

BỘ KHOA HỌC - CÔNG NGHỆ
VIỆN THÚ Y
86, Đường Trường Chinh - Đống Đa – Hà Nội

Báo cáo tổng kết KHKT Đề tài KC.04.16:

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT
VÀ SỬ DỤNG KIT CHẨN ĐOÁN
MỘT SỐ BỆNH NGUY HIỂM Ở VẬT NUÔI**

Chủ nhiệm đề tài: PGS. TS. Trương Văn Dung

6101
19/9/2006

Hà Nội – 2005

Bản quyền 2005 thuộc Viện Thú y.

Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng Viện Thú y trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu.

CÁC ĐỀ TÀI NHÁNH CỦA ĐỀ TÀI KC04-16

TT	Mã số	Tên đề tài nhánh	Cơ quan của chủ nhiệm đề tài nhánh
1	KC04-16 01	Ứng dụng các kỹ thuật công nghệ sinh học để phát hiện nhanh virus gây bệnh đốm trắng của tôm TS Đinh Thương Vân	Viện Công nghệ sinh học
2	KC04-16 02	KIT chẩn đoán dịch tả lợn TS Nguyễn Tiến Dũng	Viện Thú y
3	KC04-16 03	KIT chẩn đoán bệnh do Salmonella ở gà bằng công nghệ vi sinh TS Cù Hữu Phú	Viện Thú y
4	KC04-16 04	KIT ELISA chẩn đoán Salmonella ở gà công nghiệp bằng công nghệ sản xuất kháng nguyên bằng vi khuẩn biến nạp TS Trương Nam Hải	Viện Công nghệ sinh học
5	KC04-16 05	KIT chẩn đoán bệnh tụ huyết trùng trâu bò bằng kỹ thuật miễn dịchn -Bệnh lý PGS TS Trương Văn Dung	Viện Thú y

DANH SÁCH CÁC CÁN BỘ THỰC HIỆN
ĐỀ TÀI KC04.16

I. CÁN BỘ THAM GIA CHỦ CHỐT

STT	Họ và tên	Học vị	Cơ quan công tác	Chữ ký
A Chủ nhiệm đề tài				
	Trương Văn Dung	PGS. TS.	Viện Thú y	
B Cán bộ tham gia chính				
1	Đinh Thương Vân	TS	Viện Công nghệ sinh học	
2	Nguyễn Tiến Dũng	TS	Viện Thú y	
3	Cù Hữu Phú	TS	Viện Thú y	
4	Trương Nam Hải	TS	Viện Công nghệ sinh học	

II. DANH SÁCH CÁN BỘ THAM GIA

STT	Họ và tên	Học vị chuyên môn	Cơ quan công tác
1	Đình Duy Kháng	TS	Viện Công nghệ Sinh học
2	.Nguyễn Văn Dũng	TS	TT N/C nuôi trồng Thủy Sản nước lợ Quý Kim, Đồ Sơn, Hải Phòng
3	.Nguyễn Kim Độ	GS.TS	Viện Công nghệ Sinh học
4	Lê Thị Hội	CN	Viện Công nghệ Sinh học
5	Hà Thị Thu	CN	Viện Công nghệ Sinh học
6	Vũ Thị Ngọc Bích	CN	Viện Công nghệ Sinh học
7	Nguyễn Ngọc Nhiên	TS	Viện Thú y
8	KEN INUI	TS	JICA –SNIVR
9	Hồ Thu Hương	Th.S	Viện Thú Y
10	Bùi Nghĩa Vượng	BSTY	Viện Thú Y
11	Nguyễn Thế Vinh	BSTS	Viện Thú Y
12	Nguyễn Thuý Duyên	Th.S	Viện Thú Y
13	Nguyễn Thị Bơ	KTV	Viện Thú Y
14	Đỗ Ngọc Thuý	TS	Viện Thú y
15	Nguyễn Thu Hằng	BSTY	Viện Thú y
16	Âu Xuân Tuấn	BSTY	Viện Thú y

STT	Họ và tên	Học vị chuyên môn	Cơ quan công tác
17	Phạm Bảo Ngọc	TS	Viện Thú y
18	.Đào Thị Hảo	Th.S	Viện Thú y
19	Văn Thị Hương	BSTY	Viện Thú y
20	Nguyễn Xuân Huyền	BSTY	Viện Thú y
21	Vũ Ngọc Quý	BSTY.	Viện Thú y
22	Nguyễn Bích Thủy	BSTY	Viện Thú y
23	Phạm Thuý Hồng	TS	Viện Công nghệ Sinh học
24	Nguyễn Thanh Thủy	CN	Viện Công nghệ Sinh học
25	Nguyễn Thanh Lịch	CN	Viện Công nghệ Sinh học
26	Lê Hữu Cường	Th.S	Viện Công nghệ Sinh học
27	Lê Thu Hồng	CN	Viện Công nghệ Sinh học
28	Dương Cẩm Thuý	CN	Viện Công nghệ Sinh học
29	Đỗ Thị Huyền	Th.S	Viện Công nghệ Sinh học
30	Nguyễn Thị Trung	Th.S	Viện Công nghệ Sinh học
31	Trần Ngọc Tân	CN	Viện Công nghệ Sinh học
32	Tô Long Thành	TS	Viện Thú y
33	Hoàng Xuân Nghinh	Th.S	Viện Thú y
34	Đỗ Tuấn Cương	Th.S	Viện Thú y

STT	Họ và tên	Học vị chuyên môn	Cơ quan công tác
35	Lê Trần Phan	BSTY	Viện Thú y
36	Đặng Vũ Hoàng	BSTY	Viện Thú y
37	Trần Thu Hiền	Th.S	Công ty HANVET
38	Trần Thanh Hà	BSTY	Viện Thú y
39	Trần Xuân Ánh	Th.S	Viện Thú y
40	Trương Hồng Hoa	BSTY	Viện Thú y
41	Nguyễn Thị Bích	BSTY	Viện Thú y
42	Nguyễn Thị Thanh Nhân	Th.S.	Chi cục TT Lạng Sơn

DANH SÁCH CÁC ĐƠN VỊ THAM GIA PHỐI HỢP

<u>TT</u>	<u>Đơn vị</u>
1	Viện Thú y
2	Viện Công nghệ sinh học
3	Trung tâm Chẩn đoán thú y TW
4	Trung tâm vùng thú y Hà Nội
5	Trung tâm vùng thú y Vinh
6	Trung tâm vùng thú y Đà Nẵng
7	Trung tâm vùng thú y Thành phố Hồ Chí Minh
8	Trung tâm vùng thú y Cần Thơ
9	Trường đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh
10	Chi cục Thú y Hà Nội
11	Chi cục Thú y thành phố Hồ Chí Minh
12	Trung tâm nghiên cứu nuôi trồng thủy sản nước lợ Hải Phòng

MỤC LỤC

	Trang
TÓM TẮT BÁO CÁO	1
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	5
LỜI NÓI ĐẦU	9
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	17
1.1. Bệnh đốm trắng ở tôm	17
1.1.1. Tình hình dịch bệnh	18
1.1.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	19
1.2. Bệnh Dịch tả lợn	21
1.2.1. Tình hình bệnh Dịch tả lợn trên thế giới	21
1.2.2. Tình hình bệnh Dịch tả lợn trên ở Việt Nam	21
1.2.3. Dịch tễ bệnh Dịch tả lợn	22
1.2.4. Chất chứa mầm bệnh và độc lực của virus	25
1.2.5. Sinh bệnh học	25
1.2.6. Một số đặc điểm chủ yếu của virus Dịch tả lợn	26
1.3. Bệnh Salmonella ở gà	28
1.3.1. Giới thiệu chung về Salmonella	29
1.3.2. Các kháng nguyên cấu trúc bề mặt tế bào	30
1.3.3. Các phương pháp phát hiện Salmonella	33
1.3.4. Biểu hiện gen	35
1.4. Bệnh Tụ huyết trùng	37
1.4.1. Tình hình nghiên cứu bệnh Tụ huyết trùng	37
1.4.2. Bệnh Tụ huyết trùng tại Việt Nam	40
1.4.3. Căn bệnh	41
1.4.4. Các phương pháp chẩn đoán	52

1.4.5. Cơ sở khoa học của việc gây tối miễn dịch	58
CHƯƠNG II: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	62
A. NGUYÊN LIỆU	62
2.1. Đối tượng nghiên cứu bệnh Đốm trắng ở tôm	62
2.2. Bệnh Dịch tả lợn	63
2.3. Kit chẩn đoán miễn dịch bệnh Salmonella ở gà	64
2.4. Kit ELISA chẩn đoán bệnh do Salmonella	64
2.5. Kit chẩn đoán bệnh Tụ huyết trùng trâu bò	65
B. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	69
2.1. Bệnh Đốm trắng ở tôm	69
2.1.1. Phương pháp tách AND tổng số	69
2.1.2. Phương pháp xác định nồng độ ADN	70
2.1.3. Kỹ thuật PCR	71
2.1.4. Mutiplex PCR	72
2.1.5. Phương pháp biến nạp AND plasmid vào tế bào E.coli	73
2.1.6. Phương pháp tách AND plasmid từ vi khuẩn	74
2.1.7. Phương pháp điện di AND trên gel	74
2.1.8. Phương pháp xác định trình tự AND tự động	75
2.2. Kit chẩn đoán Dịch tả lợn	76
2.2.1. Phương pháp RT - PCR	76
2.2.2. Phương pháp chạy điện di nằm ngang	78
2.2.3. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp	79
2.2.4. Phương pháp NPLA	80
2.2.5. Phương pháp lấy mẫu máu bằng giấy thấm	82
2.3. Kit chẩn đoán miễn dịch bệnh Salmonella ở gà	82
2.3.1. Phương pháp xác định vi khuẩn Salmonella	82
2.3.2. Phương pháp thử phản ứng ngưng kết trên phiến kính	83
2.3.3. Phương pháp xác định kháng nguyên H	83

2.4. Kit ELISA chẩn đoán Salmonella	85
2.4.1. Tách chiết DNA genom từ TB VK Salmonella	85
2.4.2. Tách chiết DNA plasmid từ tế bào VK E. coli	86
2.4.3. Biến nạp DNA plasmid vào E.coli bằng PP TB khả biến	87
2.4.4. Điện di DNA trên gel agarose	88
2.4.5. Điện di thu gen trong túi thẩm tích	88
2.4.6. Xử lý DNA plasmid bằng enzym hạn chế	89
2.4.7. Phương pháp tiến hành PCR	89
2.4.8. Phương pháp tinh sạch bằng cột sắc kí ái lực	90
2.4.9. Phương pháp lai Western blot	90
2.4.10. Thí nghiệm ELISA	91
2.5. Kit chẩn đoán Tụ huyết trùng trâu bò	92
2.5.1. Qui trình chiết tách IgG của thỏ	92
2.5.2. Xác định nồng độ protein	93
2.5.3. Qui trình gây miễn dịch cho dê	93
2.5.4. Phản ứng ELISA để kiểm tra HGKT của dê	94
2.5.5. Chế tạo Peroxidase conjugation	94
2.5.6. Xác định đặc tính VSV, SH và độc lực của VK	96
2.5.7. Qui trình chế kháng nguyên và chất gây MD	97
2.5.8. Lịch trình gây tối miễn dịch trên thỏ	98
2.5.9. Đánh giá đáp ứng miễn dịch của thỏ	99
2.5.10. Phương pháp thu hoạch kháng thể	103
2.5.11. Xác định hàm lượng protein	104
2.5.12. Phương pháp điện di protein	105
2.5.13. Sử dụng IgG thu được trong phản ứng IHA	107
2.5.14. Phương pháp miễn dịch bệnh lý chẩn đoán bệnh THT	107
CHƯƠNG BA: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	112
3.1. Kit chẩn đoán bệnh đốm trắng ở tôm	112