

XÁC ĐỊNH LOÀI SÁN LÁ GAN LỚN GÂY BỆNH Ở BÒ KHU VỰC MIỀN TRUNG VÀ TÂY NGUYÊN (VIỆT NAM) BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ GEN TY THỂ CO1

Đỗ Ngọc Ánh*; **Nguyễn Duy Bắc***; **Nguyễn Khắc Lực***
Đặng Thị Cẩm Thạch**; **Lê Bách Quang***

TÓM TẮT

Chúng tôi đã tiến hành thu thập 240 mẫu sán lá gan gây bệnh ở bò tại Nghệ An, Quảng Nam, Phú Yên và Đắk Lắk. Các mẫu này đều được xác định là mẫu sán lá gan lớn (SLGL) *Fasciola gigantica* bằng phương pháp quan sát hình thái. Trong đó, chọn ngẫu nhiên 28 mẫu SLGL để định loài bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự trực tiếp dựa vào chỉ thị phân tử gen ty thể CO1. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu SLGL đều được xác định là *Fasciola gigantica*.

* Từ khóa: Sán lá gan; Bò; PCR; CO1; Miền Trung; Tây Nguyên.

IDENTIFICATION OF *FASCIOLA SPP* IN CATTLE PATHOGENS COLLECTED FROM MIDDLE REGION AND WESTERN HIGHLANDS (VIETNAM) USING MITOCHONDRIAL CO1 GENE MARCER

SUMMARY

We collected 240 *Fasciola spp* samples in cattle pathogens in Nghean, Quangnam, Phuyen and Daklak provinces. Classifying all samples by morphology, we found that they were *Fasciola gigantica*. 28 samples in this samples were collected randomly and species were identified by using PCR method to amplify a portion of mitochondrial CO1 and direct sequencing. The result showed that all samples were identified as *Fasciola gigantica*.

* Key words: *Fasciola spp*; Cattle; PCR; CO1; Middle region; Western highlands.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sán lá gan lớn là một bệnh ký sinh trùng do *Fasciola hepatica* (Lonnaeus, 1758) và *Fasciola gigantica* gây ra (Cobbold, 1885),

là bệnh phổ biến ở động vật nhai lại như cừu, dê, trâu bò và gia súc trên khắp thế giới (Andrews, 1999). Người chỉ là vật chủ tình cờ và mắc phải khi ăn thực vật thủy

* Học viện Quân y

** Viện Sốt rét - Ký Sinh trùng - Côn trùng TW

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

sinh, các loại rau khác ngập nước hoặc chứa nang ấu trùng (metacercariae) của

SLGL (Mas-coma và CS, 1999). Ở nhiều quốc gia, đây là vấn đề sức khỏe được cộng đồng đặc biệt quan tâm (WHO, 1995).

Tại Việt Nam, bệnh SLGL ở người có xu hướng tăng dần từ năm 1999, đến năm 2006 số ca mắc bệnh là 2.428 và đến tháng 3 năm 2008 số ca đã tăng lên con số trên 5.000. Bệnh được xác định phân bố ở 47 tỉnh thành từ Bắc vào Nam (Đặng Thị Cẩm Thạch và CS, 2008) và loài gây bệnh được xác định là *F. gigantica* (Nguyễn Văn Đề và CS, 2006).

Trong nước, nghiên cứu SLGL dưới góc độ phân tử được một số tác giả thực hiện. Bước đầu, các nghiên cứu này đã giúp xác định loài SLGL gây bệnh ở nhiều điểm khác nhau trong nước. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu phân tử về SLGL ở khu vực miền Trung và Tây Nguyên.

Để góp phần xác định loài SLGL gây bệnh trên động vật đang tồn tại ở Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Xác định loài SLGL gây bệnh ở bò tại khu vực miền Trung và Tây Nguyên (Việt Nam) bằng các chỉ thị phân tử gen ty thể CO1.*

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU

VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu, hóa chất, thiết bị nghiên cứu.

- Các mẫu SLGL trưởng thành thu thập từ động vật (bò) tại các tỉnh Nghệ An, Quảng Nam, Đắk Lắk và Phú Yên. Các mẫu sán sau khi thu thập, rửa sạch nhiều lần bằng nước muối sinh lý và cho vào cồn 70°, bảo quản ở -20°C cho đến khi thực hiện nghiên cứu.

- Bộ kit tách ADN tổng số QIAamp DNA extraction kit của hãng QIAGEN Inc (Mỹ) và hóa chất cần thiết do hãng cung cấp.

- Cặp mồi Ita 8 (5'-ACG TTG GAT CAT AAG CGT GT-3') và Ita 9 (5'-CCT CAT CCA ACA TAA CCT CT-3') được sử dụng để nhân đoạn gen thuộc CO1.

- Bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR (Promega).

- Máy đo nồng độ ADN, máy PCR GeneAmp PCR system 9700 AB (Applied Biosystem, Mỹ), máy soi và chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ), bộ điện di kiểm tra sản phẩm PCR của hãng Bio-Rad, máy xác định trình tự ABI 3130xl Genetic Analyzer.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Tách chiết ADN tổng số từ mẫu SLGL:*

Lấy các mẫu sán từ tủ bảo quản và cắt lấy một phần cơ thể (phần đuôi) nhỏ như hạt đỗ xanh. Cho phần sán này vào ống eppendoff, rửa sạch cồn bằng nước cất 2 lần vô trùng. Tiếp theo, cho vào cối đá chuyên dụng để nghiền cùng với nitơ lỏng. Sau đó, bột sán được tách ADN bằng cách sử dụng bộ sinh phẩm tách ADN QIAamp DNA extraction kit của QUIAGEN Inc (Mỹ). ADN của từng con sán riêng biệt sau khi tách, kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% và đo nồng độ. Bảo quản ADN các mẫu sán ở -20°C cho tới khi sử dụng chạy PCR.

** Khuếch đại gen CO1 bằng kỹ thuật PCR:*

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: PCR master mix (Promega), mồi xuôi (Forward primer), mồi ngược (Reward primer), ADN khuôn (template) và nước tinh

khiết. Các bước của phản ứng PCR như sau: 1 chu kỳ 94°C trong 1 phút 30 giây, tiếp theo là 30 chu kỳ 94°C trong 1 phút 30 giây, 52°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 2 phút 00 giây, cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C 10 phút. Kết thúc phản ứng, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%.

* *Đọc và phân tích trình tự:*

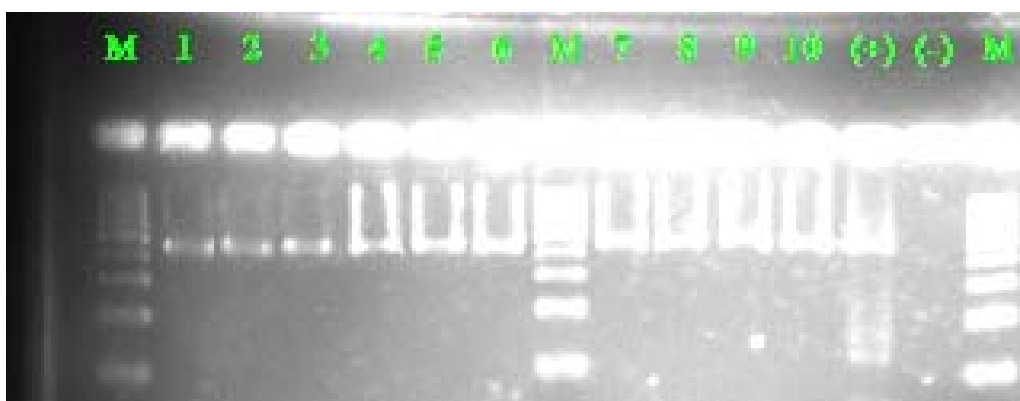
Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng máy ABI 3130xl Genetic Analyzer.

* *Xử lý số liệu:* bằng phần mềm chuyên dụng Seqcape 2.5, BioEdit, Cluxtal.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả chạy phản ứng PCR nhân đoạn gen *CO1*.

Trong nghiên cứu này, 28 mẫu sán chọn ngẫu nhiên từ 240 mẫu sán thu thập tại 4 tỉnh nghiên cứu, tách ADN tổng số bằng bộ sinh phẩm *QIAamp DNA extraction kit* của hãng QUIAGEN theo quy trình nhà sản xuất cung cấp. Sau đó, thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%.



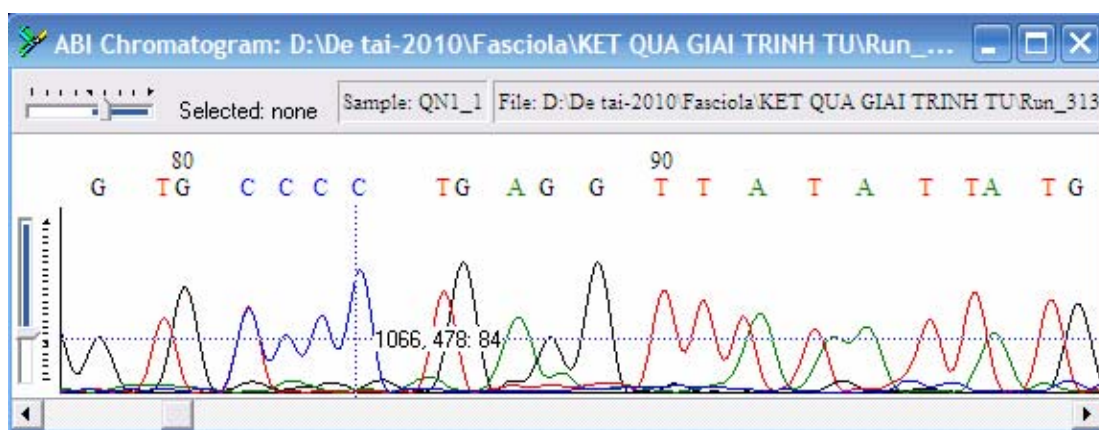
Hình 1: Điện di sản phẩm PCR một số mẫu SLGL với cặp mồi Ita 8 và Ita 9. (1, 2: SLGL Nghệ An; 3, 4: SLGL Quảng Nam; 5, 6: SLGL Đắk Lắk; 7 - 10: SLGL Phú Yên).

Các mẫu đều cho đoạn ADN có độ dài đặc hiệu kích thước khoảng gần 450bp, trong khi đó, mẫu chứng âm cho kết quả âm tính đúng như mong đợi. Điều này cho thấy phản ứng đã nhân được đoạn gen đặc hiệu của SLGL và không bị tạp nhiễm.

2. Kết quả xác định trình tự gen *CO1*.

Trong nghiên cứu này, việc xác định trình tự đoạn gen *CO1* thực hiện trực tiếp từ sản phẩm phản ứng PCR sau khi đã tinh sạch. Khi có kết quả giải trình tự, truy cập Ngân hàng

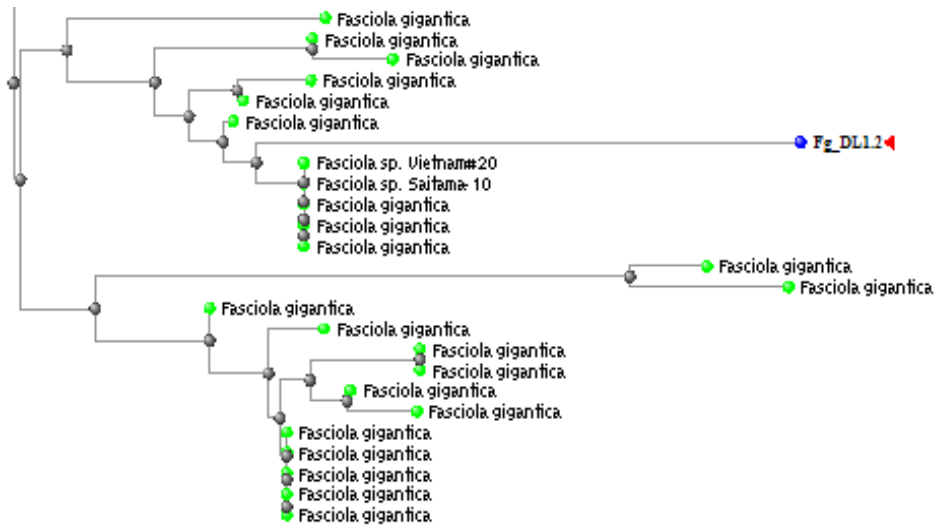
gen để so sánh đối chiếu. Sử dụng công thức $D = 1 - \frac{M}{L}$ (Chilton và CS, 1995) để xác định mức độ tương đồng. Trong đó, M là số nucleotid sai khác, L là tổng số nucleotid của đoạn gen được giải trình tự cần so sánh.



Hình 2: Minh họa trình tự gen CO1 của một mẫu SLGL Quảng Nam.

Bảng 1: Một số điểm sai khác trong trình tự gen CO1.

KÝ HIỆU	NGUỒN GỐC	MÃ SỐ	VỊ TRÍ BIẾN ĐỔI					
			136	159	196	237	305	352
Fg_Indo	Indonesia	AB207179.1	T	A	T	T	T	T
Fg_Thai	Thái Lan	AB207181.1	T	A	T	T	T	T
Fg_Japan	Nhật Bản	AB207183.1	T	A	T	T	T	T
PY1.1	Phú Yên	-	T	A	T	T	T	T
PY1.2	Phú Yên	-	A	T	T	T	A	A
QN1.1	Quảng Nam	-	A	T	T	T	A	A
NA1.2	Nghệ An	-	G	T	T	T	A	A
DL1.2	Đắk Lắk	-	A	-	T	T	T	A



Hình 3: Mối quan hệ loài của SLGL Việt Nam (mẫu Đắc Lắc) với các mẫu SLGL ở một số quốc gia dựa trên dữ liệu gen CO1.

BÀN LUẬN

CO1 (cytochrome oxidase subunit I) là gen ty thể có đặc tính di truyền theo dòng mẹ (Nguyễn Thị Giang Thanh và CS, 2010), gen này được nhiều tác giả quan tâm sử dụng để nghiên cứu giám định thành phần loài, phân loại, lập phả hệ và nghiên cứu tiến hóa (T. Itagaki và CS, 2009). Trong nghiên cứu này, các mẫu sán lá gan thu thập ở động vật, sau khi tiến hành thẩm định loài bằng phương pháp hình thái học, tách ADN tổng số để làm khuôn (template) cho phản ứng PCR. Sử dụng cặp mồi Ita 8 và Ita 9 (T. Itagaki và CS, 2005) để nhân đoạn ADN chứa gen *CO1*. Kiểm tra sản phẩm phản ứng PCR trên thạch agarose 1% (hình 1). Kết quả cho thấy, cả 28 mẫu nhân được đoạn gen có kích thước khoảng gần 450bp, phù hợp với T. Itagaki và CS (2005).

Để nhân đoạn gen *CO1* (một số tác giả đặt tên là *cox1*), nhiều tác giả đã sử dụng các cặp mồi khác nhau. Nguyễn Thị Giang Thanh và CS (2010) sử dụng cặp mồi JB3F và JB4.5R, kết quả nhân được đoạn ADN của *CO1* có kích thước 423bp. Kết quả trên phù hợp với kích thước đoạn *CO1* của SLGL đã công bố trên Ngân hàng gen.

Sản phẩm PCR sau khi kiểm tra trên gel agarose 1%, tinh sạch và giải trình tự trực tiếp, truy cập Ngân hàng gen để so sánh trình tự. Trên cơ sở phân tích tương đồng nucleotid của các mẫu sán trong nghiên cứu này với trình tự trên Ngân hàng gen, cho thấy trình tự nucleotid các mẫu SLGL trong nghiên cứu này có mức độ tương đồng cao so với trình tự nucleotid của sán lá gan *F.gigantica* trên Ngân hàng gen, với tỷ lệ tương đồng là 97 - 99,9%. Số nucleotid sai khác dao động từ 0 - 4. Như vậy, các mẫu SLGL thu thập từ bò ở khu vực miền Trung và Tây Nguyên là loài *F.gigantica*. Kết quả này phù hợp với nhận định của hầu hết tác giả khi nghiên cứu về SLGL ở Việt Nam cũng như ở một số tỉnh khu vực miền Trung (Nguyễn Văn Đề và CS, 2006; Nguyễn Thế Hùng và CS, 2008; Nguyễn Thị Giang Thanh và CS, 2010). Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu ở những địa điểm khác trên toàn quốc để đánh giá một cách chính xác loài SLGL gây bệnh ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

Phân tích dưới góc độ phân tử với chỉ thị gen *CO1* cho thấy SLGL ở bò thu thập ở một số tỉnh thuộc khu vực miền Trung và Tây Nguyên là loài *Fasciola gigantica*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hòa, Lê Thị Xuân. Xác định thành phần loài SLGL ký sinh trên người Việt Nam bằng phương pháp sinh học phân tử. Tạp chí Thông tin y dược. 2006, số 4, tr.31-34.
2. Đặng Thị Cẩm Thạch và CS. Tình hình nhiễm SLGL ở Việt Nam năm 2007 và đề xuất biện pháp phòng chống. Tạp chí Phòng chống Bệnh sốt rét và các Bệnh ký sinh trùng. 2008, số 4, tr.31-37.
3. Nguyễn Thế Hùng, Lê Thanh Hòa, Giang Hoàng Hà. Kết quả định loại SLGL thu thập ở lò mổ Hà Nội bằng phương pháp PCR. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú ý. 2008, Tập XV, số 3, tr.50-55.
4. Nguyễn Thị Giang Thanh, Triệu Nguyên Trung, Lê Thanh Hòa. Nghiên cứu thẩm định loài SLGL (*Fasciola spp.*) gây bệnh trên dê tại Việt Nam bằng chỉ thị phân tử. Nguồn <http://www.impe-qn.org.vn/impe-qn/vn/portal>. 2010.

5. Andrews S. J. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis (Dalton, J.P. ed.). CABI Publishing, Wallingford, UK. 1999, pp.1-30.

6. Mas-Coma, S; Bargues MD, Esteban JG. Human fasciolosis in Dalton, JP. *Fasciolosis*. Wallingford, Oxon, UK: CABI Pub. 1999, pp.411-34. ISBN 0-85199-260-9.

7. Mas-coma S et al. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol*. 2005, 35, pp.1255-1278.

8. Itagaki T, Sakaguchi K, Terasaki K, Sasaki O, Yoshihara S, Van Dung T. Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Int*. 2009, 58, pp.81-85.