ra. Đặc trưng của bệnh là sốt cấp tính, rối loạn tiêu hóa, hô hấp và rối loạn hệ thần kinh, đặc biệt bệnh có tỷ lệ chết rất cao (Nguyễn Như Pho, 2003).

Bệnh Care được phát hiện lần đầu tiên ở Peru từ thế kỷ XVIII và sau đó lan ra toàn thế giới như Mỹ, Argentina, Brazil, Mexico, Nam Phi và nhiều nước châu Âu. Ở châu Á, bệnh được ghi nhận tại Nhật Bản (Lan và cs., 2006), Thái Lan (Kubo và cs.,2007), Hàn Quốc (Cha và cs.,2013) và Ấn Độ (Swati và cs.,2015). Tại Việt Nam, bệnh xảy ra tương đối phổ biến và là một trong những bệnh có tỷ lệ tử vong cao nhất ở chó. Chó mắc bệnh Care bao gồm chó chưa được tiêm vaccine và cả những chó đã được tiêm vaccine (theo ghi nhận của các phòng khám thú y).

Virus gây bệnh Care có hệ gen là RNA sợi đơn âm, có kích thước khoảng 15.7kb, thuộc loài *Canine morbillivirus*, họ *Paramixoviridae*, chi *Morbillivirus*. Hệ gen mã hóa cho 8 protein, gồm 2 protein không cấu trúc (protein C và V) và 6 protein cấu trúc là nucleocapsid (N), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin (H), phospho (P) và large (L) protein. Trong đó, protein H và protein F là 2 protein kháng nguyên, quyết định tính độc lực của virus. Đây là các gen có nhiều biến đổi nhất giữa các chủng và giữa các genotype nên được chọn là đối tượng chính cho nghiên cứu dịch tễ phân tử và nguồn gốc phả hệ (Ke và cs.,2015).

Có ít nhất 14 genotype khác nhau của CDV đã được công bố, bao gồm: Asia-1, Asia-2, Asia-3, Asia-4, Europe, European wildlife, Arctic, Rockborn-like, America-1, America-2, Africa, South America-1, South America-2 và South America-3 (Espinal và cs., 2014; Guo và cs., 2013).