

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

NCS. PHẠM THỊ TRANG

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM
VÀ CHẾ TẠO KIT CHẨN ĐOÁN BỆNH TIÊN MAO TRÙNG
(*TRYPANOSOMIASIS*) Ở ĐÀN TRÂU
TẠI TỈNH TUYÊN QUANG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ THÚ Y

THÁI NGUYÊN - NĂM 2017

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

NCS. PHẠM THỊ TRANG

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM
VÀ CHẾ TẠO KIT CHẨN ĐOÁN BỆNH TIÊN MAO TRÙNG
(*TRYPANOSOMIASIS*) Ở ĐÀN TRÂU
TẠI TỈNH TUYÊN QUANG**

Ngành: Ký sinh trùng và vi sinh vật học thú y

Mã số: 9640104

LUẬN ÁN TIẾN SĨ THÚ Y

**Người hướng dẫn khoa học: 1. GS. TS. Nguyễn Thị Kim Lan
2. PGS. TS. Phạm Công Hoạt**

THÁI NGUYÊN - NĂM 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của chúng tôi. Các kết quả nghiên cứu trong luận án này là hoàn toàn trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ một luận án nào khác. Mọi thông tin trích dẫn trong luận án đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Tôi xin cam đoan mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện đề tài nghiên cứu và hoàn thành Luận án đều đã được cảm ơn.

TÁC GIẢ

Phạm Thị Trang

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới **GS. TS. Nguyễn Thị Kim Lan** và **PGS. TS. Phạm Công Hoạt** - những Nhà khoa học đã hướng dẫn, chỉ bảo tôi hết sức tận tình trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành Luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ và tạo điều kiện to lớn về cơ sở vật chất, nhân lực, vật lực của Ban Giám đốc, Ban Đào tạo - Đại học Thái Nguyên; Đảng ủy, Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo, Ban chủ nhiệm Khoa Chăn nuôi thú y, Bộ môn Bệnh động vật, Bộ môn Dược - An toàn thực phẩm Trường Đại học Nông Lâm – Đại học Thái Nguyên, tập thể cán bộ và giảng viên, các học viên cao học Trần Nhật Thắng, Nguyễn Thị Thu Hiền, Hoàng Thị Hồng Hạnh và sinh viên các khóa 39, 40, 41, 42, 43 Khoa Chăn nuôi Thú y - Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên. Đặc biệt, tôi xin trân trọng cảm ơn PGS. TS. Phạm Thị Tâm cùng các cán bộ, giảng viên, học viên và sinh viên Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở - Hà Nội đã tận tình giúp đỡ tôi trong suốt thời gian triển khai đề tài.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Chi cục Chăn nuôi và Thú y tỉnh Tuyên Quang, các Trạm Chăn nuôi và Thú y, cán bộ, nhân dân địa phương của các huyện Yên Sơn, Sơn Dương, Hàm Yên và Chiêm Hóa - tỉnh Tuyên Quang đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi vô cùng biết ơn các thành viên trong gia đình và bạn bè đã luôn ở bên tôi, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành Luận án.

Thái nguyên, ngày tháng năm 2017

NGHIÊN CỨU SINH

Phạm Thị Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
2. Mục tiêu của đề tài.....	3
3. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tài.....	3
4. Những đóng góp mới của đề tài.....	3
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. Cơ sở khoa học của đề tài	4
1.1.1. Bệnh tiên mao trùng ở động vật.....	4
1.2. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	20
1.2.1. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	20
1.2.2. Tình hình nghiên cứu ở nước ngoài.....	24
1.3. Điều kiện tự nhiên, điều kiện kinh tế - xã hội của tỉnh Tuyên Quang.....	35
1.3.1. Điều kiện tự nhiên.....	35
1.3.2. Điều kiện kinh tế - xã hội.....	36
Chương 2: VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu	38
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	38
2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	38
2.1.3. Vật liệu nghiên cứu	38
2.2. Nội dung nghiên cứu.....	43
2.2.1. Nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng trên đàn trâu ở tỉnh Tuyên Quang và áp dụng phác đồ điều trị.....	43

2.2.2. Nghiên cứu chế tạo và thử nghiệm Kit CATT trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho đàn trâu của tỉnh Tuyên Quang	44
2.3. Phương pháp nghiên cứu	45
2.3.1. Phương pháp xác định tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng trên đàn trâu của tỉnh Tuyên Quang và áp dụng phác đồ điều trị.....	45
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu chế tạo Kit chẩn đoán bệnh	51
2.4. Phương pháp xử lý số liệu	64
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	65
3.1. Tình hình nhiễm tiên mao trùng trên đàn trâu ở 4 huyện thuộc tỉnh Tuyên Quang và áp dụng phác đồ điều trị hiệu quả	65
3.1.1. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu tại 4 huyện thuộc tỉnh Tuyên Quang	65
3.1.2. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng theo lứa tuổi trâu tại tỉnh Tuyên Quang	67
3.1.3. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu theo tính biệt.....	71
3.1.4. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu theo mùa vụ.....	72
3.1.5. Kết quả xác định loài tiên mao trùng gây bệnh trên đàn trâu của tỉnh Tuyên Quang.....	75
3.1.6. Áp dụng phác đồ điều trị bệnh tiên mao trùng cho đàn trâu của tỉnh Tuyên Quang.....	80
3.2. Nghiên cứu chế tạo và thử nghiệm Kit CATT trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng cho đàn trâu của tỉnh Tuyên Quang.....	83
3.2.1. Kết quả tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa kháng nguyên bề mặt RoTAT 1.2 của <i>T. evansi</i>	83
3.2.2. Kết quả biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên bề mặt của <i>T. evansi</i>	92
3.2.3. Kết quả nghiên cứu chế tạo và thử nghiệm Kit CATT trong chẩn đoán bệnh tiên mao trùng.....	108
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	131
1. Kết luận	131
2. Đề nghị.....	132
TÀI LIỆU THAM KHẢO	133
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI.....	148

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VIẾT TẮT

DNA: Acide Deoxyribo Nucleic

bp: base pair

CATT: Card Agglutination Test for Trypanosomiasis

CBB: Coomassie Brilliant Blue

DMSO: Di Methyl Sulfoxide

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic acid

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ISG: Invariant Surface Glycoprotein

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

kgTT: Kilogram thể trọng

LB: Luria Bertani

OD: Optical Density

PBS: Phosphat Buffered Saline

PCA: Plate Count Agar

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMSF: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

PVDF: Poly Vinylidene Di Fluoride

RT - PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium Dodecyl Sulfat

SDS - PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

spp.: Species pluralis

TEA: Tris - axit acetic - EDTA

TMB: Tetra Methyl Benzidine

VAT: Variable Antigen Type

VSG: Variant Surface Glycoprotein

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần gel Tricine - SDS	41
Bảng 2.2. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu	42
Bảng 2.3. Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng PCR.....	48
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa kháng nguyên RoTAT 1.2	54
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng Klewov cắt đầu bằng sản phẩm PCR.....	54
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng lai tạo vector tái tổ hợp	55
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng kiểm tra sự mang gen của vector tái tổ hợp bằng phản ứng PCR với cặp mồi F1.2 và R1.2	57
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng ghép nối gen ngoại lai vào vector biểu hiện	58
Bảng 3.1. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu tại 4 huyện thuộc tỉnh Tuyên Quang	65
Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng theo tuổi trâu	68
Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu theo tính biệt	71
Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu theo mùa trong năm	72
Bảng 3.5. Danh sách chuỗi gen 18S của <i>Trypanosoma evansi</i> sử dụng so sánh và phân tích trong nghiên cứu	78
Bảng 3.6. Kết quả áp dụng phác đồ điều trị bệnh tiên mao trùng trên diện hẹp.....	80
Bảng 3.7. Thử nghiệm phác đồ điều trị bệnh tiên mao trùng trên diện rộng.....	82
Bảng 3.8. Bảng tổng hợp kết quả so sánh trình tự xác định với các trình tự trên NCBI.....	92
Bảng 3.9. Kết quả xác định mật độ hạt latex và nồng độ kháng nguyên để tạo phức hợp kháng nguyên - hạt latex.....	111
Bảng 3.10. Kết quả xác định nhiệt độ và thời gian để tạo phức hợp kháng nguyên - hạt latex	112
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của chất nhuộm màu đến khả năng ngưng kết kháng nguyên - kháng thể	113

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ và chất ức chế phân giải protein đến kháng nguyên tái tổ hợp RoTAT 1.2	115
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nhiệt độ và chất ổn định protein đến kháng nguyên tái tổ hợp RoTAT 1.2.....	117
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của nhiệt độ và chất diệt khuẩn đến kháng nguyên tái tổ hợp RoTAT 1.2.....	118
Bảng 3.15. Xác định độ pha loãng kháng thể, thời gian và nhiệt độ phản ứng	121
Bảng 3.16. Kết quả phản ứng sử dụng Kit CATT phát hiện kháng thể kháng	125
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ bảo quản đến độ nhạy của phản ứng khi sử dụng Kit CATT.....	127
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ bảo quản đến độ đặc hiệu của Kit CATT chế tạo	127
Bảng 3.19. So sánh kết quả chẩn đoán bệnh tiên mao trùng của Kit CATT với kỹ thuật ELISA và phương pháp tiêm truyền chuột.....	128
Bảng 3.20. So sánh hiệu quả sử dụng Kit CATT với kỹ thuật ELISA và phương pháp tiêm truyền chuột.....	129

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc của tiên mao trùng <i>T. evansi</i>	4
Hình 1.2. Phương thức truyền lây tiên mao trùng <i>T. evansi</i>	5
Hình 1.3. Sơ đồ vector pCR 2.1	17
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tách dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên bề mặt của <i>T. evansi</i>	51
Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu chế tạo và thử nghiệm Kit CATT từ kháng nguyên tái tổ hợp của <i>T. evansi</i>	52
Hình 3.1. Biểu đồ tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu tại 4 huyện thuộc tỉnh Tuyên Quang.....	66
Hình 3.2. Đồ thị biến động nhiễm tiên mao trùng ở trâu theo lứa tuổi.....	68
Hình 3.3. Biểu đồ tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu theo tính biệt	71
Hình 3.4. Biểu đồ tỷ lệ nhiễm tiên mao trùng ở trâu theo mùa trong năm	73
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen 18S của các mẫu <i>Trypanosoma</i> spp. trên thạch agarose 1%	75
Hình 3.6. Hình ảnh chuyển nạp sản phẩm PCR của mẫu Tev-CH-VN; Tev-HY-VN; Tev-SD-VN và Tev-YS-VN vào tế bào <i>E. coli</i> chủng DH5 α -T	76
Hình 3.7. Điện di kiểm tra sản phẩm cắt DNA plasmid tái tổ hợp mang gen 18S bằng enzyme <i>EcoRI</i>	77
Hình 3.8. Cây phả hệ dựa trên trình tự nucleotide chuỗi gen 18S rRNA của các mẫu Tev-CH-VN; Tev-HY-VN; Tev-SD-VN và Tev-YS-VN nghiên cứu với các mẫu <i>Trypanosoma evansi</i> đã được đăng ký trong Ngân hàng gen	79
Hình 3.9. Kết quả điện di DNA tổng số.....	83
Hình 3.10. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mẫu DNA tổng số	84
Hình 3.11. Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR	85
Hình 3.12. Sơ đồ thiết kế vector tái tổ hợp pJET1.2 - RoTAT 1.2.....	86