

XÁC ĐỊNH LOÀI SÁN LÁ GAN NHỎ GÂY BỆNH TRÊN VỊT Ở TỈNH BÌNH ĐỊNH BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SỬ DỤNG HỆ GEN NHÂN (ITS-2)

Trương Hoàng Phương¹, Nguyễn Đức Tân²,
Nguyễn Văn Thoai², Nguyễn Thị Sâm², Nguyễn Hữu Hưng³

TÓM TẮT

Tổng số 120 mẫu sán lá gan nhỏ ký sinh trên vịt tại tỉnh Bình Định đã được thu thập và chiết tách ADN tổng số. Bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự đoạn gen ITS-2, đã thu được chuỗi nucleotid và so sánh với trình tự nucleotid trên ngân hàng gen qua chương trình BLAST. Kết quả so sánh cho thấy đã phát hiện các loài sán lá gan nhỏ có mức độ tương đồng cao là *Opisthorchis viverrini*, *O. lobatus*, *O. felineus* và *C. sinensis*, với sự sai khác lần lượt là 2, 5, 12 và 8 nucleotid, tương ứng với 0,5%, 1,42%, 3,42% và 2,3%. Trên cơ sở dữ liệu phân tích di truyền và cây phả hệ, có thể kết luận rằng các mẫu sán lá gan nhỏ thu thập trên vịt ở tỉnh Bình Định đều thuộc họ *Opisthorchiidae*; trong đó loài *O. viverrini* và *O. lobatus* có mối quan hệ họ hàng gần nhất. Căn cứ vào hình thái học và trình tự nucleotid, sán lá gan nhỏ ký sinh trên vịt ở tỉnh Bình Định thuộc loài *O. parageminus*; đây là loài ký sinh trên vịt ở các tỉnh phía Bắc và được Oshmarin đặt tên năm 1970.

Từ khóa: Vịt, Sán lá gan nhỏ (*Opisthorchis spp.*), Định loài, Sinh học phân tử, Tỉnh Bình Định

Molecular identification for small liver fluke in duck isolated in Binh Dinh province using nuclear genome (ITS-2)

Truong Hoang Phuong, Nguyen Duc Tan,
Nguyen Van Thoai, Nguyen Thi Sam, Nguyen Huu Hung

SUMMARY

A total of 120 small liver flukes in ducks were collected in Binh Dinh province, and their DNA were extracted. A region of nucleotide of ITS2 of the small liver fluke was amplified by PCR. This nucleotide sequence was compared with those in the Genbank through BLAST programme. The comparison result indicated that high similarity level of nucleotide of ITS2 of the isolated small liver flukes in ducks in Binh Dinh province and those of others including: *O. viverrini*, *O. lobatus*, *O. felineus* and *C. sinensis* was identified, the percentages of the changed nucleotides were 0.5%, 1.42%, 3.42% and 2.3%, respectively. The phylogenetic tree analysis of the ITS2 gene showed that the liver fluke in duck in Binh Dinh province belonged to *Opisthorchiidae* family, and had a close phylogenetic relationship to *O. viverrini*, *O. lobatus*. The results of the morphological examinations and the nucleotide sequence analysis of ITS2 illustrated that all morphological features of the small liver fluke in duck in Binh Dinh province were obviously compatible with *Opisthorchiidae* family, *Opisthorchis* genus and *O. parageminus* species. That is a small liver fluke species parasiting in duck in northern provinces, Viet Nam and it was named by Oshmarin in 1970.

Keywords: Duck, Small liver fluke (*Opisthorchis spp.*), Taxonomy, Molecular biology, Binh Dinh province

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bình Định là tỉnh thuộc duyên hải nam Trung Bộ, địa hình vùng đồng bằng thường nằm

trên lưu vực của các con sông hoặc ven biển và được ngăn cách với biển bởi các đầm phá, các đồi cát hay các dãy núi, là vùng có nhiều điều kiện thuận lợi để phát triển chăn nuôi vịt. Nghề nuôi vịt đã có từ lâu và chiếm một vị trí rất quan trọng, góp phần không nhỏ trong việc cải thiện

¹. Sở Khoa học Công nghệ Cần Thơ

². Phân Viện Thú y miền Trung

³. Đại học Cần Thơ

bữa ăn hàng ngày và tăng thu nhập cho người dân. Hàng năm người dân tại đây canh tác từ 2 đến 3 vụ lúa, do vậy vịt cũng được nuôi quanh năm để tận dụng thóc rơi vãi. Tuy nhiên, người chăn nuôi vịt cũng gặp không ít khó khăn về tình hình dịch bệnh, trong đó bệnh ký sinh trùng là một trong những nguyên nhân làm giảm hiệu quả chăn nuôi. Những năm gần đây, theo báo cáo của Chi cục Thú y tỉnh Bình Định, vịt ở đây bị bệnh nhưng chưa rõ nguyên nhân, ảnh hưởng lớn đến ngành chăn nuôi, đặc biệt là đối với vịt đẻ. Vịt thường có những biểu hiện ốm yếu, chậm lớn, giảm sản lượng trứng, tỷ lệ chết khá cao trong đàn nhiễm bệnh. Qua điều tra tình hình thực tế cho thấy, vịt ở đây nhiễm loài sán lá gan nhỏ (họ Opisthorchiidae) ký sinh trong gan và túi mật, gây nên hiện tượng gan viêm, xuất huyết, hoại tử, ảnh hưởng đến chức năng của gan,...

Sán lá gan nhỏ thuộc họ Opisthorchiidae có vòng đời phức tạp (qua 2 ký chủ trung gian), ốc *Bithynia* sp là ký chủ trung gian thứ nhất, cá thuộc họ cá chép như *Cyclocheilichthys*, *Hampala*, *Puntius*,... là ký chủ trung gian thứ 2 (Jong-Yil Chai, 2009), ký chủ cuối cùng là những động vật ăn cá trong đó bao gồm cả người, chó, mèo, các loài gia cầm. Có nhiều loài sán lá gan nhỏ gây bệnh trên người và động vật: *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus*, *O. labotus*, *O. parageminus*,... Mỗi loài sán lá gan nhỏ có những đặc tính riêng, vì vậy, tiến hành xác định loài sán lá gan nhỏ gây bệnh trên vịt ở tỉnh Bình Định bằng kỹ thuật phân tử là việc làm cần thiết.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Tổng số 120 mẫu sán lá gan nhỏ thu thập trên 139 vịt tại tỉnh Bình Định (các huyện An Lão, Vân Canh, Phù Cát, An Nhơn, Phù Mỹ, Tuy Phước) từ năm 2013 đến 2015.

Các mẫu sán trưởng thành thu thập trên vịt ở Bình Định được phân loại dựa theo khóa phân loại của Phan Thế Việt và cs (1977); Nguyễn

Thị Lê (2000); David và cs (2008).

Trình tự cặp mỗi gen nhân (ITS-2) theo Bowles và cs (1993): mỗi xuôi GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG; mỗi ngược TATGCTTAAATTCAGCGGGT (kích thước sản phẩm khoảng 490 bp).

Một số hóa chất, trang thiết bị cần thiết: bộ kit chiết tách ADN tổng số (QIAGEN); bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR (QIAGEN Inc); PCR master mix (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 và một số dụng cụ, hóa chất cần thiết khác trong nghiên cứu sinh học phân tử.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Mô khám vịt thu thập mẫu sán lá gan nhỏ ký sinh trong gan và túi mật. Các mẫu sán được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng. Quy trình chiết tách ADN tổng số thực hiện theo hướng dẫn của hãng sản xuất (QIAGEN).

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: Master mix (25 µl), mỗi xuôi (2 µl), mỗi ngược (2 µl), ADN khuôn (10 µl) và nước tinh khiết (11 µl). Các bước của phản ứng PCR: 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, cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C 10 phút, giữ mẫu 4°C. Kết thúc phản ứng, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2%. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc).

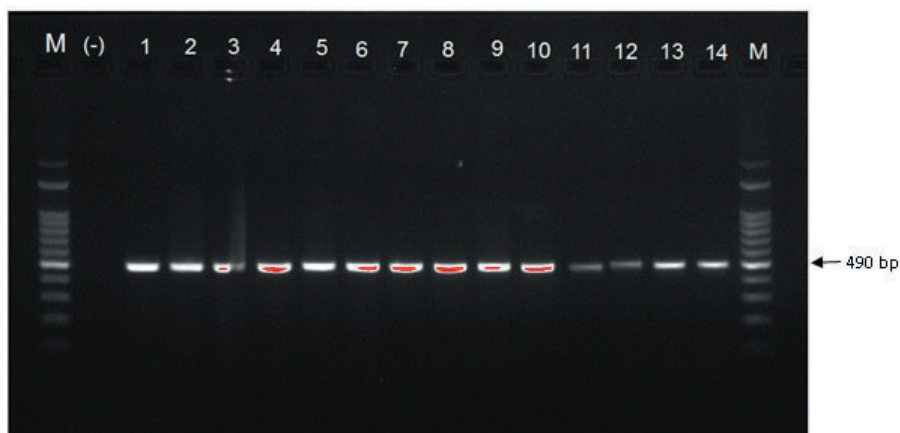
Các bước tách chiết ADN tổng số, thực hiện phản ứng PCR và tinh sạch sản phẩm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Phân viện Thú y miền Trung; các bước giải trình tự gen được thực hiện tại công ty Macrogen - Hàn Quốc.

Sử dụng phần mềm BioEdit 2000 để so sánh trình tự nucleotid của các mẫu sán lá gan nhỏ trên vịt ở Bình Định, sau đó so sánh với ngân hàng gen qua chương trình BLAST để tìm kiếm chuỗi nucleotid tương đồng. Tạo cây phả hệ sử dụng phần mềm Mega 5.1.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phản ứng PCR nhân đoạn gen ITS-2 của sán lá gan nhỏ trên vịt

120 mẫu sán lá gan nhỏ trên vịt tại Bình Định được chiết tách ADN tổng số và thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm được điện di trên thạch agarose 1,2%. Kết quả được biểu thị ở hình 1.



Hình 1. Ảnh đại diện kết quả điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen ITS-2

Ghi chú: M: 100 bp marker. Giếng (-): đối chứng âm.

Các giếng 1 đến 14: mẫu ADN chiết tách từ sán lá gan nhỏ trên vịt ở Bình Định

Kết quả trên cho thấy các mẫu đều nhân lên đoạn gen có độ dài khoảng 490 bp; trong khi đó, các mẫu đối chứng âm đều cho kết quả âm tính. Như vậy với cặp mồi này, phản ứng đã nhân được đoạn gen ITS-2 của sán lá gan nhỏ (*Opisthorchis* sp.).

3.2 Kết quả giải trình tự đoạn gen ITS-2 của sán lá gan nhỏ trên vịt

Sau khi thực hiện phản ứng PCR của 120 mẫu sán, chúng tôi chọn 30 mẫu đại diện cho các địa điểm lấy mẫu (mỗi huyện chọn 5 mẫu) để tinh sạch và giải trình tự đoạn gen nhân (ITS-2). Các chuỗi nucleotid thu nhận được sau khi giải trình tự, được so sánh trình tự nucleotid bằng phần mềm BioEdit. Kết quả so sánh cho thấy 30 mẫu sán lá gan nhỏ trên vịt ở Bình Định đều có trình tự nucleotid giống nhau.

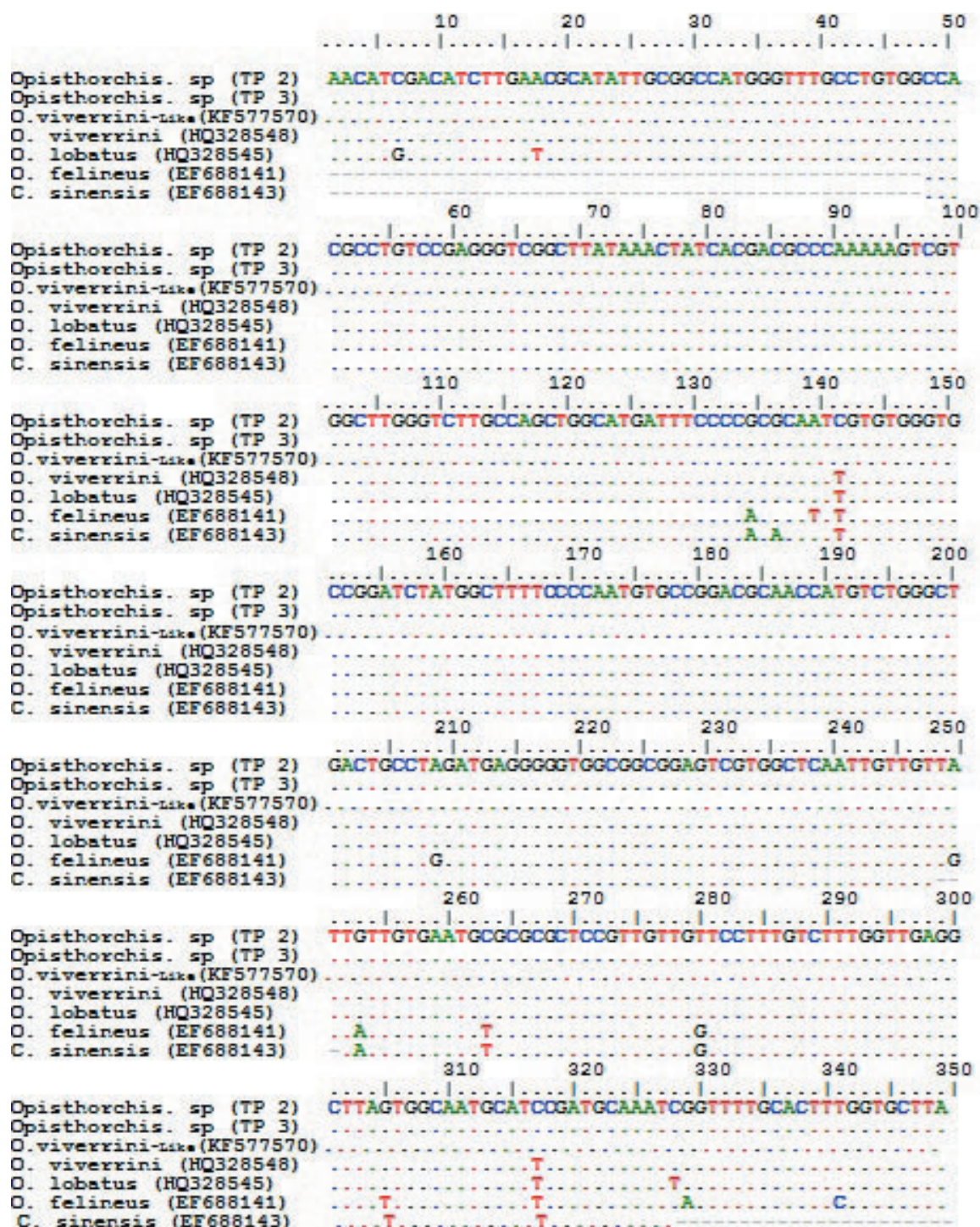
Sau khi so sánh qua phần mềm BioEdit, chuỗi nucleotid gen ITS-2 của sán lá gan nhỏ trên vịt được sử dụng so sánh trên Ngân hàng gen qua chương trình BLAST để tìm kiếm những chuỗi nucleotid tương đồng đã được đăng ký. Kết quả tìm kiếm đã phát hiện các loài sán lá gan nhỏ (*O.*

viverrini, *O. lobatus*, *O. felineus* và *C. sinensis*) có mức độ tương đồng với loài sán lá gan trên vịt ở Bình Định, nhưng có sự sai khác với các loài *O. viverrini*, *O. lobatus*, *O. felineus* và *C. sinensis* lần lượt là 2, 5, 12 và 8 nucleotid, tương ứng với 0,5%, 1,42%, 3,42% và 2,3% (hình 2).

Quan hệ nguồn gốc phả hệ của loài sán lá gan nhỏ thu thập trên vịt ở Bình Định được so sánh với các loài sán lá gan nhỏ khác đã đăng ký trên Ngân hàng gen sử dụng phần mềm MEGA 5.1, cây phả hệ được trình bày ở hình 3. Kết quả phân tích phả hệ ở hình 3 cho thấy, các mẫu sán lá gan nhỏ phân làm 2 nhóm:

Nhóm thứ nhất là các loài *O. viverrini*, *O. lobatus* và mẫu sán trên vịt ở Bình Định. Trong đó, các mẫu sán lá gan nhỏ ở Bình Định tách hẳn ra 1 nhánh khác (mã đăng ký KF577570 là loài sán lá gan nhỏ trên vịt ở huyện Phù Mỹ, Bình Định được Dao H. T và cs, 2014 đăng ký trên Ngân hàng gen).

Nhóm thứ 2 là các loài sán lá gan nhỏ *O. felineus* và *C. sinensis*.



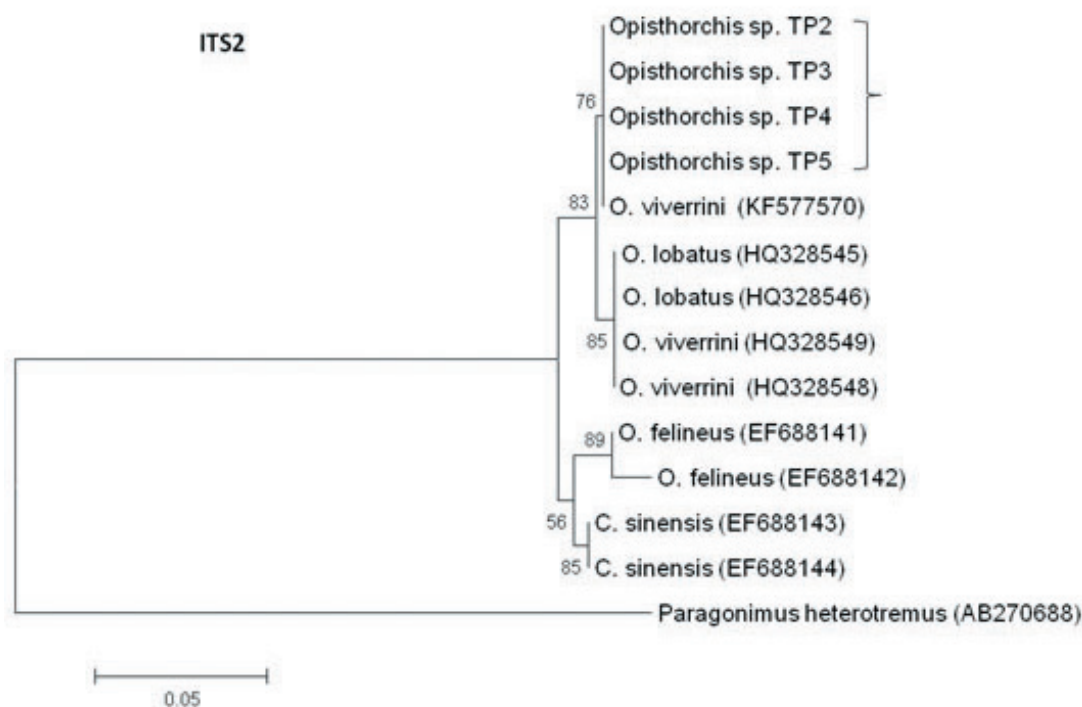
Hình 2. So sánh trình tự 350 nucleotid đoạn gen ITS-2 của sán lá gan nhỏ trên vịt ở Bình Định với các chuỗi nucleotid của sán lá gan nhỏ đã được đăng ký trên ngân hàng gen

Ghi chú: Dấu (.) biểu thị sự giống nhau, sai khác về nucleotid được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng; Tp2, Tp3 là mẫu sán lá gan trên vịt ở Bình Định.

Như vậy, trên cơ sở dữ liệu phân tích di truyền, có thể kết luận rằng các mẫu sán lá gan nhỏ thu thập trên vịt ở Bình Định đều thuộc họ *Opisthorchiidae*. Trong đó, loài *O. viverrini*, *O. lobatus* có mối quan hệ họ hàng gần nhất.

Trước đây, Dao và cs (2014) cho rằng lần đầu tiên phát hiện loài sán lá gan nhỏ (*Opisthorchis*) ký sinh trên vịt ở Việt Nam; nhóm tác giả này cho rằng đây là loài gần giống với *O. viverrini* (*O. viverrini* – like), và đề nghị đặt tên loài mới. Tuy nhiên, Nawa và cs (2015) không đồng ý

với đề nghị trên, nhóm tác giả này cho rằng đã có nhiều loài sán lá gan nhỏ thuộc giống *Opisthorchis* ký sinh trên vịt: *O. cheelis*, *O. longissimus* và *O. parageminus* [2]. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi về hình thái học cho thấy loài sán lá gan nhỏ ký sinh trên vịt ở Bình Định là *O. parageminus*, đây là loài ký sinh trên vịt nước (*Anas platyrhynchos*) ở các tỉnh phía Bắc trước đây và được Oshmarin đặt tên năm 1970, nhưng cho đến nay vẫn chưa được giải trình tự gen.



Hình 3. Cây phả hệ biểu thị mối quan hệ các loài sán lá gan nhỏ dựa trên phân tích trình tự nucleotid gen ITS2, sử dụng phần mềm Mega

Ký hiệu Tp2, Tp3, Tp4, Tp5, KF577570 là mẫu sán lá gan nhỏ trên vịt ở Bình Định

IV. KẾT LUẬN

Phân tích trình tự nucleotid đoạn gen ITS-2 cho thấy, các mẫu sán lá gan nhỏ trên vịt ở Bình Định có trình tự nucleotid giống nhau.

Sán lá gan nhỏ trên vịt ở Bình Định tương đồng với các loài sán lá gan nhỏ trên ngân hàng gen (*O. viverrini*, *O. lobatus*, *O. felineus* và *C.*

sinensis), với sự sai khác lần lượt là 2, 5, 12 và 8 nucleotid, tương ứng với 0,5%, 1,42%, 3,42% và 2,3%. Trên cơ sở dữ liệu phân tích di truyền và cây phả hệ, có thể kết luận rằng các mẫu sán lá gan nhỏ thu thập trên vịt ở Bình Định đều thuộc họ *Opisthorchiidae*. Trong đó, loài *O. viverrini* và *O. lobatus* có mối quan hệ họ hàng gần nhất.

Căn cứ vào hình thái học và trình tự nucleotid, theo chúng tôi sán lá gan nhỏ ký sinh trên vịt ở Bình Định thuộc loài *O. parageminus*; đây là loài ký sinh trên vịt ở các tỉnh phía Bắc và được Oshmarin đặt tên năm 1970.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Lê (2000), Động vật chí Việt Nam: 236–246. *Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hà Nội*.
2. Phan Thế Việt, Nguyễn Thị Kỳ, Nguyễn Thị Lê (1977), Giun sán ký sinh ở động vật Việt Nam. *Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật*, 9-14.
3. Bowles J., Hope M., Tiu W. U., Liu X. & McManus D. P (1993), Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica* 55: 4, 217-229
4. Dao HT, Nguyen GTT, Victor B, Gabriel S, Dorny S (2014), *Opisthorchis viverrini*-like liver fluke in birds from Vietnam: morphological variability and rDNA/mtDNA sequence confirmation. *J Helminthol*; 88 (4):441-6
5. David, I. G., Rodney, A. B., & Arlene, J (2008), *Keys to the Trematoda*. P 10-16.
6. Jong-Yil Chai, Eun-Hee Shin, Soon-Hyung Lee and Han-Jong Rim (2009) Foodborne intestinal Flukes in Southeast Asia. *Korean J Parasitol*. 2009 Oct; 47(Suppl): S69–S102
7. Nawa Y, Doanh PN, Thaenkham U (2015), Is *Opisthorchis viverrini* an avian liver fluke. *J Helminthol*. 2015 Mar;89(2):255-6.

Nhận ngày 19-6-2016

Phản biện ngày 28-8-2016

ĐÍNH CHÍNH

Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y tập XXIII số 6-2016 phát hành tháng 9/2016 có bài: “Tình hình chăn nuôi và bệnh lở mồm long móng trên đàn gia súc của tỉnh Hưng Yên (2010-2014), yếu tố nguy cơ làm lây lan và phát sinh dịch”, trong đó bảng 4, trang 36 có sai sót, nhầm lẫn trong quá trình đánh máy của nhóm tác giả. Ban biên tập Tạp chí xin đính chính lại ở bảng và phần giải thích đúng như sau:

Bảng 4. Kết quả điều tra tỷ lệ tiêm phòng vacxin LMLM tại một số hộ chăn nuôi

TT	Nội dung	Số hộ chăn nuôi trâu, bò (n=115)		Số hộ chăn nuôi lợn (n=422)	
		Số hộ	Tỷ lệ (%)	Số hộ	Tỷ lệ (%)
1	Tiêm vacxin LMLM vô hoạt	109	94,88	385	91,23
2	Không tiêm phòng	6	5,22	37	8,77

Vacxin LMLM vô hoạt là loại được sử dụng với tỷ lệ cao, với 94,88% số hộ chăn nuôi trâu, bò và 91,23% số hộ chăn nuôi lợn.

Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y thành thật cáo lỗi cùng Quý độc giả.

BBT.