

Nghiên cứu khoa học

TÌNH HÌNH NHIỄM, ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN VÀ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ BỆNH KÝ SINH TRÙNG NỘI BÀO *EHRlichia CANIS* TRÊN CHÓ TẠI TỈNH BẾN TRE

Lê Hữu Phước, Nguyễn Văn Vui*

Bộ môn Chăn nuôi Thú y, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

*Tác giả liên hệ email: nvvuity@tvu.edu.vn

TÓM TẮT

Bệnh ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* xảy ra phổ biến và có ảnh hưởng đến sức khỏe cũng như gây tử vong trên chó. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định tỷ lệ nhiễm bệnh, đặc điểm di truyền, và hiệu quả điều trị bệnh ký sinh trùng nội bào do *E. canis* ở chó tại tỉnh Bến Tre. Kết quả nghiên cứu theo phương pháp nhuộm tiêu bản máu cho thấy tỷ lệ chó mắc bệnh do *E. canis* ở tỉnh Bến Tre trên tổng số ca khảo sát và số ca nghi nhiễm lần lượt là 11,32% và 45,65%. Tỷ lệ mắc bệnh không phụ thuộc vào giới tính, độ tuổi, và phương thức nuôi. Kết quả xét nghiệm *E. canis* bằng phương pháp PCR cho thấy 5 mẫu máu chó lấy tại tỉnh Bến Tre đều dương tính với *E. canis*. So sánh mức tương đồng về trình tự gen và trình tự amino acid của gen 16S rRNA trong 5 mẫu nhiễm *E. canis* tại tỉnh Bến Tre với các chủng *E. canis* trong khu vực và trên thế giới cho thấy tuy có sự sai khác về trình tự gen nhưng mức độ tương đồng về trình tự amino acid thì lại rất cao, các chủng *E. canis* này nằm cùng một nhánh với chủng *E. canis* ở Ấn Độ và Thái Lan. Tỷ lệ chó điều trị khỏi bệnh do *E. canis* đạt 82,86%; tỷ lệ không khỏi bệnh là 14,29% và tỷ lệ chết là 2,85%.

Từ khoá: *Ehrlichia canis*, tình hình nhiễm, đặc điểm di truyền, điều trị, tỉnh Bến Tre.

The prevalence, genetic characteristics and treatment efficiency of intracellular parasitic disease caused by *Ehrlichia canis* in dogs in Ben Tre province

Le Huu Phuoc, Nguyen Van Vui

SUMMARY

Intracellular parasitic disease caused by *Ehrlichia canis* is common and has a significant impact to the health and mortality of dogs. The objective of this research was to determine the prevalence, genetic characteristics, and treatment efficacy for *E. canis* in dogs in Ben Tre province. The result of study using blood smear staining method showed that the percentage of dogs infected with *E. canis* in Ben Tre province, out of the total surveyed cases and suspected cases, was 11.32% and 45.65%, respectively. The infection rate of dog was not depend on gender, age, or rearing method. PCR test results indicated that all 5 samples collecting in Ben Tre province were positive with *E. canis*. Comparing the similarity level of gene sequence and amino acid sequence of 16S rRNA gene in 5 *E. canis* infected samples in Ben Tre province with *E. canis* strains in the region and in the world showed that although there were differences in gene sequence, but the similarity of amino acid sequence was very high, these *E. canis* strains belonged to the same branch with the *E. canis* strains in India and in Thailand. The recovery dog rate from *E. canis* was 82.86%, the non-recovery rate was 14.29%, and the mortality rate was 2.85%.

Keywords: *Ehrlichia canis*, prevalence, genetic characteristics, treatment, Ben Tre province.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của ngành chăn nuôi Việt Nam năm 2021, cả nước có 10.978.603 con chó, riêng vùng đồng bằng sông Cửu Long có 1.857.652 con; chiếm 16,92%. Trong khu vực đồng bằng sông Cửu Long tính đến tháng 1 năm 2021, Bến Tre là tỉnh có số lượng chó lớn nhất với 391.906 con. Tuy nhiên, do điều kiện đặc thù của tỉnh Bến Tre nên một số giống chó ngoại chưa thể thích nghi được. Việc nghiên cứu về bệnh của chó chưa được quan tâm đúng mức, cùng với các bệnh truyền nhiễm như bệnh Ca-rê, bệnh parvo, leptospirosis, bệnh dại... thì bệnh ký sinh trùng cũng là nhóm bệnh thường gặp và đáng được quan tâm trên đàn chó. Trong đó có nhiều loài ký sinh đường máu gây tác hại lớn cho chó. Một trong những bệnh ký sinh trùng đường máu đáng lo ngại hiện nay là ehrlichiosis. Bệnh này do ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* gây ra. Căn bệnh này được Donatien và Lestoquard xác định ban đầu ở Algeria vào năm 1935. Theo Ndip và cs. (2005), bệnh này là một bệnh quan trọng ở chó và có phân bố trên toàn thế giới. Chó thường có các triệu chứng yếu ớt, lờ đờ, chán ăn, giảm trọng lượng và có xu hướng xuất huyết. Nếu không được điều trị kịp thời, có thể dẫn đến tử vong (Gianopoulos và cs., 2016; Mathios và cs., 2019). Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam có rất ít nghiên cứu về sự lưu hành, tỷ lệ mắc bệnh cũng như hiệu quả trong việc điều trị bệnh do ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* gây ra. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tình hình nhiễm, đặc điểm di truyền và hiệu quả điều trị bệnh ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* trên chó tại tỉnh Bến Tre.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Động vật nghiên cứu

Tất cả chó bị nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* bao gồm: chó địa phương và chó lai; chó được nuôi thả rông và nuôi nhốt; chó dưới 6 tháng, từ 6 đến dưới 12 tháng, và trên 12 tháng tuổi tại tỉnh Bến Tre.

Chỉ lấy máu xét nghiệm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* trong những trường hợp nghi nhiễm *Ehrlichia canis* với các biểu hiện lâm sàng của bệnh.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian thực hiện nghiên cứu: từ ngày 3 tháng 11 năm 2021 đến ngày 2 tháng 11 năm 2022.

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng khám Thú y Bến Tre - TP. Bến Tre.

Thực hiện xét nghiệm PCR mẫu máu để xác định chủng ký sinh nội bào tại Công ty Cổ phần Phù Sa GENOMICS - TP. Cần Thơ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nhuộm tiêu bản máu xác định *Ehrlichia canis*

Nhuộm tiêu bản máu bằng bộ dung dịch thuốc nhuộm Diff-quick. Dàn máu mỏng và để khô tự nhiên. Sau đó, mẫu được cố định bằng methanol phủ kín lên mẫu và để tiêu bản khô. Sau khi đã cố định thì nhuộm trong dung dịch eosin trong vòng 20-30 giây và rửa lại bằng nước cất trong 10 giây. Tiếp theo, nhuộm trong dung dịch xanh methylen trong vòng 15-20 giây và rửa lại bằng nước cất trong 10 giây. Tiêu bản được để khô hoàn toàn trong không khí trước khi quan sát dưới kính hiển vi.

Định danh ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* dựa vào: hình dạng, kích thước, màu sắc và tế bào máu bị nhiễm so sánh với hình vẽ, ảnh đối chứng theo mô tả của tác giả Ángel và cs. (2015).

2.3.2. Xét nghiệm nhanh

Sử dụng bộ xét nghiệm nhanh của công ty Shenzhen Zhenrui Biotechnology (Trung Quốc). Bộ xét nghiệm nhanh được thiết kế để phát hiện kháng thể *Ehrlichia canis* trong toàn bộ máu, huyết thanh hoặc huyết tương. Kết quả hiển thị trên que xét nghiệm là dương tính nếu xuất hiện cả hai vạch tại vị trí T và C với màu đỏ rượu vang.

2.3.3. Xét nghiệm PCR

Mẫu máu được chọn xét nghiệm PCR là mẫu có kết quả dương tính trong cả 2 phương pháp xét nghiệm nhanh và nhuộm tiêu bản máu (chọn điển hình 5 mẫu). Mẫu máu có chất kháng đông

sẽ được bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C (bảo quản tối đa 6 ngày). Sau đó mẫu được gửi về Công ty cổ phần Phù Sa GENOMICS để xét nghiệm PCR. Ghi nhận số liệu về các mẫu được xét nghiệm và căn cứ vào trình tự DNA sẽ so sánh với các chủng *Ehrlichia canis* trên thế giới.

Bảng 1. Một số chủng *Ehrlichia canis* trên thế giới

STT	Tên gen	Tác giả	Năm	Quốc gia	Độ dài gen (bp)
1	MF789353	Santamaria	2018	Panama	379
2	KY434112.1	Daramola và cs.	2021	Ấn Độ	416
3	OP268420	Lira-Amaya và cs.	2022	Mexico	392
4	KX165355.1	Silva và cs.	2010	Brazil	366
5	MK138376	Pesapane và cs.	2018	Colombia	1.358
6	AB287435	Yamaguchi và cs.	2009	Thái Lan	403
7	EU106856	Hsieh	2010	Đài Loan	1.623
8	MW412717	Lu và cs.	2022	Trung Quốc	1.256
9	MZ191505.1	Hega và cs.	2020	Ai Cập	310
10	JF429693.1	Nazari và cs.	2013	Malaysia	744
11	MH686052.1	Chien và cs.	2018	Việt Nam	513
12	MH686051.1	Chien và cs.	2018	Việt Nam	513
13	MH142920.1	Aktas và cs.	2018	Thổ Nhĩ Kỳ	332
14	KR232557.1	M'Ghirbi và cs.	2016	Tunisia	406
15	OK273826	Debbarma và cs.	2021	Ấn Độ	416

2.3.4. Đánh giá hiệu quả điều trị *Ehrlichia canis* trên chó tại tỉnh Bến Tre

Chó được điều trị là chó đã xét nghiệm máu theo phương pháp nhuộm tiêu bản máu và phương pháp xét nghiệm nhanh có kết quả dương tính với *Ehrlichia canis*. Tiến hành điều trị bằng 1 trong 2 loại thuốc có thành phần doxycycline là Vibravet 100 Paste 2,5g (1 tube cho 50kg thể trọng) và N.L. DOXY (1 viên cho 10kg thể trọng). Sau 28 ngày điều trị, chó sẽ được xét nghiệm các chỉ tiêu sinh lý máu và nhuộm tiêu bản máu để đánh giá hiệu quả điều trị.

Quá trình điều trị được đánh giá là khỏi bệnh khi chó không còn các dấu hiệu lâm sàng của bệnh, các chỉ số sinh lý máu quay về lại giới hạn bình thường và nhuộm tiêu bản máu không phát

hiện phôi dậu của *Ehrlichia canis* trong mẫu máu. Kết quả ghi nhận không khỏi bệnh khi chó không giảm các triệu chứng lâm sàng và vẫn phát hiện phôi dậu *Ehrlichia canis* trong mẫu máu. Chó tử vong được xác định chết trong lúc điều trị do *Ehrlichia canis*.

2.3.5. Xử lý số liệu

Tất cả các số liệu quan sát được ghi nhận, nhập số liệu và tính tỷ lệ nhiễm bằng phần mềm Microsoft Excel. So sánh tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng máu bằng Chi-square của phần mềm thống kê Minitab 16.0. Trình tự nucleotide của ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* được xử lý bằng phần mềm MEGA X để so sánh mức độ tương đồng về trình tự các nucleotide và amino acid cũng như cây di truyền phả hệ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tình hình nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis*

3.1.1. Kết quả tỷ lệ nhiễm chung của ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis*

Bảng 2. Tỷ lệ nghi nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* tại tỉnh Bến Tre

Số mẫu khảo sát (con)	Số mẫu nghi nhiễm (con)	Tỷ lệ nghi nhiễm (%)
927	230	24,81

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo phương pháp xét nghiệm

Phương pháp xét nghiệm	SMKS (con)	SMNN (con)	SMN (con)	TLN (%) theo SMKS	TLN (%) theo SMNN
Xét nghiệm nhanh	927	230	165	17,80 ^a	71,74 ^a
Nhuộm tiêu bản	927	230	105	11,32 ^b	45,65 ^b

Ghi chú: SMKS: Số mẫu khảo sát; SMNN: Số mẫu nghi nhiễm; SMN: Số mẫu nhiễm; TLN: Tỷ lệ nhiễm; a, b trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Trong tổng số 927 con chó được mang đến khám lần đầu, ghi nhận 230 trường hợp có các triệu chứng lâm sàng giống bệnh do *Ehrlichia canis* gây ra. Thực hiện phương pháp xét nghiệm nhanh đã ghi nhận tỷ lệ nhiễm theo số mẫu khảo sát và số mẫu nghi nhiễm lần lượt là 17,80% và 71,74%. Trong khi đó, tỷ lệ này thấp hơn nhiều so với khi thực hiện bằng phương pháp nhuộm tiêu bản máu. Cụ thể, phương pháp nhuộm tiêu bản máu có số mẫu nhiễm thấp hơn so với phương pháp xét nghiệm nhanh là 60 trường hợp và ghi nhận tỷ lệ nhiễm theo số mẫu khảo sát 11,32% và số mẫu nghi nhiễm là 45,65%. Kết quả trên cho thấy sự khác biệt giữa 2 phương pháp xét nghiệm về tỷ lệ nhiễm là rất có ý nghĩa thống kê (P<0,001). Trong đó có 65 (28,26%) mẫu dương tính với phương pháp xét nghiệm nhanh nhưng lại âm tính với phương pháp nhuộm tiêu bản máu, ngược lại có 5 (2,17%) mẫu âm tính với phương pháp xét nghiệm nhanh nhưng lại dương tính với phương pháp nhuộm tiêu bản máu. Sự khác biệt này có thể do những con chó này đã mắc bệnh trước đó và đã được điều trị khỏi ở phòng khám khác nên vẫn còn kháng thể nhưng mầm bệnh đã không còn trong cơ thể.

Khảo sát những con chó có biểu hiện bệnh lâm sàng được thăm khám tại phòng khám thú y Bến Tre đã sàng lọc được các cá thể có triệu chứng lâm sàng nghi nhiễm *Ehrlichia canis* và được thể hiện qua bảng 2 và 3.

3.1.2. Tình hình nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo lứa tuổi chó

Trong tổng số 230 mẫu dương tính với phương pháp nhuộm tiêu bản máu, tỷ lệ nhiễm *Ehrlichia canis* tại tỉnh Bến Tre theo tuổi với ba giai đoạn khác nhau từ 0-6 tháng tuổi, 6-12 tháng tuổi và trên 12 tháng tuổi được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo lứa tuổi

Tuổi (tháng)	SMKT (con)	SMN (con)	TLN (%)
0-6	63	25	55,55
6-12	73	31	42,46
Trên 12	94	49	52,13

Ghi chú: SMKT: Số mẫu kiểm tra, SMN: Số mẫu nhiễm, TLN: Tỷ lệ nhiễm

Khảo sát được chia thành 3 nhóm tuổi khác nhau, kết quả cho thấy nhóm từ 0-6 tháng tuổi nhiễm với tỷ lệ cao nhất (55,55%), tiếp theo là nhóm trên 12 tháng tuổi (52,13%), thấp nhất là nhóm từ 6-12 tháng tuổi (42,46%). Tuy có sự khác nhau về tỷ lệ nhiễm nhưng khác biệt không ý nghĩa thống kê (P=0,282>0,05).

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Malik và cs. (2018), qua phân tích dữ liệu cho thấy tuổi của động vật không có mối liên hệ đáng kể ($P>0,05$) với sự hiện diện của *Ehrlichia canis*. Gal và cs. (2007) cũng cho thấy không có mối liên hệ nào giữa độ tuổi và tỷ lệ nhiễm *Ehrlichia canis*.

3.1.3. Tình hình nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo giới tính

Bảng 5. Tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo giới tính

Giới tính	SMKT (con)	SMN (con)	TLN (%)
Đực	97	47	48,45
Cái	133	58	43,61

Ghi chú: SMKT: Số mẫu kiểm tra, SMN: Số mẫu nhiễm, TLN: Tỷ lệ nhiễm

Kết quả cho thấy chó đực có tỷ lệ nhiễm 48,45%; cao hơn chó cái (43,61%) nhưng không có khác biệt về mặt thống kê ($P=0,466>0,05$). Một nghiên cứu khác của Marta và cs. (2005) đã thực hiện nghiên cứu trên 28 con chó đực trong đó có 3 con chó đã thiến, 18 con chó cái trong đó có 2 con đã triệt sản. Kết quả cho thấy không có mối quan hệ giữa giới tính và tỷ lệ nhiễm do *Ehrlichia canis*. Nghiên cứu của Harrus và cs. (1997) cũng cho rằng tỷ lệ nhiễm giữa giống đực và cái là không có khác biệt ($P>0,05$) với con đực có tỷ lệ nhiễm là 70% và con cái là 60%. Chó đực có tỷ lệ mắc bệnh thường cao hơn chó cái là do vào mùa giao phối chó đực thường có phạm vi hoạt động rộng hơn chó cái.

3.1.4. Tình hình nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo phương thức nuôi

Tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* tại tỉnh Bến Tre theo phương thức nuôi dựa trên phương pháp nhuộm tiêu bản máu được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo phương thức nuôi

Phương thức nuôi	SMKT (con)	SMN (con)	TLN (%)
Nhốt	105	44	41,9
Thả	125	61	49,8

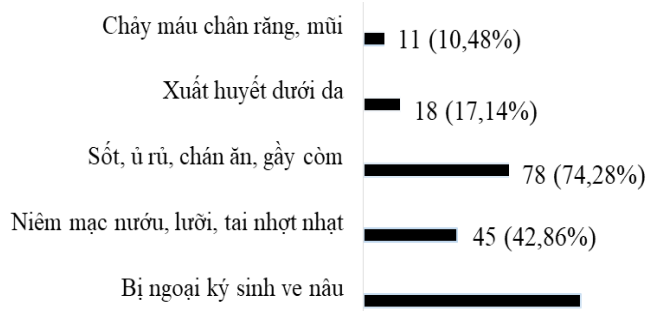
Ghi chú: SMKT: Số mẫu kiểm tra, SMN: Số mẫu nhiễm, TLN: Tỷ lệ nhiễm

Phương thức nuôi được đánh giá trên 2 hình thức nuôi thả và nuôi nhốt. Nuôi thả có tỷ lệ nhiễm cao hơn nuôi nhốt (49,8% so với 41,9%). Tuy nhiên 2 phương thức nuôi không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P=0,296>0,05$). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Trần Ngọc Bích và cs. (2020), cũng trong một nghiên cứu khác không có sự khác biệt trong nhiễm bệnh do *Ehrlichia canis* giữa các con chó hoang và các con chó được lấy mẫu ở phòng khám tại Malaysia (Mojgan và cs., 2013).

3.1.5. Tần suất xuất hiện các triệu chứng thường gặp trên chó bị nhiễm *Ehrlichia canis*

Tần suất xuất hiện các triệu chứng thường gặp trên chó bị bệnh do *Ehrlichia canis* gây ra được thể hiện qua hình 1.

Hình trên cho thấy tỷ lệ chó mắc bệnh có tiền sử hoặc từng bị ngoại ký sinh trùng là ve nâu chiếm 100%; các triệu chứng như sốt, ủ rũ, ăn ít hoặc bỏ ăn, ốm yếu, gầy còm chiếm tỷ lệ khá cao (74,28%); màu sắc niêm mạc nhợt nhạt ở lưỡi, tai, mắt ghi nhận có 45 trường hợp (chiếm 42,86%); triệu chứng xuất huyết dưới da tại các vị trí như bụng, nách, bẹn ghi nhận 17,14%; cuối cùng biểu hiện bệnh lâm sàng nặng là chảy máu mũi, chảy máu chân răng ghi nhận ở 11 trường hợp chiếm 10,48%. Kết quả này có khác biệt với nghiên cứu của Konstantina và cs. (2013) khi gây bệnh thực nghiệm cho 14 con chó. Các triệu chứng lâm sàng được ghi nhận bao gồm sốt (92,9%), sờ thấy lách to (71,4%), hạch to (57,1%), chán ăn (28,6%), trầm cảm (28,6%), xanh xao (14,3%) và chấm xuất huyết niêm mạc (7,1%).



Hình 1. Tần suất xuất hiện các triệu chứng thường gặp ở chó do Ehrlichia canis

3.1.6. Kết quả xét nghiệm sinh lý máu của chó bị nhiễm Ehrlichia canis

Bảng 7. Kết quả xét nghiệm sinh lý máu của chó bị nhiễm Ehrlichia canis (n=105)

Chỉ số sinh lý máu	Kết quả so với khoảng tham chiếu	Số lượng (con)	Tỷ lệ (%)
Bạch cầu	Tăng	17	16,19
	Bình thường	66	62,86
	Giảm	22	20,95
Hồng cầu	Tăng	1	0,95
	Bình thường	25	23,81
	Giảm	79	75,24
Tiểu cầu	Tăng	0	0,00
	Bình thường	21	20,00
	Giảm	84	80,00

Khoảng tham chiếu số lượng bạch cầu 6,0-17,0 ngàn/mm³; hồng cầu 5,50-8,50 triệu/mm³; tiểu cầu 117-460 ngàn/mm³. Nếu cao hơn khoảng tham chiếu là tăng, trong khoảng tham chiếu là bình thường, thấp hơn khoảng tham chiếu là giảm.

Kết quả cho thấy số mẫu có số lượng bạch cầu tăng, bình thường và giảm lần lượt là 17 (16,19%), 66 (62,86%) và 22 (20,95%); số

lượng hồng cầu ghi nhận tăng, bình thường, giảm lần lượt là 1 (0,95%), 25 (23,81%) và 79 (75,24%); đặc biệt về số lượng tiểu cầu không ghi nhận trường hợp nào tăng, số lượng tiểu cầu bình thường là 21 (20%) và số lượng dưới khoảng tham chiếu là rất cao chiếm 84 (80%). Kết quả cho thấy số lượng bạch cầu và hồng cầu giảm phù hợp với nhận định số lượng bạch cầu và hồng cầu cũng có thể giảm, mặc dù những thay đổi này có thể tương đối nhẹ và khó nhận thấy trong chẩn đoán cận lâm sàng (Waner và cs., 1997). Giảm tiểu cầu trong giai đoạn cấp tính thường kèm theo thiếu máu nhẹ và số lượng bạch cầu giảm nhẹ so với trước nhiễm bệnh (Harrus và cs., 1998; Waner và cs., 1997).

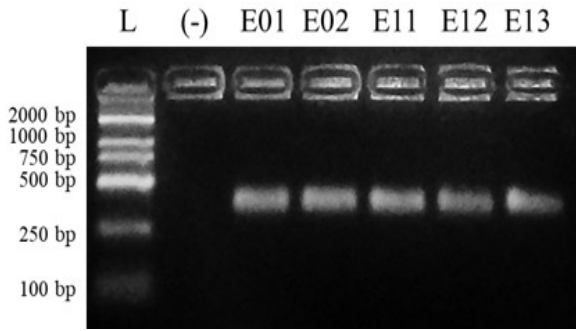
3.2. Kết quả đặc điểm di truyền của ký sinh trùng nội bào Ehrlichia canis

3.2.1. Phân tích trình tự gen 16S rRNA của ký sinh trùng nội bào Ehrlichia canis

Phân tích xác định trình tự gen 16S rRNA của Ehrlichia canis được thu nhận từ các mẫu thực địa tại tỉnh Bến Tre sử dụng đoạn môi (Dawson và cs., 1994; Enara và cs., 2004) được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8. Trình tự đoạn môi được sử dụng trong phân tích trình tự gen 16S rRNA của ký sinh trùng nội bào Ehrlichia canis

Tên trình tự	Trình tự nucleotide (5'-3')	Chiều dài (bp)	Ghi chú
ECC	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC	478	PCR bước 1
ECB	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA		
CANIS	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA		
HE3	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT	389	PCR bước 2



Hình 2. Kết quả điện di PCR của các mẫu Ehrlichia canis trong nghiên cứu

L: kích thước 100, 250, 500, 750, 1000 và 2000 bp; giếng (-): đối chứng âm; giếng E01, E02, E11, E12, E13: các mẫu dương tính.

Các kết quả giải trình tự thu được từ 5 mẫu nghiên cứu (dương tính với Ehrlichia canis theo

phương pháp nhuộm tiêu bản máu) được sử dụng để phân tích các đặc điểm phân tử và để thiết lập cây phát sinh loài. Hình ảnh kết quả điện di cho thấy sản phẩm của PCR có một mẫu là âm tính (đối chứng âm), 5 mẫu còn lại có hình ảnh là một băng đơn, sáng, rõ, có chất lượng tốt (hình 1). Trình tự gen 16S rRNA của ký sinh trùng nội bào Ehrlichia canis thu được có kích thước 391 bp.

3.2.2. Phân tích mức độ tương đồng về trình tự DNA của các chủng tại tỉnh Bến Tre

Phần mềm MEGA-X được sử dụng để so sánh mức độ tương đồng về trình tự gen và trình tự amino acid của các mẫu được ghi nhận dương tính bằng phương pháp PCR với các chủng Ehrlichia canis trong khu vực và các nước trên thế giới.

Bảng 9. Bảng so sánh mức độ tương đồng trình tự gen của các chủng được phân lập tại tỉnh Bến Tre với các chủng trên thế giới

Chủng	Quốc gia	Mức độ tương đồng gen					Mức độ tương đồng amino acid				
		BT-E13	BT-E12	BT-E11	BT-E02	BT-E01	BT-E13	BT-E12	BT-E11	BT-E02	BT-E01
BT-E13											
BT-E12		99,72					100				
BT-E11		99,72	99,72				100	99,06			
BT-E02		100	99,72	100			100	100	100		
BT-E01		99,15	99,15	99,72	99,15		99,04	98,11	99,05	99,05	
MH686051	Việt Nam	99,70	99,70	99,70	100	99,70	100	100	100	100	100
MH686052	Việt Nam	99,70	99,70	99,70	100	99,70	100	100	100	100	100
MW412717	Trung Quốc	99,01	99,01	99,01	99,34	99,00	100	100	100	100	100
EU106856	Đài Loan	99,44	99,44	99,43	99,72	98,59	100	100	100	100	100
JF429693	Malaysia	99,44	99,44	99,43	99,72	98,59	100	99,07	99,06	100	98,11
AB287435	Thái Lan	99,44	99,44	99,43	99,72	98,59	100	99,07	99,06	100	98,11
OK273826	Ấn Độ	100	100	100	100	99,43	100	100	100	100	99,05
KY434112	Ấn Độ	99,44	99,44	99,43	99,72	98,59	100	99,07	99,06	100	98,11
KX165355	Brazil	99,71	99,71	99,71	99,71	98,83	100	99,03	99,02	100	98,04
MF789353	Panama	99,72	99,72	99,72	99,72	98,87	100	99,07	99,06	100	98,11
KR232557	Tunisia	99,44	99,44	99,43	99,72	98,59	100	99,07	99,06	100	98,11
MH142920	Thổ Nhĩ Kỳ	98,76	98,77	98,76	98,77	97,83	97,92	96,92	96,89	97,94	95,83
MK138376	Colombia	99,44	99,44	99,43	99,72	98,59	100	99,07	99,06	100	98,11
MZ191505	Ai Cập	99,54	99,54	99,54	100	99,53	100	100	100	100	100
OP268420	Mexico	99,72	99,72	99,72	99,72	98,87	100	99,07	99,06	100	98,11

Nhìn chung, các chủng ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* ở tỉnh Bến Tre có mức tương đồng về trình tự gen khá cao với các chủng khác trên thế giới (từ 97,83 đến 100%). Các chủng BT-E13, BT-E12 và BT-E11 có tỷ lệ tương đồng từ 98,76-100%. Các chủng BT-E13, BT-E12 và BT-E11 có mức độ tương đồng ở các nước trong khu vực Đông Nam Á như Thái Lan, Malaysia. Chủng BT-E02 có độ tương đồng rất cao với hai chủng ở Việt Nam là MH686051, MH686052 và có mức độ tương đồng so với các nước trong khu vực Đông Nam Á cao hơn so với khu vực khác. Điều này cho thấy các chủng thu nhận tại thực địa ở Bến Tre có nguồn gốc từ các nước trong khu vực châu Á.

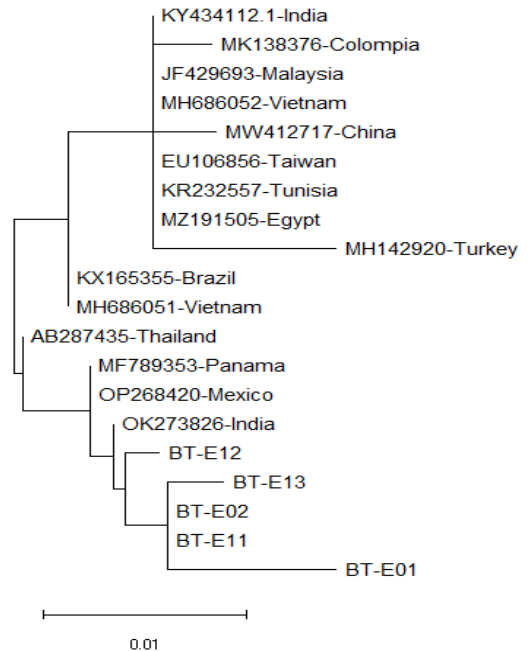
Tuy trình tự gen có khác biệt nhưng các amino acid được mã hoá bởi gen 16S rRNA của các chủng thu được tại tỉnh Bến Tre có mức độ tương đồng 100% với các chủng MH686051 (Việt Nam), MH686052 (Việt Nam), MW412717 (Trung Quốc), EU106856 (Đài Loan), OK273826 (Thái Lan) và MZ191505 (Ai Cập). Trong 5 mẫu thu được khi so sánh với các chủng trên thế giới có 2 chủng là BT-E13 và BT-E02 là có trình tự amino acid mã hoá có mức độ tương đồng nhiều nhất với 13/15 mẫu có mức độ tương đồng 100%. Tiếp theo là chủng BT-E11 và BT-E12 với 6/15 mẫu có mức độ tương đồng 100%. Đối với mẫu BT-01, có 5/16 mẫu khi so sánh có mức độ tương đồng 100%. Khi so sánh với hai chủng tại Việt Nam, tuy mức độ tương đồng về trình tự gen từ 99,70-100% nhưng trình tự amino acid thì có độ tương đồng rất cao, đạt 100%.

Qua bảng so sánh mức độ tương đồng về trình tự gen và trình tự amino acid của gen 16S rRNA trong 5 mẫu thu thập tại tỉnh Bến Tre với các chủng trong khu vực và trên thế giới, cho thấy tuy có sự sai khác trong trình tự gen nhưng mức độ tương đồng của các amino acid là cao. Điều này cho thấy tuy có sự sai khác về trình tự gen giữa cá chủng nhưng không có nhiều sai khác về

chức năng của gen 16S rRNA khi mã hoá các amino acid.

3.2.3 Kết quả xây dựng cây di truyền phả hệ

Để xác định phân nhánh ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* tại tỉnh Bến Tre sử dụng phần mềm MEGA X để phân tích và vẽ cây phả hệ. Kết quả phân lập được trình bày trong hình 3.



Hình 3. Xây dựng cây di truyền phả hệ dựa vào trình tự nucleotide gen 16S rRNA

Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA X với phương pháp ước lượng hợp lý cực đại (Maximum Likelihood method) và hệ số Bootstrap 1.000 lần lặp lại.

Kết quả xây dựng cây di truyền dựa trên 5 chủng thực địa tại tỉnh Bến Tre và 15 chủng trên GenBank cho thấy tất cả các chủng ở tỉnh Bến Tre cùng chung một nhánh. Trên nhánh này cũng có một số nhánh cùng chung khu vực địa lý như OK273826 ở Ấn Độ, AB287435 ở Thái Lan. Hai chủng khác được phân lập trước đó tại miền Bắc Việt Nam là MH686051, MH686052 thì nằm ở một phân nhánh khác trong cây di truyền phả hệ.

Các kết quả PCR cho thấy khẳng định sự lưu hành của các chủng *Ehrlichia canis* ở tỉnh Bến Tre. Các chủng thu được tại thực địa có những thay đổi nhất định so với các chủng *Ehrlichia canis* được xác định lưu hành trước đây tại miền Bắc Việt Nam. Tuy nhiên, các amino acid được mã hoá bởi gen 16S rRNA lại tương đồng rất cao (100%).

3.3. Kết quả đánh giá hiệu quả điều trị ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis*

Những con chó được xác định nhiễm *Ehrlichia canis* bằng phương pháp nhuộm tiêu bản máu được điều trị bằng 2 loại thuốc là N.L.DOXY và Vibravet được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. Kết quả điều trị bệnh do *Ehrlichia canis* bằng thuốc N.L.DOXY và Vibravet

Kết quả điều trị	Điều trị chung (n=105)		N.L.DOXY (n=66)		Vibravet (n=39)	
	SLĐT (con)	TLĐT (%)	SLĐT (con)	TLĐT (%)	SLĐT (con)	TLĐT (%)
Khỏi bệnh	87	82,86	54	81,82	33	84,62
Không khỏi bệnh	15	14,29	11	16,67	4	10,56
Chết	3	2,85	1	1,51	2	5,13

Ghi chú: SLĐT: Số lượng điều trị, TLĐT: Tỷ lệ điều trị

Bảng 10 cho thấy trong 105 chó mắc bệnh do *Ehrlichia canis* được điều trị bằng hai loại thuốc có thành phần doxycycline, kết quả điều trị khá cao (82,86%; 87/105). Trong khi đó tỷ lệ không khỏi bệnh và chết khá thấp ở mức lần lượt là 14,29% (15/105) và 2,85% (3/105). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Đình Chuẩn và cs. (2020) khi điều trị bằng doxycycline cho 60 con chó tại thành phố Hồ Chí Minh với tỷ lệ khỏi bệnh là 83,33%. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu khác của McClure và cs. (2010). Tuy nhiên, việc tiếp xúc liên tục với vector truyền bệnh là ve và do không được điều trị kịp thời bệnh do *Ehrlichia canis* mạn tính có thể gặp ở chó (Wise và Tarlinton, 2012). Ngoài ra, việc điều trị được thực hiện tại nhà chủ thú cưng nên việc chăm sóc, điều trị thuốc không đúng theo liệu trình, kể phát các bệnh nhiễm trùng thứ phát, nhiễm cùng lúc nhiều loại ký sinh trùng máu cũng ảnh hưởng đến quá trình điều trị. Tuy giữa hai loại thuốc Vibravet và N.L.DOXY có sự khác nhau nhưng đều có tác dụng điều trị như nhau trong điều trị bệnh do *Ehrlichia canis* gây ra (khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $P>0,05$).

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ chó mắc bệnh do ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* theo phương pháp nhuộm tiêu bản máu ở tỉnh Bến Tre trên tổng số ca khảo sát và số ca nghi nhiễm lần lượt là 11,32% và 45,65%. Tỷ lệ mắc bệnh không phụ thuộc vào giới tính, độ tuổi, phương thức nuôi.

Các triệu chứng lâm sàng khi chó mắc bệnh do *Ehrlichia canis* như chảy máu chân răng, xuất huyết dưới da, sốt, ủ rũ, chán ăn, gầy còm, niêm mạc nướu, lưỡi nhợt nhạt, và tiền sử hoặc đang bị nhiễm ve nâu. Kết quả kiểm tra cận lâm sàng cho thấy 80,95% chó có số lượng tiểu cầu suy giảm.

Kết quả PCR cho thấy chó nhiễm bệnh đều dương tính với *Ehrlichia canis*. Các chủng *Ehrlichia canis* thu được có mức tương đồng cao với nhau và với trên thế giới về trình tự DNA và amino acid.

Tỷ lệ điều trị khỏi bệnh do ký sinh trùng nội bào *Ehrlichia canis* đạt cao với 82,86% khi điều trị bằng thuốc có thành phần doxycycline; tỷ lệ không khỏi bệnh chiếm 14,29% và tỷ lệ chết thấp với 2,85%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ángel Sainz, Xavier Roura, Guadalupe Miró, Agustín Estrada-Peña, Barbara Kohn, Shimon Harrus, & Laia Solano-Gallego, 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(1), 75. doi:10.1186/s13071-015-0649-0.
2. Aktas, 2018. *Ehrlichia canis* isolate DB63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH142920.1>
3. Chien, 2018. *Ehrlichia canis* clone M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH686052.1>
4. Chien, 2018. *Ehrlichia canis* clone L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH686051.1>
5. Donatien, A., & Lestoquard, F., 1937. State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 15: 142–187.
6. Dawson J E, Stallknecht D E, Howerth E W, Warner C, Biggie K, Davidson W R, Lockhart J M, Nettles V F, Olson J G, & Childs J E., 1994. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11): 2725-8.
7. Debbarma, 2021. *Ehrlichia canis* isolate India 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OK273826>
8. Daramola, O.O., Takeet, M.I., Oyewusi, I.K., & Oyekunle, M.A., 2021. *Ehrlichia canis* isolate India 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OK273826.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=92&RID=KAH5JUUR01N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OK273826.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=92&RID=KAH5JUUR01N)
9. Enara Aguirrea, Angel Sainza, Susana Dunnerb, Inmaculada Amusataguia, Lissette Lópezc, Fernando Rodríguez-Francoa, Inés Luacesc, Oscar Cortésb, & Miguel A. Tesourod, 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 125(3-4): 365-372.
10. Gal, A., Harrus, S., Arcoh, I., Lavy, E., Aizenberg, I., Mekuzas-Yisaschar, Y., & Baneth, G., 2007. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week old dog. *Canadian Veterinary*, 48: 619–622.
11. Harrus, S., Waner, T., & Bark, H., 1997. Canine monocytic ehrlichiosis update. *Compendium for Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 19: 431–444.
12. Harrus, S., Ofri, R., Aizenberg, I., & Waner, T., 1998. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Veterinary Parasitology*, 78: 155–160.
13. Hsieh, 2010. *Ehrlichia canis* strain TWN1 16S ribosomal RNA gene, complete. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU106856.1>
14. Hega, 2020. *Ehrlichia canis* isolate Tick Vet CU 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MZ191505.1>
15. Konstantina Theodorou, Mathios E Mylonakis, Victoria I Siarkou, Leonidas Leontides, Alexander F Koutinas, Christos K Koutinas, Maria Kritsepi-Konstantinou, George Batzias, Eugenia Flouraki, Osnat Eyal, Vassilios Kontos, & Shimon Harrus, 2013. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access*, doi:10.1093/jac/dkt053.
16. Lira-Amaya, 2022. *Ehrlichia canis* isolate Morelos 27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OP268420>
17. Lu, 2022. *Ehrlichia canis* isolate Baise41 16S

- ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MW412717.1>
18. Malik, M.I, Qamar, M., Ain, Q., Hussain, M.F., Dahmani, M., Ayaz, M., Mahmood, A.K., Davoust, B., Shaikh, R.S., & Iqbal, F., 2018. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). *Veterinary Medicine Science*, 4(2):126-132.
 19. Marta Leiva, C. Naranjo & M. T. Peña, 2005. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. *Veterinary Ophthalmology*, 8(6): 387-393.
 20. Mathios E Mylonakis, Shimon Harrus, & Edward B Breitschwerdt, 2019. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *The Veterinary Journal*, 246:45-53.
 21. McClure, J.C., Crothers, M.L., Schaefer, J.J., Stanley, P.D., Needham, G.R., Ewing, S.A., & Stich, R.W., 2010. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 5012–5020.
 22. Mojgan Nazari, Sue Yee Lim, Mahira Watanabe, Reuben S. K. Sharma, Nadzariah A. B. Y. Cheng, & Malaika Watanabe, 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs in Malaysia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(1): e1982. doi:10.1371/journal.pntd.0001982.
 23. M'Ghirbi, 2016. *Ehrlichia canis* isolate TM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KR232557.1>
 24. Nazari, 2013. *Ehrlichia canis* MSIA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JF429693.1>
 25. Nguyễn Đình Chuẩn, Nguyễn Khánh Thuận, Lê Tuyết Đàng, Nguyễn Thị Thuý Quỳnh & Lý Thị Liên Khai, 2020. Bệnh do *Ehrlichia canis* trên chó ở một số cơ sở thú y tại thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, tập XXVIII số 4-2021.
 26. Ndip, RN Ndip, SN Esemu, VL Dickmu, EB Fokam, DH Walker, & JW McBride, 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Veterinary Microbiology*, 111(1-2): 59-66.
 27. Pesapane, 2018. Uncultured *Ehrlichia* sp. clone canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK138376.1>
 28. Silva, 2010. *Ehrlichia* sp. isolate A167C23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX165355.1>
 29. Santamaria, A.M., 2018. *Ehrlichia canis* isolate EH01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MF789353.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=KAAC6AP201N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MF789353.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=KAAC6AP201N)
 30. Trần Ngọc Bích, Trần Thị Thảo, Lê Quang Trung, Nguyễn Thị Minh Anh, & Ngô Phú Cường, 2020. Nghiên cứu bệnh do *Ehrlichia canis* trên chó và đánh giá hiệu quả điều trị tại bệnh xá thú y, Đại học Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, tập XXVII số 4-2020.
 31. Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y., & Keysary, A., 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69: 307-317.
 32. Wise, A.E., Tarlinton, & R.E., 2012. Seroprevalence of vector borne diseases in free-roaming dogs in Goa, India. *Veterinary Record*, 170(76). doi: 10.1136/vr.100169.
 33. Yamaguchi, 2009. *Ehrlichia canis* gene for 16S rRNA, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB287435.1>
- Ngày nhận: 21-8-2023
 Ngày phản biện: 25-2-2024
 Ngày đăng: 1-12-2024