

PHÁT HIỆN KÝ SINH TRÙNG MÁU EHRLICHIA Ở CHÓ TẠI HÀ NỘI VÀ HÀ TĨNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH PHẢ HỆ VÀ XÁC ĐỊNH KHOẢNG CÁCH DI TRUYỀN

Nguyễn Thị Hồng Chiên

¹*Bộ môn Ký sinh trùng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Tính cấp thiết

Ehrlichia canis, thuộc chi *Ehrlichia*, họ *Anaplasmataceae*, là vi khuẩn nội bào bắt buộc Gram âm, gây bệnh Ehrlichiosis ở chó và là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm xảy ra trên toàn thế giới, đặc biệt ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (Huang & cs., 2025). *Ehrlichia canis* được truyền qua ve chó nâu có tên gọi là *Rhipicephalus sanguineus* và hướng đích ký sinh trong các tế bào đơn nhân và đại thực bào (Aziz & cs., 2022). Chó bị nhiễm thường sốt cao, nhợt nhạt thiếu máu, xuất huyết điểm ở niêm mạc mắt, mũi, đường sinh dục và các chỉ số huyết học đều giảm (Parashar & cs., 2016). Xác định hình thái học các loài thuộc họ *Anaplasmataceae*, bao gồm cả chi *Ehrlichia* và *Anaplasma* đều dựa vào phương pháp nhuộm Giemsa các mẫu máu và tìm kiếm sự có mặt của chúng trong hồng cầu, bạch cầu đơn nhân và đại thực bào (Parashar & cs., 2016). Việc xác định phân tử các loài *Ehrlichia*, *Anaplasma* và các tác nhân gây bệnh rickettsia khác, như *Neorickettsia* spp. ở ve, động vật và người, thường dựa trên chuỗi 16S đơn lẻ (16S rDNA), hoặc kết hợp với gen protein sốc nhiệt 60 kDa (groEL hoặc HSP60), tiểu đơn vị beta của RNA polymerase (rpoB), citrate synthase (gltA) và trình tự gen protein bề mặt (mps4), trong đó chỉ thị gen 16S thông dụng nhất (Hosseini-Vasoukolaei & cs., 2016; Chien & cs., 2019; Do & cs., 2024). *Ehrlichia canis* được phát hiện và ghi nhận ở Việt Nam những năm 2003 và nhiều chủng đã được xác định bằng sinh học phân tử kể cả sử dụng chỉ thị gen 16S trong những năm gần đây và phát hiện trong nhiều vùng cả nước (Parola & cs., 2003; Chien & cs., 2019; Nguyen & cs., 2019; Do & cs., 2024)

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày định danh và phân tích đặc điểm ký sinh trùng máu *Ehrlichia canis* được phát hiện ở chó trên địa bàn Hà Nội và Hà Tĩnh bằng phương pháp so sánh khoảng cách di truyền và phân tích phả hệ.

Phương pháp nghiên cứu: Mẫu nghiên cứu và tách DNA tổng số

Mẫu bệnh phẩm là máu chống đông chứa ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) của chó bảo quản trong đá khi chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu máu được nhuộm Giemsa (Sigma-Aldrich, USA) và kiểm tra dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 1,000×. Những mẫu phát hiện có vi khuẩn *Ehrlichia* ký sinh hay nghi ngờ được tách DNA tổng số sử dụng bộ kit của hãng Thermo Fisher Scientific Inc. theo hướng dẫn.

Bảng 1. Danh sách chủng và mã GenBank các chủng đơn bào *Ehrlichia* sử dụng trong nghiên cứu phả hệ và quan hệ về loài của các chủng *Ehrlichia* của Việt Nam cùng với các chủng liên quan của họ *Anaplasmataceae*

STT	Loài	Ký hiệu mẫu	Số đăng ký GenBank	Quốc gia/ Ký hiệu
1	<i>Ehrlichia canis</i>	(C5BV)	MH686051	Việt Nam (VN)
2	<i>Ehrlichia canis</i>	(C8BV)	Đang đăng ký	Việt Nam (VN)

3	<i>Ehrlichia canis</i>	(C11HT)	Đang đăng ký	Việt Nam (VN)
4	<i>Ehrlichia canis</i>	(C40HT)	MH686052	Việt Nam (VN)
5	<i>Ehrlichia canis</i>	(E60)	AB723709	Nhật Bản (JP)
6	<i>Ehrlichia canis</i>	(ZKK21)	KP745631	Thổ Nhĩ Kỳ (TR)
7	<i>Ehrlichia canis</i>	(002) ^a	KR920044	Malaysia (MY)
8	<i>Ehrlichia canis</i>	(171)	KC479023	Nam Phi (ZA)
9	<i>Ehrlichia canis</i>	(ECANBkk07)	EU263991	Thái Lan (TH)
10	<i>Ehrlichia canis</i>	(611)	U26740	Israel (IL)
11	<i>Ehrlichia canis</i>	(A)	JX893522	Philippin (PH)
12	<i>Ehrlichia canis</i>	(Madrid)	AY394465	Tây Ban Nha (ES)
13	<i>Ehrlichia</i> sp	(AmHc79)	JX092090	Nga (RU)
14	<i>Ehrlichia</i> sp	(Tajikistan-1)	KM995818	Tajikistan (TJ)
15	<i>Ehrlichia</i> sp	(EH1087)	AY309971	Nhật Bản (JP)
16	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	(Arkansas)	M73222	Mỹ (US)
17	<i>Ehrlichia dumleri</i>	(PEP10)	OM530509	Braxin (BR)
18	<i>Ehrlichia ewingii</i>	(Stillwater)	M73227	Mỹ (US)
19	<i>Ehrlichia hainanensis</i>	(Hainan43)	MT875365	Trung Quốc (CN)
20	<i>Ehrlichia japonica</i>	(HF)	DQ647318	Pháp (FR)
21	<i>Ehrlichia khabarensis</i>	(m3)	KR063138	Nga (RU)
22	<i>Ehrlichia maerkangensis</i>	(M18)	OP764502	Trung Quốc (CN)
23	<i>Ehrlichia minasensis</i>	(UFMG-EV)	NR148800	Braxin (BR)
24	<i>Ehrlichia muris</i>	(AS145)	U15527	Mỹ (US)
25	<i>Ehrlichia phagocytophila</i>	(FG)	M73224	Scotland (GB-SCT)
26	<i>Ehrlichia shimanensis</i>	(TS37)	AB074459	Nhật Bản (JP)
27	<i>Ehrlichia zunyiensis</i>	(CCBF4)	OR104951	Trung Quốc (CN)
28	<i>Rickettsia rickettsii</i>	(Sawtooth)	U11021	Mỹ (US)

Thu nhận đoạn gen 16S bằng PCR, giải trình tự

Đoạn gen 16S được thu nhận bằng PCR sử dụng cặp mồi (Mồi xuôi ERCF: 5' AGTCGAACGGACAATTATTATAGC 3' (Tm=53.8°C) và mồi ngược ERRCR: 5' CGCTTTCGCACCTCAGTGTC 3' (Tm=55.9°C)), được thiết kế dựa trên nucleotide bảo tồn của 100 chuỗi gen 16S có trong Ngân hàng gen. Mỗi phản ứng thể tích 50 µL chứa 25 µL DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.), 2 µL mỗi loại mồi (10 pmol/µL), 2 µL DMSO, 16 µL nước tinh khiết và 3 µL khuôn mẫu (10 ng/µL). PCR được thực hiện với quá trình biến tính ở 94°C trong 5 phút, sau đó là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ 94°C/30 giây, 52°C/30 giây, 72°C trong 2 phút, cuối cùng là 10 phút/72°C/1 chu kỳ. Sản phẩm PCR có độ dài khoảng 510-520 bp.

Phân tích phả hệ và tính toán khoảng cách di truyền

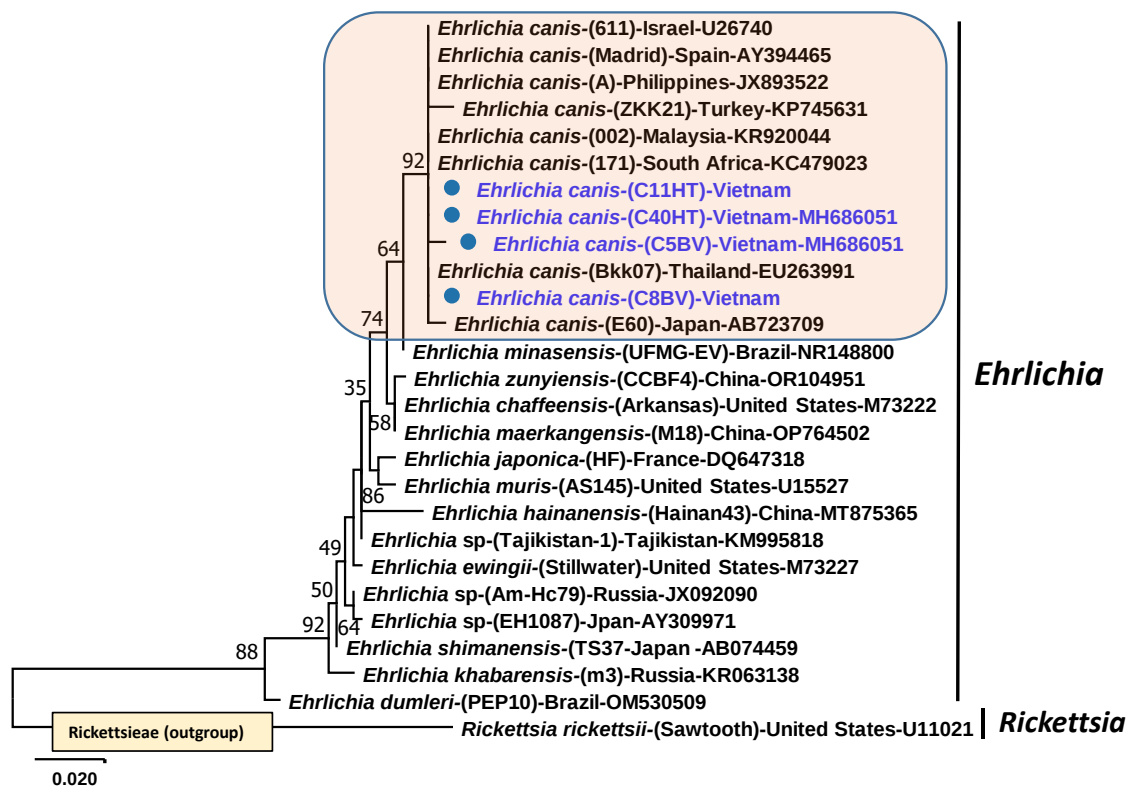
Hai mươi tám chuỗi nucleotide 16S gồm bốn chuỗi từ các mẫu trong nghiên cứu này và 23 chuỗi tham chiếu (chi *Ehrlichia*) và một chuỗi *Rickettsia rickettsii* (họ Rickettsiaceae) làm chủng ngoại hợp (Bảng 1) được đưa vào chương trình MEGA 11, phân tích phả hệ bằng phương pháp “*tiếp cận cực đại*” (Maximum likelihood), với hệ số tin tưởng bootstrap 1000 lần lặp lại (Tamura & cs., 2021). Khoảng cách di truyền được tính toán dựa trên phân tích chuỗi 16S của 12 chủng của loài *E. canis* và mỗi một chủng của các loài *E. chaffeensis* và *E. ewingii* (Bảng 2), theo thông số có trong chương trình MEGA 11 sử dụng mục “*Distance*” và lệnh “*Compute Pairwise Distances*”, phương pháp “*tiếp cận tổng hợp cực đại*” (Maximum Composite Likelihood), với hệ số tin tưởng 1000 lần lặp lại (Tamura & cs., 2021).

Kết quả chính:

Dựa vào phản ứng PCR, đã khuếch đại thành công gen 18S rDNA có kích thước 1200 bp và 28S rDNA có kích thước 650 bp, tương ứng với kích thước mong đợi. Kết quả giải trình tự đã định danh được loài bọ chét ký sinh ở chó là *C. canis* và ở mèo là *C. felis*. Đã xác định được 4/20 mẫu gộp của bọ chét có chứa DNA của *Dipylidium caninum*. *D. caninum* phân lập từ bọ chét chó có tỷ lệ tương đồng đạt 99,7 và 100% với trình tự có mã số là AF02312 và MH040832, đây là hai trình tự của *D. caninum* phân lập từ đốt chữa thu được từ mẫu phân của chó và được định danh là “*D. caninum canine genotype*”. *D. caninum* phân lập từ bọ chét mèo có tỷ lệ tương đồng chỉ đạt 93,4 và 94,4% với hai trình tự tham khảo ở trên. Điều này chứng tỏ *D. caninum* phân lập từ bọ chét chó thuộc “*D. caninum canine genotype*”, còn *D. caninum* phân lập từ bọ chét mèo thuộc “*D. caninum feline genotype*”.

Phân tích phả hệ loài Ehrlichia canis của Việt Nam và thế giới

Bằng chương trình MEGA11 (Tamura & cs., 2021), trình tự chuỗi nucleotide gen 16S của bốn chủng *E. canis* trong nghiên cứu này (C8BV, C9BV, C11HT và C40HT), cùng với 24 chủng khác của Việt Nam và thế giới kể cả một chủng của loài *Rickettsia rickettsii* làm chuỗi ngoại hợp (liệt kê ở Bảng 1) được sử dụng để phân tích mối quan hệ phả hệ, từ đó, xác định phân loại của các chủng *E. canis* của Việt Nam (Hình 1).



Hình 1. Cây phả hệ xác định phân loại của các chủng *Ehrlichia canis* của Việt Nam với các chủng/loài của chi *Ehrlichia* trên thế giới. Phân tích dựa trên so sánh trình tự nucleotide 16S bằng chương trình MEGA11, sử dụng phương pháp “tiếp cận cực đại” (maximum likelihood, ML) với bootstrap 1000 lần lặp lại. Giá trị bootstrap được ghi tại mỗi phân nhánh. Ghi chú: Sau tên loài (tên Latin) là ký hiệu chủng (trong ngoặc), tiếp đến là tên quốc gia mà chủng đó xuất xứ/phân lập và sau cùng là số đăng kí Ngân hàng gen (xem **Bảng 1**). Hình tròn nhỏ chỉ các chủng của nghiên cứu này sắp xếp cùng với các chủng *E. canis* thế giới. Vạch ngang biểu thị sự thay thế nucleotide trên mỗi vị trí.

Cây phả hệ thể hiện ở **Hình 1** cho thấy, tất cả bốn chủng của Hà Nội và Hà Tĩnh (C8BV, C9BV, C11HT và C40HT) đều thuộc loài *E. canis* và nằm trong cùng nhóm với các chủng thuộc loài *E. canis* trong đó có các chủng tham chiếu của Nhật Bản, Thái Lan, Malaysia, Philipin, Israel, Thổ Nhĩ Kỳ, Tây Ban Nha và Nam Phi, với hệ số tin tưởng 92%. Các chủng của các loài *Ehrlichia* khác được sắp xếp ở các vị trí xa dần với nhóm các chủng của loài *E. canis*. Mặc dù vậy, tất cả các chủng/loài thuộc chi *Ehrlichia* đều nhóm hợp cùng nhau với hệ số bootstrap cao (88%) so với chuỗi ngoại hợp *Rickettsia rickettsii* (họ Rickettsiaceae). Như vậy, với hệ số tin tưởng cao (92%) sự sắp xếp của các chủng trong loài *E. canis* là rất gần nhau khẳng định vị trí phân loại của loài này trong chi *Ehrlichia* trong khi đó các loài khác có mối quan hệ xa hơn, đặc biệt là các loài *E. shimanensis* (Nhật Bản), *E. khabarensis* (Nga) và *E. dumleri* (Braxin).

Bảng 2. Khoảng cách di truyền (KCDT) tính toán dựa trên so sánh chuỗi nucleotide 16S của các chủng *Ehrlichia canis* của Việt Nam với các chủng cùng loài và khác loài thuộc chi *Ehrlichia* trên thế giới

Chủng/Loài	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 Ecan-(C5BV)-													
2 Ecan-(C8BV)-	0.40												
3 Ecan-	0.40	0.00											
4 Ecan-	0.40	0.00	0.00										
5 Ecan-(E60)-	0.80	0.40	0.40	0.40									
6 Ecan-(A)-PH	0.40	0.00	0.00	0.00	0.40								

7	Ecan-(Bkk07)-	0.40	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00							
8	Ecan-(002)-	0.40	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00						
9	Ecan-	1.01	0.60	0.60	0.60	1.01	0.00	0.00	0.60					
10	Ecan-(611)-IL	1.01	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	0.60				
11	Ecan-	0.40	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	0.60	0.00			
12	Ecan-(171)-ZA	0.40	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00		
13	Echa-	1.62	1.21	1.21	1.21	1.62	1.21	1.21	1.21	1.83	1.21	1.21	1.21	
14	Eewi- (Stillwater)-US	2.03	1.62	1.62	1.62	2.03	1.62	1.62	1.62	2.24	1.62	1.62	1.62	0.80

Ghi chú: Phần bôi màu và đóng khung là KCDT giữa 12 chủng cùng loài *Ehrlichia canis* của Việt Nam và thế giới (0–1.01%). Ký hiệu loài: Ecan: *Ehrlichia canis*; Echa: *Ehrlichia chaffeensis*; Eewi: *Ehrlichia ewingii*.

Khoảng cách di truyền giữa các chủng nội và ngoại loài *Ehrlichia canis*

Khoảng cách di truyền (KCDT) được tính toán giữa 14 chủng trong đó có 12 chủng của loài *E. canis* và 2 chủng của loài *E. chaffeensis* và loài *E. ewingii* trình bày ở **Bảng 2**. Kết quả cho thấy KCDT nội loài giữa 12 chủng trong loài *E. canis* có sự sai khác là 0.4–1.01%, trong khi đó giữa các loài *E. canis* và hai loài *E. chaffeensis* và loài *E. ewingii* (KCDT ngoại loài) là cao hơn (1.21–2.03%). Đa số các chủng nội loài của *E. canis* không có sai khác về KCDT, số còn lại rất thấp không quá 1%, trong khi đó sai khác KCDT ngoại loài lớn hơn 1.21%. Rõ ràng, khoảng cách di truyền cũng phản ánh rất đúng mối quan hệ của các chủng trong cùng một loài và các loài trong cùng một chi (chi *Ehrlichia*). Điều này thấy rõ ở sai khác rất thấp thậm chí không có sai khác giữa các chủng *E. canis* của Việt Nam với một số chủng cùng loài trong khi tỷ lệ sai khác cao hơn rất nhiều giữa các chủng ngoại loài.

Kết luận

Bốn chủng ký sinh trùng máu phân lập ở chó tại Hà Nội và Hà Tĩnh được xác định thuộc loài *E. canis*, điều này cũng được khẳng định khi phân tích phả hệ và khoảng cách di truyền. Các chủng cùng loài *E. canis* tập hợp cùng nhóm trên cây phả hệ và có sai khác di truyền rất thấp trong khi các chủng khác loài sắp xếp xa hơn và có sai khác cao hơn. Nghiên cứu cho thấy ký sinh trùng máu *E. canis* gây bệnh ở chó rất