

GIÁM ĐỊNH LOÀI SÁN LÁ PHỔI *PARAGONIMUS HETEROTREMUS* CHEN ET HSIA, 1964 Ở VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

LÊ THANH HÒA, NGUYỄN BÍCH NGÀ

Viện Công nghệ sinh học

NGUYỄN VĂN ĐỀ, LÊ ĐÌNH CÔNG

Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương

ĐẶNG TẮT THẾ

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Hiện nay, trên thế giới có khoảng 50 loài sán lá phổi đã được xác định thuộc giống *Paragonimus* Braun, 1899 (tên đồng nghĩa: *Paragonimus* Chen, 1963) và giống có quan hệ họ hàng với *Paragonimus* là *Euparagonimus* Chen, 1962. Các loài sán lá phổi có sự phân bố khá rộng, gồm châu Á (bao gồm ở phía Đông, từ Pakistan đến Đông Nam nước Nga, ở phía Nam, từ Sri Lanka đến Indônêxia và Papua Niu Ghinê), châu Mỹ (bao gồm Canada ở phía Bắc, Brazil và Peru ở Nam Mỹ) và toàn bộ châu Phi [3].

Những trường hợp người bị nhiễm sán lá phổi thuộc giống *Paragonimus* được xác nhận tại Việt Nam vào năm 1993 ở Sìn Hồ (Lai Châu) và nguyên nhân gây bệnh là *Paragonimus heterotremus* [4, 6]. Mặc dù *P. heterotremus* được coi là nguyên nhân gây bệnh sán lá phổi (paragonimiasis) ở Việt Nam, nhưng việc xác định chỉ dựa vào hình thái học và đặc tính gây bệnh trên động vật thí nghiệm là chính. Vấn đề đặt ra là liệu loài *Paragonimus* sp. được xác định bằng hình thái học nói trên có phải là *P. heterotremus* hay không? Vì vậy, việc giám định chính xác để có kết luận cuối cùng về loài này là cần thiết để chính thức công bố nếu thực sự có ít nhất sự tồn tại của *P. heterotremus* ở Việt Nam. Các kết quả giám định này sẽ tạo cơ sở khoa học tiếp theo cho việc giám định những loài *Paragonimus* khác (nếu có) và các chủng khác nhau của *P. heterotremus*.

Các phương pháp phân loại giám định sinh vật dựa trên chỉ thị phân tử ADN đã được phát

triển và ứng dụng rộng rãi, với nguyên lý dựa vào các đặc điểm thay đổi kiểu gen ở mức độ phân tử thay cho phân biệt thay đổi hình thái (kiểu hình) [2, 7]. Độ tin cậy của phương pháp phân tử rất cao, ngay cả khi chưa có biến đổi kiểu hình, cần rất ít mẫu vật, và hoàn toàn không phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển cá thể của sinh vật. Do vậy, việc giám định phân tử rất phù hợp và được ứng dụng để phân biệt các loài ký sinh trùng, vì đặc điểm hình thái của chúng khó nhận biết hơn động vật bậc cao [5]. Hiện nay, toàn bộ chuỗi ADN của hệ gen ty thể (mitochondrial DNA - mtDNA) của nhiều loài sán đẹt, trong đó có sán lá phổi (loài *P. westermani*, Ngân hàng Gen: AF219379) đã được xác định, cũng như có nhiều chuỗi nucleotit của nhiều loài *Paragonimus* khác, tạo điều kiện thuận lợi cho giám định phân tử [1, 2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp giám định loài có độ tin cậy cao nhất hiện nay trên cơ sở trình tự gen ty thể và chính thức xác nhận ít nhất có một loài là *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964, tồn tại và gây bệnh ở Việt Nam, khẳng định việc công bố trước đây về loài này của Kino và cs [4].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Mẫu vật sán lá phổi

Mẫu vật sán lá phổi trưởng thành được thu nhận từ hai tỉnh Lai Châu (ký hiệu PLCVN) và Sơn La (PSLVN). Đây là loài mà qua kiểm tra bằng phương pháp hình thái học được công bố là

Paragonimus heterotremus [4]. Các mẫu vật đều được bảo quản trong cồn 70°, cất giữ ở nhiệt độ -20°C, cho đến khi sử dụng.

2. Chọn chuỗi gen để so sánh

Cho đến nay, ngoài toàn bộ hệ gen ty thể (mtDNA) của *Paragonimus westermani* (Ngân hàng Gen, AF219379), các chuỗi nucleotit khác của nhiều loài *Paragonimus* khác nhau đều là của gen *cytochrome oxidase I (coxI)* và chúng được thu nhận bằng phản ứng nhân bản gen PCR (polymerase chain reaction). Chúng tôi chọn gen *coxI* vì gen này có độ bảo tồn rất cao trong hệ gen ty thể [7] để làm số liệu so sánh trong giám định loài *Paragonimus* sp. của Việt nam.

3. Tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết bằng bộ hoá chất DNeasy Tissue Kit (QIAGEN Inc.) theo quy trình của nhà sản xuất. Mô tả rút gọn như sau: mẫu vật bảo quản trong cồn 70° được lấy ra và cho cồn bay hơi hết, sau đó rửa nhiều lần trong PBS. Mẫu vật được nghiền kỹ và xử lý với các dung môi của Kit, rồi hấp phụ lên màng và ly chiết ADN theo quy trình tách chiết. Hàm lượng ADN sử dụng cho mỗi phản ứng PCR (50 microlit) là khoảng 150 nanogam.

4. Môi (primer) và tiến hành phản ứng PCR

Cặp môi được thiết kế để dùng trong nhân bản ADN đích bằng phản ứng PCR dựa trên cơ sở các trình tự bảo tồn của gen *coxI*. Môi xuôi JB3F: 5' TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTT AT3' và môi ngược JB4.5R: 5'TAAAGAAAGA ACATAATGAAAATG3'. ADN đích đã được nhân bản bằng PCR tiêu chuẩn với bộ hoá chất PCR Master Mix Kit (Promega). Chu trình nhiệt của PCR trên máy Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Inc., Mỹ) gồm các bước như sau: 94°C - 5 phút,

35 chu kỳ tiếp theo: 94°C - 1 phút, 52°C - 1 phút và 72°C - 1 phút, chu kỳ cuối kéo dài 10 phút ở 72°C.

5. Giải trình trình tự và xử lý số liệu

Sản phẩm PCR được tinh chế bằng bộ hoá chất QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.) và được giải trình tự trực tiếp hoặc dòng hoá vào vectơ pCR2.1 của bộ hoá chất TA-cloning Kit (Invitrogen Inc.) và chọn lọc khuẩn lạc theo phương pháp kháng sinh và chỉ thị màu. Tách chiết ADN của plasmid có chứa PCR được thực hiện với bộ hoá chất QIAprep Spin Plasmid Extraction Kit (QIAGEN Inc.). Chuỗi ADN được giải trình tự trên máy động ABI 377 PRISM (Perkin- Elmer) và thực hiện với nhiều plasmid tái tổ hợp nhằm thu được kết quả chính xác. Các trình tự tương ứng với đoạn ADN nghiên cứu từ một số quần thể thuộc giống *Paragonimus* đã được công bố [2] và đăng ký tại Ngân hàng Gen, được sử dụng để so sánh đối chiếu. Sắp xếp, đối chiếu trình tự tương ứng của từng đoạn gen bằng hệ chương trình máy tính AsemblyLIGN 1.9 và MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Inc.). Trình tự axit amin được dịch mã theo bảng mã di truyền mt-DNA số 21 của sán dẹt (platyhelminth mitochondrial code) giới thiệu trong Ngân hàng Gen. Phả hệ sơ bộ được xử lý bằng chương trình phụ trong hệ MacVector 6.5.3.

6. Địa điểm tiến hành giám định

Công việc giám định phân tử và giải trình tự được tiến hành tại phòng thí nghiệm Ký sinh trùng học phân tử thuộc Viện nghiên cứu Y học Queensland, Ôxtrâyliá.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đối chiếu phân tử và so sánh phân đoạn gen *coxI*

A.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*
PhetChina	:	TTTAATTTTGCCCTGGATTGGTGTGTGAGACATATCTGCATGACTTTGACTAATAAAGATTCTTTGTTCCGGTTATTATGGCTTGGTTTTTGCC	:	94					
PhetThai	:	:	94					
PSLVN1	:T.....	:	94					
PSLVN2	:T.....T.....	:	94					
PLCVN1	:T.....T.....	:	94					
PLCVN3	:T.....C.....	:	94					
PLCVN4	:T.....	:	94					
Pbangkok_H	:	.C.G...C.A..C..G...G...T..C..T.....GC...T.....G...G..C..T	:	94					
P_harinasu	:	..G...A..G...A...A..T...T...GC...T...C...G...G..C..T	:	94					
P_siamensi	:	..G...T...GA...T..T...G...T...GC...T...G..A..G...G	:	94					
Piloktsuen	:A..A...GA...T..T...C.A...G...T...A...G...T	:	94					
Pmacrorchi	:A..G...T..T...G..A...C..C...T...T...A.....	:	94					

```

PMexEcuado : ...G.....C.....G....T.....T..T.....T.....T.....G..A.....G : 94
PohiraiKin : .....A..A.....GA.....T..T.....C.A.....T.....G.....T.....A.....G.....T : 94
PohiraiTan : .....A..A.....GA.....T..T.....C.A.....G.....T..C.....A.....G.....T : 94

          100          *          120          *          140          *          160          *          180
PhetChina : ATGGGGGCTATTGTGTGTTTGGGGAGGGTTGTTTGAGCGCACCATATGTTTATGGTTGGTTTAGATGTCAGACTGCTGTTTTTTTAGTTCTG : 188
PhetThai : ..... : 188
PSLVN1 : .....T..... : 188
PSLVN2 : .....C.....T..... : 188
PLCVN1 : .....C..... : 188
PLCVN3 : .....C..... : 188
PLCVN4 : .....C..... : 188
Pbangkok_H : ...A..G....T.....T..T....G..G..T..T.....G....T....C..G..G.....A.... : 188
P_harinasu : .....G....T.....T..T....G..G..C..T.....T.....C..G..G.....A.... : 188
P_siamensi : .....A....T.....A..T....G..G....T.....G....T.....G.....G..... : 188
Pilotksuen : .....G.....A..T....C..G..C.....G....T.....A..A....C..A.... : 188
Pmacrorchi : .....T.....T..G....G....T.....C.T.....T.....C..... : 188
PMexEcuado : .....C..A....A..A....A..T.....G....T.....C.....G..... : 188
PohiraiKin : .....G.....A..T....C..G..C.....G....T.....A..A....C..A.... : 188
PohiraiTan : .....G.....A..T....C..G..C.....G....T.....A..A....C..A.... : 188

          *          200          *          220          *          240          *          260          *          280
PhetChina : TTACTGGGGTGATGGGATCCCACAGGGATTAAGTTTTTCTTGGTTGTTATGTTGGGGGGACTCGTTTACGGTTTTGAGATCCGGTGGT : 282
PhetThai : ..... : 282
PSLVN1 : ..... : 282
PSLVN2 : ..... : 282
PLCVN1 : ..... : 282
PLCVN3 : .....T..... : 282
PLCVN4 : .....C..... : 282
Pbangkok_H : ...G.....A..T..C..G.....T.....G.....T..AA : 282
P_harinasu : ...A....T..C..G.....C.....T..C.....G.....T..AA : 282
P_siamensi : .C..C....T.....A..T..G..T.....A..A..C....A..T..G.....G..TC....G.....T..CT : 282
Pilotksuen : ...G.....A..T....T.....A.....A.....C.....C.....G.....T..AA : 282
Pmacrorchi : ...G.....T....T..G..T.....C..A....A....C.....G.....C..AA : 282
PMexEcuado : .....T.....T....T..G.....A..T..T.....G..A..C.....T.... : 282
PohiraiKin : ...G.....A..T....T.....A.....A.....T.....C.....G.....T..AA : 282
PohiraiTan : ...G.....A..T....T.....A.....A.....T.....C.....G.....T..AA : 282

          *          300          *          320          *          340          *          360          *
PhetChina : TTGGTGAATTTTAGGCTTTATTTTTCTTTTACTATTGGTGGTGAACGGGATTATTTGTCTTCTTCTATTTTGGATAGTCTGTGTACATGAT : 376
PhetThai : ..... : 376
PSLVN1 : .....C..... : 376
PSLVN2 : ..... : 376
PLCVN1 : ..... : 376
PLCVN3 : ..... : 376
PLCVN4 : .....A..... : 376
Pbangkok_H : A.....G..G....C....G.....C..G..G.....A.....C....C....T...G....C : 376
P_harinasu : A.....G..A.....G.....G.....G.....A.....T...G..... : 376
P_siamensi : G....G....C..T..T..C....CT..G.....A.....G..C..T..G.....C....A..A.....T...G..... : 376
Pilotksuen : A..A....C..T..G....C....T..G....A..A..G....A....C.....C....T..A..G....C : 376
Pmacrorchi : ...A.....G..A.....A.....G..G..G.....A.....T...G..... : 376
PMexEcuado : G..A..G....G.....C..A.....A.....C....T.....G..... : 376
PohiraiKin : A..A....C..T..G....C....T..G....A..A..G....A....C.....C....T..A..G....C : 376
PohiraiTan : A..A....C..T..G....C....T..G....A..A..G....A....C.....C....T..A..G....C : 376

```

B.

```

          *          20          *          40          *          60          *
PhetChina : LILPGFVGVSHICMTLTNNDSLFGYYGLVFMAGAIVCLGSVVWAHHMFMVGLDVKTAFFSSVTGVIPIPT : 71
PhetThai : ..... : 71
PSLVN1 : ..... : 71
PSLVN2 : ..... : 71
PLCVN1 : ..... : 71
PLCVN3 : ..... : 71
PLCVN4 : ..... : 71
Pbangkok : ..... : 71
P_harinasu : ..... : 71
P_siamensi : .....I..... : 71
P_iloktsuen : .....I..... : 71
P_macrorchi : ..... : 71
P_mexicanus : ..... : 71
P_ohirai1 : .....I..... : 71
P_ohirai2 : .....I..... : 71
P_sado : .....I..... : 71

          80          *          100          *          120
PhetChina : GIKVFSWLFMLGGTRLRFWDPVVWVILGFIFLFTIGGVTGIILSSSILDSLHDTWV : 129
PhetThai : ..... : 129
PSLVN1 : ..... : 129
PSLVN2 : ..... : 129

```

PLCVN1	:	:	129
PLCVN3	:	:	129
PLCVN4	:	:	129
P_bangkok	:I.....	:	129
P_harinasu	:I.....	:	129
P_siamensis	:A...L...L.....V.....	:	129
P_iloktsuen	:I.....	:	129
P_macrorchi	:I.....	:	129
P_mexicanus	:	:	129
P_ohirail	:I.....	:	129
P_ohirai2	:I.....	:	129
P_sadoensis	:I.....	:	129

Hình 1. So sánh trình tự nucleotit (A) và axit amin (B) của đoạn gen *cox1* của một số chủng *Paragonimus* sp. của Việt Nam với các chủng *P. heterotremus* của Trung Quốc và Thái Lan, cũng như của các loài khác nhau trên thế giới

Ghi chú: dấu (.) : biểu thị giống với trình tự *P. heterotremus* của Trung Quốc; sai khác về nucleotit hoặc axit amin được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng. PhetChina và PhetThai: *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964 (chủng Trung Quốc và chủng Thái Lan); PSLVN: *Paragonimus* sp. Việt Nam (chủng Sơn La); PLCVN: *Paragonimus* sp. Việt Nam (chủng Lai Châu); P_bangkok: *P. bangkokensis* Miyazaki and Vajrasthira, 1967; P_harinasu: *P. harinasutai* Miyazaki and Vajrasthira, 1968; P_siamensis: *P. siamensis* Miyazaki and Wykoff, 1965; P_iloktsuen: *P. iloktsuenensis* Chen, 1940; P_macrorchi: *P. macrorchis* Chen, 1962; P_mexicanus: *P. mexicanus* Miyazaki and Ishii, 1968; P_sadoensis: *P. sadoensis* Miyazaki, Kawashima, Hamajima and Otsuru, 1968.

Hình 1A cho thấy trình tự nucleotit của đoạn gen *cox1* của *Paragonimus heterotremus* của Trung Quốc và Thái Lan là hoàn toàn giống nhau. Các chủng *Paragonimus* sp. của Việt Nam thu nhận tại Sơn La (ký hiệu PSLVN1 và PSLVN2) chỉ sai khác 4 nucleotit và các chủng thu nhận tại Lai Châu (ký hiệu PLCVN1, PLCVN3, PLCVN4) chỉ sai khác 3-4 nucleotit, cho mức độ tương đồng là 99,0-99,2%. Sai khác giữa các chủng *Paragonimus* sp. của Việt Nam với trình tự của các loài khác, ví dụ với loài *P. ohirai* là 55/376, do vậy mức độ tương đồng là rất thấp (85,4%); hoặc với loài *P. siamensis* là 62/376, tỷ lệ tương đồng chỉ đạt 83,5%.

Trình tự axit amin ở tất cả các chủng của *P. heterotremus* của Việt Nam, Trung Quốc và Thái Lan là hoàn toàn giống nhau. Thành phần axit amin của các loài khác cũng không thay đổi lớn, trừ loài *P. siamensis* (5/129, đạt 3,9%), chúng tỏ sự thay đổi về nucleotit không hoặc làm thay đổi rất ít axit amin trong thành phần của đoạn gen *cox1* nghiên cứu (hình 1B).

2. Sơ bộ xem xét quan hệ loài của *P. heterotremus* của Việt Nam

Hình 2 biểu thị sơ bộ phả hệ và phân nhóm của các loài và các chủng trong giống *Paragonimus*. Các loài chọn lọc để phân tích phả hệ bao gồm những loài ở châu Á và nhiều

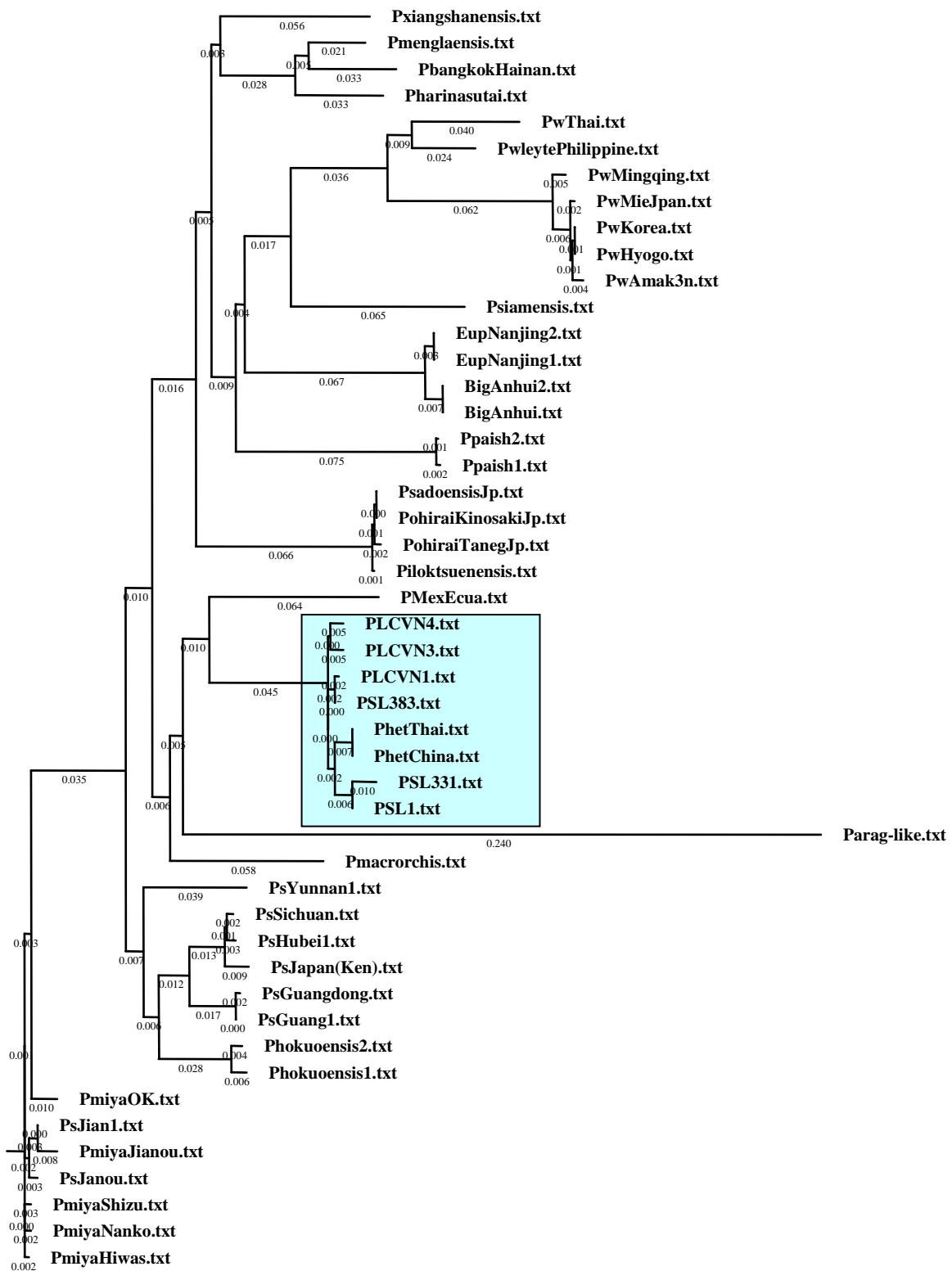
loài ở các châu khác nhằm đảm bảo tính khách quan của sự phân tích. Nói chung, các chủng cùng 1 loài đều được phân nhóm cùng nhau, ví dụ loài *P. myiazaki* của Nhật Bản hay loài *P. skrjabini*. Tất cả các chủng trong loài *Paragonimus* sp. của Việt Nam và *Paragonimus heterotremus* của Trung Quốc và Thái Lan đều nằm chung trong một nhóm, trong nhánh phả hệ khác với mọi loài khác (hình 2).

Tỷ lệ tương đồng về nucleotit cũng như axit amin có thể coi là tuyệt đối của các chủng trong loài *Paragonimus* sp. của Việt Nam (trên 99%) và phân nhóm hoàn toàn cùng với *Paragonimus heterotremus* của Trung quốc và Thái lan, cho phép chúng ta kết luận loài *Paragonimus* sp. của Việt Nam (chủng Lai Châu và Sơn La) là *Paragonimus heterotremus* qua so sánh phân tích trình tự và sắp xếp phả hệ.

III. KẾT LUẬN

1. Giám định sinh học phân tử chính thức cho thấy các mẫu sán lá phổi *Paragonimus* sp. của Việt Nam (chủng Lai Châu và Sơn La) là *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964.

2. *Paragonimus heterotremus* của Việt Nam có mức độ tương đồng phân tử rất cao với *P. heterotremus* của Trung Quốc và Thái Lan (trên 99,0% về nucleotit và 100% về axit amin).



Hình 2. Sơ bộ phả hệ dựa trên trình tự nucleotit của đoạn gen *cox1* của một số chủng *Paragonimus* sp. của Việt Nam với các chủng *P. heterotremus* của Trung Quốc và Thái Lan, và các loài khác nhau trên thế giới. *Paragonimus* sp. của Việt Nam được liệt kê vào cùng nhóm với *P. heterotremus* của Trung Quốc và Thái Lan

3. Sơ bộ phân định phả hệ cho thấy *P. heterotremus* của Việt Nam là hoàn toàn cùng nhóm với *P. heterotremus* của Trung Quốc và Thái Lan, nhưng khác xa với các loài *Paragonimus* khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Blair D.**, 1993: Acta Trop., 53: 227-289.
2. **Blair D. et al.**, 1998: *Proceedings of the 9th International Congress of Parasitology*. Chiba, Japan: 643-647.
3. **Blair D., Xu Z. B. and Agatsuma T.**, 1999: Adv. Parasitol., 42: 113-222.
4. **Kino H. et al.**, 1995: Jpn. J. Parasitol., 44: 470-472.
5. **Mc Manus D. P. and Bowles J.**, 1996: Int. J. Parasitol., 26: 687-704.
6. **Nguyễn Thị Lê, Đặng Tất Thế, Phạm Ngọc Doanh**, 1997: Tạp chí Y học Việt Nam, 2: 35- 40.
7. **Lê Thanh Hòa và Mc Manus D. P.**, 2001: Tập san Sinh học - Hội nghị quốc tế về sinh học. Hà Nội 2-4/7/2001: 101-108.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF PARAGONIMUS HETEROTREMUS CHEN ET HSIA, 1964 IN VIETNAM

LE THANH HOA, NGUYEN BICH NGA,
NGUYEN VAN DE, LE DINH CONG, ĐANG TAT THE

SUMMARY

A region of 376 nucleotides of the mitochondrial-encoded *cox1* gene from 6 samples of *Paragonimus* sp. collected in the Laichau and Sonla provinces was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and comparatively aligned with the known corresponding sequences of *Paragonimus heterotremus* (geographical origin of China and Thailand) and representative species of the *Paragonimus* genus (GenBank and published data). Molecular-based analysis revealed that *Paragonimus* sp. of Vietnam is *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964, showing high nucleotide similarity to that of China and Thailand strains (over 99%). Phylogenetic analysis uniquely groups the *Paragonimus* sp. of Vietnam with the *Paragonimus heterotremus* of China and Thailand.

Ngày nhận bài: 16-11-2001