

Nghiên cứu xác định loài sán lá gan lớn thu thập ở trâu và bò tại một số tỉnh miền Bắc (Việt Nam) bằng kỹ thuật PCR-RFLP

Determination of *Fasciola* species isolated from bovine and buffalo in the Northern Vietnam using PCR-RFLP method

Đỗ Ngọc Ánh, Đỗ Minh Trung

Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định loài sán lá gan lớn thu thập ở trâu và bò tại một số tỉnh miền Bắc (Việt Nam) bằng kỹ thuật PCR-RFLP dựa vào chỉ thị gen nhân ITS1. **Đối tượng và phương pháp:** Tổng số 122 cá thể sán lá gan lớn được thu thập từ đường dẫn mật của trâu, bò tại các lò mổ tại 4 tỉnh/thành gồm Hà Nội (66 cá thể), Vĩnh Phúc (43 cá thể), Bắc Giang (7 cá thể) và Điện Biên (6 cá thể). Trong đó, 65 cá thể sán được thu thập từ 6 cá thể bò và 57 cá thể sán được thu thập từ 5 cá thể trâu. Toàn bộ 122 cá thể sán lá gan lớn được giám định loài bằng kỹ thuật PCR-RFLP dựa trên chỉ thị gen nhân ITS1 theo mô tả trong một nghiên cứu đã được công bố. **Kết quả:** Kết quả nghiên cứu cho thấy có 95/122 (77,9%) cá thể sán lá gan lớn có kiểu gen phù hợp với *F. gigantica* và 27/122 (22,1%) cá thể có kiểu gen dạng trung gian (*Fasciola* sp.). Không thấy cá thể sán lá gan lớn nào có kiểu gen *F. hepatica* trong nghiên cứu này. Ở cả 2 vật chủ trâu và bò cũng như ở cả 4 tỉnh nghiên cứu đều có mặt 2 kiểu gen. **Kết luận:** Nghiên cứu cho thấy, loài *Fasciola gigantica* và dạng trung gian tìm thấy ở cả trâu và bò tại 4 tỉnh/thành miền Bắc gồm Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Giang và Điện Biên, trong khi *F. hepatica* chưa được tìm thấy ở các tỉnh này.

Từ khóa: Sán lá gan lớn, trâu, bò, PCR-RFLP, miền Bắc.

Summary

Objective: The present study was aimed to identify the genotype of *Fasciola* spp. isolated from bovine and buffalo in the Northern Vietnam using PCR-RFLP method based on rDNA (ITS1) markers. **Subject and method:** Adult *Fasciola* spp. were isolated from bile ducts of bovine and buffalo in four province in the Northern Vietnam. Overall, 122 adult flukes from livers of slaughtered animals were collected from abattoirs of different areas. They included 65 isolates from infected bovine, 57 isolates from infected buffalo. 122/122 isolates were identified as *Fasciola* species by ITS1 of rDNA. In this study, PCR-RFLP methods was used to distinguish between *F. hepatica* and *F. gigantica* according to the previous study. **Result:** The present results showed that, using PCR-RFLP based on the first internal transcribed spacers (ITS1) of the rDNA revealed that 95 out of 122 isolates (77.9%) were *Fasciola gigantica* type, whereas 27 isolates (22.1%) presented an intermediate *Fasciola*. No *F. hepatica* was detected in the present study. The both types of *Fasciola* were determined in four province and in bovine and buffalo in the Northern Vietnam. **Conclusion:** *F. gigantica* and intermediate form were identified in bovine and buffalo in the Northern Vietnam, whereas *F. hepatica* was not detected.

Ngày nhận bài: 07/8/2020, ngày chấp nhận đăng: 14/8/2020 Người phản hồi: Đỗ Ngọc Ánh, Email: dranhk61@gmail.com - Học viện Quân y

Keywords: Fasciola, bovine, buffalo, PCR-RFLP, Northern Vietnam.

1. Đặt vấn đề

Bệnh do sán lá gan lớn (SLGL) ở người và động vật chủ yếu do 2 loài sán lá *Fasciola hepatica* và *Fasciola gigantica* gây ra. Đây là bệnh lây truyền qua đường ăn uống quan trọng ở người và động vật nhai lại có phân bố rộng khắp trên toàn thế giới [1]. Hai loài *F. hepatica* và *F. gigantica* có phân bố khác nhau. *F. hepatica* phân bố rộng khắp trên thế giới nhưng chủ yếu ở các khu vực có khí hậu ôn đới như châu Âu, châu Mỹ và châu Úc, trong khi đó *F. gigantica* phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới như ở châu Phi và châu Á. Cả hai loài cùng xuất hiện ở khu vực khí hậu cận nhiệt đới [1], [2].

Hai loài SLGL có thể được phân biệt dựa vào hình thái bên ngoài [1]. *F. gigantica* có hình dạng thon, dài còn *F. hepatica* ngắn và rộng [1], [3]. Ngoài ra, tỷ số chiều dài và chiều rộng có sự khác biệt giữa 2 loài nên cũng được một số nghiên cứu sử dụng để phân biệt 2 loài SLGL. Tuy nhiên, kích thước của SLGL thay đổi phụ thuộc vào tuổi sán, loài vật chủ, số lượng sán nhiễm, dinh dưỡng của vật chủ nên trong nhiều trường hợp chỉ dựa vào hình thái rất khó phân biệt *F. hepatica* và *F. gigantica* [3], [5]. Do những hạn chế của phương pháp hình thái, nên vài kỹ thuật sinh học phân tử đã được phát triển để phân biệt *F. hepatica* với *F. gigantica*, bao gồm *F. hepatica* và *F. gigantica* như PCR thường, PCR-RFLP, multiplex PCR, realtime PCR, LAMP... [3]. Các kỹ thuật này thường được phát triển dựa trên các chỉ thị đoạn giao gen ITS1, ITS2 và gen 28S của hệ gen nhân, các gen ty thể *cox1* và *nad1* [3], [5]. Ngoài ra, gen ty thể cũng thường được sử dụng phối hợp với gen nhân để xác định loài cũng như các cá thể lai chéo [6], [7], [8].

Ở Việt Nam, đã một số nghiên cứu sử dụng các chỉ thị ITS1, ITS2 và *cox1* để chỉ ra sự tồn tại của các loài SLGL [9], [10]. Ở khu vực miền Bắc, SLGL ở nhiều tỉnh thành đã được giám định loài. Tuy nhiên, SLGL ở nhiều tỉnh/thành vẫn chưa được định danh. Điều này làm cho dữ liệu dịch tễ, dịch tễ học phân tử và xác định mối liên quan giữa bệnh do SLGL ở người và động vật còn nhiều hạn chế. Do vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục tiêu: Xác định loài

SLGL thu thập ở trâu và ở bò tại một số tỉnh miền Bắc (Việt Nam) bằng kỹ thuật PCR-RFLP dựa vào chỉ thị gen nhân ITS1.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Tổng số 122 cá thể SLGL trưởng thành được thu thập từ đường mật của trâu, bò tại các lò mổ trên địa bàn 4 tỉnh/thành gồm Hà Nội (66 cá thể), Vĩnh Phúc (43 cá thể), Bắc Giang (7 cá thể), Điện Biên (6 cá thể) theo phương pháp mổ khám trong thời gian từ 2010 đến 2016. Trong số này, 65 cá thể SLGL được thu thập từ 6 cá thể bò và 57 cá thể sán được thu thập từ 5 cá thể trâu. Các mẫu sán sau khi thu thập được bảo quản trong cồn ethylic 70° ở 4°C cho đến khi tách chiết ADN và thực hiện phản ứng PCR.

2.2. Tách chiết ADN sán lá gan lớn

Một phần cơ thể SLGL khối lượng khoảng 25mg lấy ra từ phần đuôi được sử dụng để tách chiết ADN bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA Mini Kit (No. 51304, Qiagen, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN của SLGL sau khi tách chiết được bảo quản ở -20°C cho tới khi thực hiện phản ứng PCR.

2.3. Thực hiện phản ứng PCR

Cặp mỗi ITS1-F (5'-TTG CGC TGA TTA CGT CCC TG-3') và ITS1-R (5'-TTG GCT GCG CTC TTC ATC GAC-3') (Integrated DNA Technologies, USA) (Itagaki et al., 2005) được sử dụng cho phản ứng PCR để nhân đoạn ADN kích thước khoảng 680bp chứa đoạn giao gen ITS1 của SLGL [5]. Phản ứng PCR với tổng thể tích 50µl gồm 5µl dung dịch ADN của SLGL, 25µl mastermix 2X (Thermo Fisher Scientific, USA), 1µl mỗi (0,2µM) và 18,0µl nước khử ion được thực hiện trên thiết bị luân nhiệt Thermo Mastercycler Gradient (Thermo Fisher Scientific, USA) theo các bước như sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước 94°C/30 giây, 55°C/30 giây và 72°C/60 giây. Sau 35 chu kỳ ở trên là 1 chu kỳ 72°C trong 15 phút. Sau đó, 5µl sản phẩm PCR được lấy ra điện di kiểm tra kết quả. ADN của sán *F. gigantica* (mã số

trên genbank là MH790326) được sử dụng làm chứng dương cho các phản ứng PCR.

2.4. Phân tích đa hình đoạn cắt giới hạn sản phẩm PCR (PCR-RFLP)

Sản phẩm PCR được cắt giới hạn bằng enzyme *RsaI*. Phản ứng cắt giới hạn với tổng thể tích 16µl, gồm 5µl sản phẩm PCR, 1µl of *RsaI*, 1µl dung dịch đệm 10X Tango (Thermo Fisher Scientific, USA) và 9µl nước khử ion. Hỗn dịch được ủ ở 37°C trong 12 giờ để chắc chắn enzyme cắt hoàn toàn sản phẩm PCR. Sau đó, enzyme *RsaI* được bất hoạt ở 65°C trong 15 phút. 6µl của mỗi sản phẩm được nhuộm với 1µl dung dịch loading dye và được điện di trên gel agarose 1,5% ở điện thế 100V trong 60 phút. Sau đó, bản gel agarose được nhuộm bằng dung dịch ethidium bromide và được ghi lại hình ảnh trên thiết bị chiếu tia UV chuyên dụng (UVP, Canada). Kích thước của các mảnh ADN được xác định thông qua so sánh với thang ADN chuẩn 50 - 1000bp (Thermo Fisher Scientific, USA). Số lượng, kích thước các mảnh cắt giới hạn dùng để phân biệt *F. hepatica* và *F. gigantica* theo mô tả của Ichikawa M và cộng sự (2010) [5]. Cụ thể, nếu là sán *F. hepatica* sẽ xuất hiện các vạch sản phẩm kích thước 360bp, 100bp và 60bp. Nếu là sán *F. gigantica* sẽ có 3 vạch 360bp, 170bp và 60bp. Dạng trung gian sẽ có 4 vạch 360bp, 170bp, 100bp và 60bp.

2.5. Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR của của 1 số mẫu đại diện được gửi tới công ty First BASE Laboratories Sdn Bhd service (Kembangan 43300, Selangor, Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự với cả 2 mỗi ITS1-F, ITS1-R. Các giải trình tự thu nhận được đọc, chỉnh sửa bằng phần mềm SeqScape 2.1 của thiết bị giải trình tự ABI 3130 Genetic Analyzer và phần mềm tin sinh học Mega 7.0.

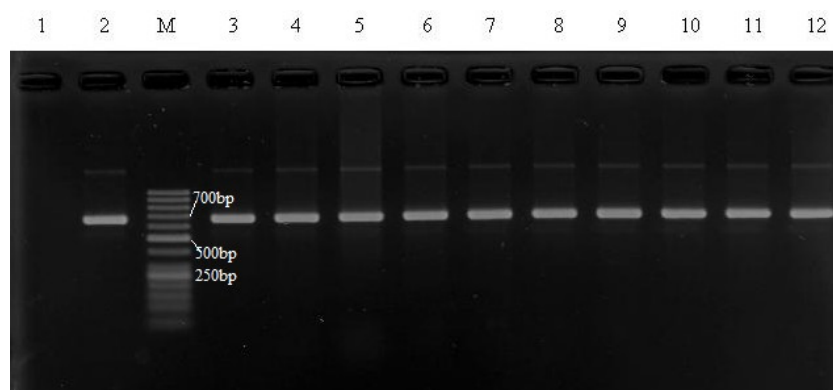
2.6. Xử lý kết quả nghiên cứu

Các số liệu nghiên cứu được nhập liệu và phân tích bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 20.0. Các trình tự thu được được so sánh với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen sử dụng công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Quan hệ phả hệ của SLGL được thiết lập bằng thuật toán Neighbor Joining Tree trên phần mềm Mega phiên bản 7.09. Trình tự của sán lá phổi *Paragonimus westermani* (AF040935.1) được sử dụng để xác định quan hệ ngoại loài.

3. Kết quả

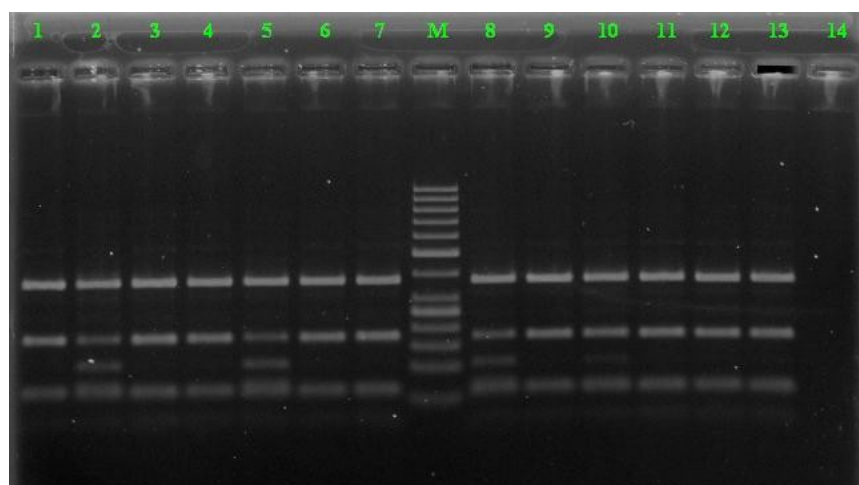
3.1. Kết quả PCR và PCR-RFLP

Toàn bộ 122 mẫu đều cho sản phẩm PCR kích thước 680bp khi điện di trên gel agarose 1,5%. Sản phẩm PCR được cắt giới hạn với enzyme *RsaI* cho hình ảnh rõ nét. Hình 1 minh họa kết quả PCR và Hình 2 minh họa sản phẩm cắt giới hạn với enzyme *RsaI* của một số mẫu SLGL thu thập từ bò tại Hà Nội và Vĩnh Phúc.



Hình 1. Sản phẩm PCR đoạn ADN được khếch đại bởi cặp mồi ITS1-F, ITS1-R của 10 mẫu sán lá gan lớn thu thập ở bò tại Hà Nội.

Ghi chú: Giếng 1 là chứng âm; Giếng M là thang ADN chuẩn 50 - 1000bp; Giếng 2 là chứng dương (*F. gigantica*); Các giếng 3 đến 12 là sản phẩm PCR của sán lá gan lớn thu thập ở bò.



Hình 2. Kết quả cắt giới hạn bằng enzyme *RsaI* sản phẩm PCR với mỗi ITS1-F, ITS1-R các mẫu SLGL thu từ bò ở Vĩnh Phúc (2015)

Ghi chú: Giếng M là thang ADN chuẩn 50-1000 bp; Các giếng 2, 5, 8, 10 có 4 band 300, 170, 100 và 60bp thuộc kiểu gen *Fasciola* sp. Các giếng còn lại có 3 band 300, 170 và 60bp thuộc kiểu gen *F. gigantica*; Giếng 14 là chứng âm.

Bảng 1. Phân bố các loài sán lá gan lớn ở các vật chủ tại khu vực miền Bắc

Loài sán	Vật chủ	Bò (Số lượng, %)	Trâu (Số lượng, %)	Tổng số (Số lượng, %)
<i>F. gigantica</i>		50 (76,9)	45 (78,9)	95 (77,9)
<i>Fasciola</i> sp.		15 (23,1)	12 (21,1)	27 (22,1)
<i>F. hepatica</i>		0	0	0
Cộng		65 (100)	57 (100)	122 (100)

Bảng 1 cho thấy, trong 122 cá thể sán được giám định loài có 95 cá thể (77,9%) là *F. gigantica* và 27 cá thể (22,1%) là dạng trung gian. Không có cá thể nào là *F. hepatica*. Ở cả trâu và bò đều có mặt *F. gigantica* và dạng trung gian (*Fasciola* sp.).

Bảng 2. Phân bố các loài sán lá gan lớn ở các tỉnh/thành nghiên cứu

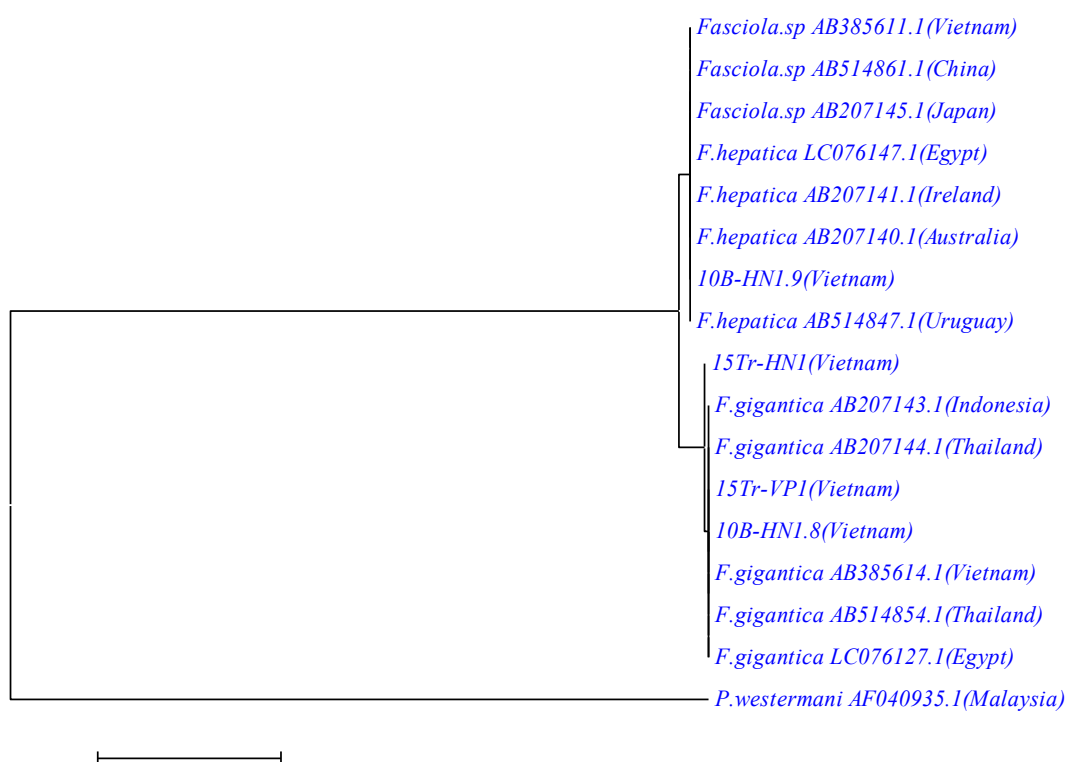
Tỉnh/Thành	Loài sán	<i>F. gigantica</i> (Số lượng, %)	<i>Fasciola</i> sp. (Số lượng, %)	Tổng số (Số lượng, %)
Hà Nội		48 (72,7)	18 (27,3)	66 (100)
Vĩnh Phúc		37 (86,0)	6 (14,0)	43 (100)
Bắc Giang		6 (85,7)	1 (14,3)	7 (100)
Điện Biên		4 (66,7)	2 (33,3)	6 (100)
Cộng		95 (77,9)	27 (22,1)	122 (100)

Bảng 2 cho thấy, ở cả 4 tỉnh/thành đều có mặt của cả 2 kiểu gen *F. gigantica* và dạng trung gian (*Fasciola* sp.).

3.2. Phân tích trình tự của đoạn giao gen ITS1

Trình tự nucleotide đoạn ITS1 hoàn thiện của 4 mẫu sán 10B-HN1.8, 15Tr-HN1, 15Tr-VP1 (các mẫu được định danh là *F. gigantica* bằng kỹ thuật PCR-RFLP) và 10B-HN1.9 (mẫu được định danh là dạng trung gian bằng kỹ thuật PCR-RFLP) được so sánh

với trình tự nucleotide đoạn tương ứng của *F. gigantica* ở Thailand (AB514853.1) trên ngân hàng gen. Kết quả so sánh cho thấy: Các mẫu sán 10B-HN1.8, 15Tr-HN1 và 15Tr-VP1 tương đồng 100% với trình tự AB514853.1, trong khi mẫu sán 10B-HN1.9 chỉ tương đồng 98,84% với trình tự AB514853.1.



Hình 3. Cây phả hệ của 4 mẫu SLGL thu thập ở Hà Nội (3 mẫu) và Vĩnh Phúc (1 mẫu) dựa trên kết quả so sánh trình tự đoạn ITS1 với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen bằng thuật toán Neighbor Joining Tree. Trình tự đoạn ITS1 của *Paragonimus westermani* (AF040935.1) được sử dụng để xác định quan hệ ngoại loài.

Kết quả trên cho thấy, các mẫu sán 10B-HN1.8, 15Tr-HN1 và 15Tr-VP1 có cùng phả hệ với *F. gigantica*. Mẫu 10B-HN1.9 có cùng phả hệ với dạng trung gian và sán *F. hepatica* tham chiếu công bố trên ngân hàng gen, mẫu này kết quả PCR-RFLP được xác định là dạng trung gian.

4. Bàn luận

Các kỹ thuật sinh học phân tử nhờ có độ chính xác cao, đáng tin cậy cao nên ngày càng được sử dụng rất rộng rãi trong xác định và phân biệt các loài sán lá gan lớn ở các khu vực lưu hành bệnh [3],

[4], [10]. Một số kỹ thuật sinh học phân tử như PCR kết hợp với giải trình tự, PCR-RFLP, multiplex PCR, realtime PCR, LAMP... đã được phát triển để phân biệt 2 loài *Fasciola hepatica* và *Fasciola gigantica* [3]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR-RFLP dựa trên chỉ thị gen ITS1 và enzyme giới hạn *RsaI* được lựa chọn sử dụng để xác định và phân biệt các loài sán lá gan lớn (*Fasciola* spp.) thu thập tại 4 tỉnh miền Bắc (Việt Nam) là Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Giang, Điện Biên. Kỹ thuật này có thể phân biệt các loài sán lá gan lớn nhờ dựa vào tính đa hình của đoạn giao gen ITS1 [3], [5]. Đây là kỹ thuật được phát triển bởi

Ichikawa và cộng sự từ năm 2010 [5] và kỹ thuật này được nhiều nghiên cứu khác nhau sử dụng để định danh SLGL [2], [8]. PCR-RFLP cũng được nhiều tác giả phát triển để phân biệt 2 loài SLGL dựa trên các chỉ thị khác nhau như: chỉ thị gen nhân 28S, đoạn giao gen ITS2, *cox1* [3]. Hầu hết nghiên cứu cho rằng, kỹ thuật PCR-RFLP là một công cụ mạnh để phân biệt 2 loài *F. hepatica* và *F. gigantica*.

Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy, *F. gigantica* và dạng trung gian cùng tồn tại trên trâu và bò ở cả 4 tỉnh/thành nghiên cứu nhưng không thấy có mặt loài *F. hepatica*. Kết quả này tương tự như các công bố trước đó về loài SLGL ở Việt Nam [6], [9]. Nghiên cứu còn cho thấy, đa số các cá thể SLGL thuộc về kiểu gen *F. gigantica*. Kết quả này phù hợp với các thông báo trước đây về thành phần loài SLGL ở trâu, bò tại Việt Nam. Dạng trung gian trong nghiên cứu này cũng giống như trong các nghiên cứu trước đây ở cả người và động vật tại Việt Nam [9]. Sự vắng mặt của *F. hepatica* ở trong nghiên cứu này tương tự như ở một số quốc gia láng giềng của Việt Nam như Myanmar, Thái Lan [8], [10]. Trong khi đó, tại một số quốc gia thuộc Châu Á như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc và Iran, dạng trung gian tồn tại song song cùng với 2 loài *F. hepatica* và *F. gigantica* [2], [7]. Sự khác biệt này đặt ra vấn đề cần có những nghiên cứu tiếp theo để luận giải về sự tồn tại của *F. gigantica* và dạng trung gian ở Việt Nam trong khi không thấy sự có mặt của *F. hepatica*.

5. Kết luận

Bằng chỉ thị phân tử ITS1, nghiên cứu đã xác định được sự có mặt đồng thời của 2 kiểu gen *Fasciola gigantica* và dạng trung gian trên trâu và bò tại 4 tỉnh thuộc miền Bắc (Việt Nam) là Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Giang và Điện Biên. Chưa phát hiện cá thể sán lá gan lớn nào có kiểu gen *F. hepatica* trong nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) *Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control*. Advances in Parasitology 69: 45-146.
2. Ichikawa M, Itagaki T (2012) *Molecular analysis of aspermic Fasciola flukes from Korea on the basis of the nuclear ITS1 region and mitochondrial DNA markers and comparison with Japanese aspermic Fasciola flukes*. Journal of Veterinary Medical Science 74(7): 899-904.
3. Ai L, Chen MX, Alasaad S, Elsheikha HM, Li J, Li HL et al (2011) *Genetic characterization, species differentiation and detection of Fasciola spp. by molecular approaches*. Parasit Vectors 4 (101): 1-6.
4. Itagaki T, Kikawa M, Terasaki K, Fukuda K (2005) *Molecular Characterization of Parthenogenic Fasciola sp. in Korea on the Basis of DNA Sequences of Ribosomal ITS1 and Mitochondrial NDI gene*. Journal of Veterinary Medical Science 67(11): 1115-1118.
5. Ichikawa M, Itagaki T (2010) *Discrimination of the ITS1 types of Fasciola spp. based on a PCR-RFLP method*. Parasitology Research 106(3): 757-761.
6. Itagaki T, Sakaguchi K, Terasaki K, Sasaki O, Yoshihara S, Van DT (2009) *Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of Fasciola in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA*. Parasitology International 58(1): 81-85.
7. Peng M, Ichinomiya M, Ohtori M, Ichikawa M, Shibahara T, Itagaki T (2009) *Molecular characterization of Fasciola hepatica, Fasciola gigantica, and aspermic Fasciola sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA*. Parasitology Research 105(3): 809-815.
8. Ichikawa M, Bawn S, Maw NN et al (2011) *Characterization of Fasciola spp. in Myanmar on the basis of spermatogenesis status and nuclear and mitochondrial DNA markers*. Parasitology International 60(4): 474-479.
9. Le TH, De NV, Agatsuma T, Thi Nguyen TG, Nguyen QD, McManus DP et al (2008) *Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica in Vietnam*. International Journal for Parasitology 38(6): 725-730.

10. Wannasan A, Khositharattanakool P, Chaiwong P, Piangjai S, Uparanukraw P, Morakote N (2014) *Identification of Fasciola species based on mitochondrial and nuclear DNA reveals the co-existence of intermediate Fasciola and Fasciola gigantica in Thailand*. Experimental Parasitology 146: 64-70.