

## ĐỊNH LOẠI SÁN LÁ GAN LỚN (GIỐNG *FASCIOLA*) Ở NGƯỜI VÀ GIA SÚC BẰNG CHỈ THỊ ADN

ĐẶNG TẮT THỂ

*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*

LÊ QUANG HÙNG

*Sở Y tế tỉnh Bình Định*

CAO VĂN VIÊN

*Viện Y học lâm sàng các bệnh nhiệt đới*

Các loài sán lá gan lớn thuộc giống *Fasciola* là những ký sinh trùng nguy hiểm đối với người và gia súc. Nhiều tác giả đã ghi nhận hai loài sán lá gan lớn *Fasciola hepatica* và *F. gigantica* ký sinh ở người và gia súc ở Việt Nam [3]. Hai loài này giống nhau ở nhiều đặc điểm hình thái, sinh thái, sinh học, nên việc định loại chúng trên cơ sở hình thái rất dễ nhầm lẫn. Vì vậy, các số liệu điều tra về sán lá gan lớn ở nước ta còn nhiều mâu thuẫn, ví dụ, ở Bắc bộ, Houdemer (1938) công bố có 64,7% trâu bị nhiễm *F. hepatica* và 23,5% bò bị nhiễm *F. gigantica*, nhưng Drozd (1967) lại công bố 76,9% trâu bị nhiễm *F. gigantica* và chỉ có một con trâu ở Tuyên Quang bị nhiễm *F. hepatica* [2]. Đã có một số công bố về người Việt Nam bị nhiễm *F. hepatica*, nhưng không có các bằng chứng xác đáng về mặt định loại [4]. Cho đến nay, chưa có công trình nào nghiên cứu sâu về phân loại học đối với *F. hepatica*. Vì vậy, vấn đề có một hay hai loài sán lá gan lớn ở Việt Nam và loài nào ký sinh ở người vẫn chưa được giải đáp.

Trong vài năm gần đây, đã có hàng trăm bệnh nhân mắc bệnh sán lá gan lớn được ghi nhận, chủ yếu ở miền Trung nước ta và có thể có hàng chục nghìn người ở Việt Nam bị nhiễm loại sán này nhưng chưa được phát hiện. Việc xác định *F. gigantica* hay *F. hepatica* ký sinh ở người là rất quan trọng, sẽ tạo cơ sở cho việc lựa chọn và phát triển các phương pháp chẩn đoán thích hợp và phòng trị bệnh có hiệu quả, vì sự gây bệnh của chúng có một số đặc điểm riêng. Mặc dù cả hai loài sán này đều chưa hoàn toàn thích nghi với đời sống ký sinh ở người, nhưng

*F. hepatica* thích nghi tốt hơn, khả năng phát triển đến trưởng thành khá cao, nên phương pháp chẩn đoán *F. hepatica* qua soi phân tìm trứng vẫn có giá trị. Ngược lại, *F. gigantica* rất ít khi phát triển đến trưởng thành và thường di chuyển lạc chỗ. Hơn nữa, thời gian sán lá gan lớn phát triển đến trưởng thành rất dài và là thời kỳ gây bệnh tích nặng cho vật chủ. Vì vậy, hiện nay chỉ có phương pháp chẩn đoán trên cơ sở phản ứng miễn dịch là thích hợp đối với bệnh do *F. gigantica* gây ra ở người và bệnh do sán lá gan lớn chưa trưởng thành gây ra ở người và động vật nói chung. Vấn đề quan trọng hàng đầu là phải xác định chính xác loài sán gây bệnh để phát triển các chẩn đoán miễn dịch đặc hiệu và tạo cơ sở khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo để phòng trị bệnh sán lá gan lớn.

Phương pháp phân loại, giám định sinh vật dựa trên trình tự ADN của bộ gien ty thể (mitochondrial DNA- mtDNA) và kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) đặc hiệu đang được dùng phổ biến. Lợi thế của phương pháp là cho kết quả có độ tin cậy cao, cần ít vật mẫu và không phụ thuộc vào giai đoạn phát triển cá thể của sinh vật, nên rất phù hợp cho giám định loài sán lá gan lớn ký sinh ở người [9-11]. Mặc dù việc thu mẫu sán lá gan lớn ở người là hết sức khó khăn, nhưng về mặt dịch tễ học, bệnh sán lá gan lớn là bệnh lây truyền giữa người và động vật, chủ yếu là trâu, bò, do đó việc xác định loài sán lá gan lớn ở các gia súc này sẽ là các bằng chứng gián tiếp về loài sán ký sinh ở người. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã kết hợp cả hai phương pháp trên, nhằm đảm bảo độ tin

cây cao và tính hiệu quả khi khảo sát số lượng mẫu lớn.

## I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Phân tích trình tự ADN

Mẫu vật sử dụng trong phương pháp này bao gồm: F.hC là *F. hepatica* thu được từ Ôxtrâyli (hình 1, F.hC), F.sp1 và F.sp2 thu được từ bệnh nhân, trong đó F.sp1 là cá thể sán non, F.sp2 gồm hơn 200 trứng có cấu tạo của trứng sán giống *Fasciola*, thu được tại tỉnh Bình Định. Các mẫu F.sp3, F.sp4, F.sp5 và F.sp6 là các cá thể sán lá gan lớn thu từ bò ở tỉnh Bình Định, trong đó F.sp3 và F.sp4 có hình thái ngoài điển hình của *F. gigantica* (hình 1, nhóm F.g), F.sp5 và F.sp6 có hình thái ngoài trung gian giữa *F. hepatica* và *F. gigantica* (hình 1, nhóm F.hg). Các tiêu bản được định hình trong cồn 90%, trừ tiêu bản trứng sán (F.sp2) được định hình sau khi nuôi đến giai đoạn miracidium.

Cặp mồi được thiết kế để nhân bản một đoạn ADN dài 518 bp của gen cytochrom c oxydaza subunit 1 (CO1) trong hệ gen ty thể của cả *F. hepatica* và *F. gigantica*. Ký hiệu và trình tự của cặp mồi là FF-TGGTTTTTTGGGCATCCTGAG và FR-ATAACCAGTCACAAC AGGCCAC. ADN tổng số được tách chiết bằng bộ hóa chất QIAamp blood and tissue Kit (QIAGEN Inc.) theo quy trình của nhà sản xuất. ADN đích đã được nhân bản bằng PCR tiêu chuẩn với bộ hóa chất GeneAmp® PCR Reagent Kit (Perkin-Elmer). Chu trình nhiệt của PCR trên máy PTC 100 (MJ. Research Inc., Mỹ) gồm bước biến tính ở 94°C - 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ: 94°C - 1 phút, 50°C - 1,5 phút và 72°C - 1 phút, chu kỳ cuối kéo dài 5 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được tinh chế bằng bộ hóa chất QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Inc.) và được giải trình tự trực tiếp sợi đôi ADN với cả 2 mồi PCR, nhằm thu được kết quả chính xác. Giải trình tự được tiến hành với bộ hóa chất FS-DNA sequencing kit theo qui trình của nhà sản xuất và máy tự động ABI 377 PRISM (Perkin Elmer). Đối chiếu các trình tự thu được với các trình tự tương đồng từ một số quần thể sán *Fasciola* đã được các tác giả khác trên thế giới công bố trong ngân hàng gen (GenBank), nhằm xác nhận trình tự đích và phân tích di truyền.

Trình tự axit amin được dịch theo bảng mã di truyền mt-ADN của giun đẹt.

### 2. Chẩn đoán phân biệt *F. hepatica* và *F. gigantica* bằng kỹ thuật PCR đặc hiệu

Mẫu sán lá gan lớn được thu từ trâu, bò ở hai vùng Bình Định và Khánh Hòa. Để sán chết tự nhiên trước khi định hình trong cồn 70%, nhằm tránh biến dạng hình thái ngoài của mẫu vật. ADN tổng số được tách chiết bằng BioRad Chelex 100™, theo quy trình của Hillis et al., 1996. Cặp mồi để nhân bản đoạn ADN đặc hiệu cho loài *F. gigantica* được thiết kế từ đoạn trình tự dị biệt giữa *F. hepatica* và *F. gigantica* qua so sánh các trình tự thu được từ các mẫu trên. Ký hiệu và trình tự cặp mồi là Fg-TTAGTCATATTTGTGTGCTT và Rg-CAAAACCAACAATCCATCAT, nhân bản đoạn ADN dài 279 bp. Nhằm nhân bản đúng đoạn ADN đích và đặc hiệu cho loài *F. gigantica* của cặp mồi Fg, Rg, chúng tôi đã dùng kỹ thuật PCR lồng (nested PCR) với 2 cặp mồi FF, FR và Fg, Rg. Sản phẩm PCR của cặp mồi ngoài FF và FR được sử dụng để giải trình tự, đồng thời làm ADN khuôn mẫu cho PCR với cặp mồi trong Fg và Rg. Chu trình nhiệt của PCR với cặp mồi Fg và Rg gồm bước biến tính ở 94°C - 3 phút, tiếp theo là 33 chu kỳ: 94°C - 30 giây, 50°C - 45 giây và 72°C - 1 phút, chu kỳ cuối kéo dài 3 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được tách bằng điện di với gel agarosa 1,5%, nhuộm ethidium bromit và chụp ảnh gel dưới tia UV.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Độ tương đồng của 350 trình tự ADN nghiên cứu so với các trình tự tương đồng của *F. gigantica* ở Indônêxia (F.g(Ind)), Hàn Quốc (F.g(Kor)), Nhật Bản (F.g(Jap)) và của *F. hepatica* ở Mỹ (F.h(USA)), Ôxtrâyli (F.h(Aus)) được trình bày trong bảng 1 cho thấy: độ tương đồng của tất cả các trình tự của F.spVN ở Việt Nam nằm trong khoảng từ 99,1-99,7 và không có sự khác biệt giữa sán ký sinh ở người so với sán *F. gigantica* và sán có hình thái trung gian (F.hg) ở gia súc. Độ tương đồng của các trình tự F.sp ở Việt Nam so với các trình tự của *F. gigantica* ở Indônêxia, Hàn Quốc và Nhật Bản là 98,6-100, riêng với F.g(Kor), F.g(Jap) là 99,4-100. Độ tương đồng về trình tự của *F.*

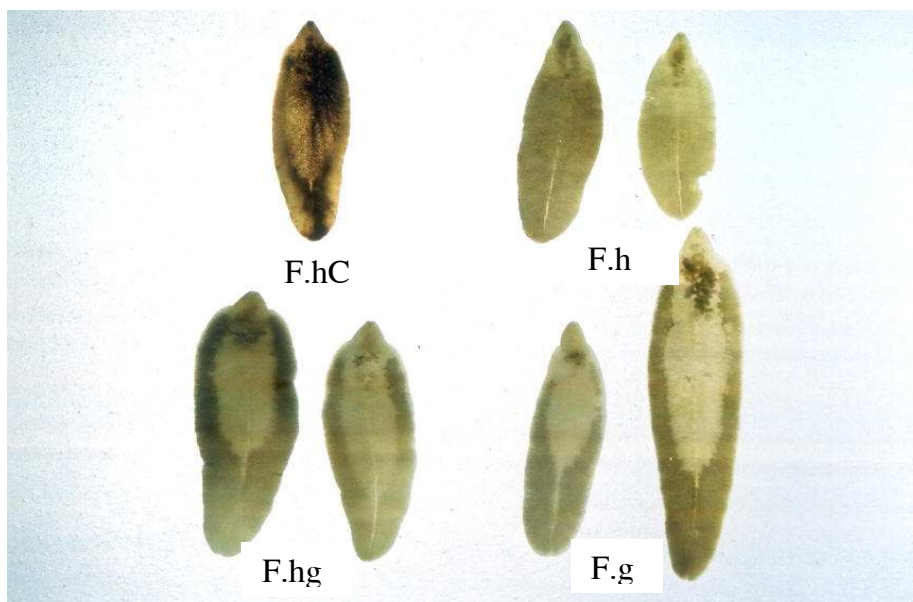
*hepatica* ở Mỹ so Ôxtrâylia rất cao (99,4), nhưng khá thấp so với tất cả các trình tự của F.sp ở Việt Nam và F.g ở các nước trên (92,3-93,7). So sánh trình tự axit amin của F.sp ở Việt Nam và *F. gigantea* của các nước còn lại cho thấy chỉ có 2 axit amin thay thế, nhưng đều

thuộc F.g của Indônêxia. Có 3 axit amin thay đổi giữa F.h(USA), F.h(Aus) so với các F.sp của Việt Nam và *F. gigantea* của các nước khác. Các chỉ tiêu trên cho thấy có sự phân hóa cao về mặt di truyền giữa *F. hepatica* và *F. gigantea* và chứng tỏ chúng là hai loài phân biệt.

Bảng 1

Độ tương đồng trình tự của một số quần thể sán *F. hepatica* và *F. gigantea*

Trình tự	F.sp.1 (Vn)	F.sp.2 (Vn)	F.sp.3 (Vn)	F.sp.4 (Vn)	F.sp.5 (Vn)	F.sp.6 (Vn)	F.g (Ind)	F.g (Kor)	F.g (Jap)	F.h (USA)	F.h (Aus)
F.sp1 (Vn)	100,0										
F.sp2 (Vn)	99,4	100,0									
F.sp3 (Vn)	99,4	99,4	100,0								
F.sp4 (Vn)	99,7	99,7	99,1	100,0							
F.sp5 (Vn)	99,1	99,4	99,4	99,1	100,0						
F.sp6 (Vn)	99,1	99,7	99,1	99,7	99,1	100,0					
F.g (Ind)	98,6	98,9	98,6	98,9	98,6	98,6	100,0				
F.g (Kor)	99,4	100,0	99,7	99,7	99,4	99,7	98,9	100,0			
F.g (Jap)	99,4	100,0	99,7	99,7	99,4	99,7	98,9	100,0	100,0		
F.h (USA)	93,5	92,8	92,8	93,1	92,8	92,6	92,3	93,1	93,1	100	
F.h (Aus)	93,7	93,1	93,1	93,5	93,1	93,1	92,8	93,5	93,5	99,4	100,0

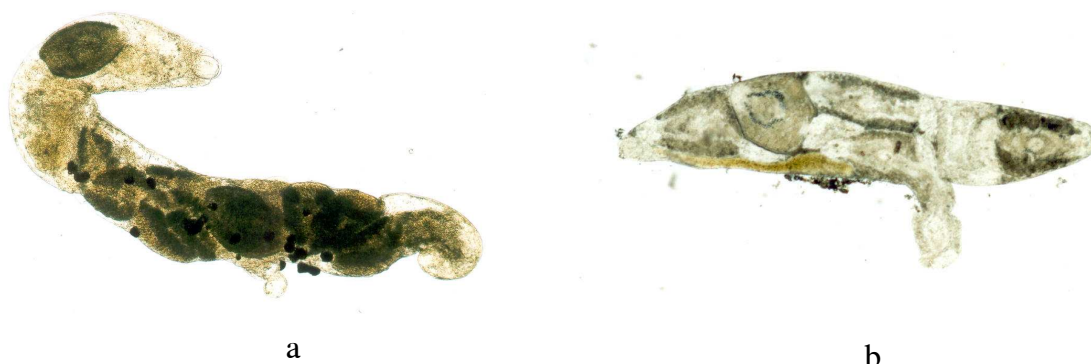


Hình 1. Các dạng hình thái ngoài của quần thể sán lá gan lớn ở trâu, bò hai vùng Bình Định và Khánh Hòa. F.hC- *F. hepatica* chuẩn, mẫu thu được ở Ôxtrâylia, Nhóm F.h- giống *F. hepatica*; nhóm F.hg- trung gian giữa *F. hepatica* và *F. gigantea*; nhóm F.g- *F. gigantea*.

Kết quả nghiên cứu này là xác nhận lần đầu tiên về loài *F.gigantica* ký sinh ở người Việt Nam, đồng thời cảnh báo chúng ta về nguy cơ bị nhiễm loài sán này, vì chúng rất phổ biến ở gia súc ăn cỏ ở nước ta. Kết quả cũng cho thấy quần thể *F.gigantica* ở nước ta có biến dị hình thái ngoài rất lớn, rất dễ gây nhầm lẫn trong định loại. Mức độ phân hóa di truyền là rất thấp giữa các quần thể *F.gigantica* ở Việt Nam và một số nước Nam Á, trừ quần thể *F.gigantica* ở Indônêxia, có lẽ do sự cách biệt địa lý khá lớn của quốc đảo này.

Phân tích 1350 mẫu sán lá gan lớn thu được từ 7 con trâu và 12 con bò ở hai vùng Bình Định

và Khánh Hòa, trong đó có 269 mẫu sán ở trâu và 1081 mẫu sán ở bò. Số mẫu vật này đã được phân loại thành 3 nhóm trên cơ sở hình thái ngoài của chúng: nhóm F.h có hình dạng giống *F. hepatica*, nhóm F.hg có dạng trung gian giữa *F. hepatica* và *F. gigantea* và nhóm F.g có dạng giống *F. gigantea* (hình1). Số lượng sán, tỷ lệ các nhóm theo vật chủ được trình bày trong bảng 2 và cho thấy dạng Fh và Fhg có tỷ lệ cao hơn nhiều ở trâu so với bò. Ngoài ra, trong khi khảo sát ấu trùng của sán lá gan lớn ở giống ốc *Lymnaea* tỉnh Bình Định, chúng tôi đã thu được một loại redia con chứa 10 cercaria, trong khi thông thường redia con của *F. gigantea* chứa 5-6 cercaria (hình 2).



Hình 2. a- redia con chứa 10 cercaria; b- redia con của *F. gigantea*

Bảng 2

Số lượng sán và tỷ lệ của các nhóm theo vật chủ

Nhóm	Vật chủ	Trâu		Bò	
		Số lượng sán (con)	Tỷ lệ (%)	Số lượng sán (con)	Tỷ lệ (%)
F.h		57	21,2	23	2,1
F.hg		77	28,6	52	4,8
F.g		135	50,2	1006	93,1

Các thực nghiệm dưới đây đã được tiến hành để thử khả năng nhân bản đúng đoạn ADN đích và tính đặc hiệu của cặp môi Fg và Rg.

- Kỹ thuật PCR lồng: sử dụng các sản phẩm PCR của cặp môi FF và FR đã được xác định trình tự làm ADN khuôn mẫu cho PCR với cặp môi Fg, Rg. Kết quả PCR là một băng ADN có cỡ đoạn đúng như dự kiến (279 bp) đối với các mẫu *F. gigantea* và không có băng với các mẫu

*F. hepatica*. Kết quả thực nghiệm này đảm bảo rằng cặp môi Fg, Rg đã nhân bản đúng đoạn ADN đích và đặc hiệu với *F. gigantea*.

- PCR với cặp môi Fg, Rg và khuôn mẫu là ADN tổng số cũng cho kết quả là một băng ADN với cỡ đoạn đúng như dự kiến đối với các mẫu *F. gigantea* và không có băng với các mẫu *F. hepatica*. Kết quả này cho thấy cặp môi Fg, Rg là đặc hiệu cho *F. gigantea*, nên không cần

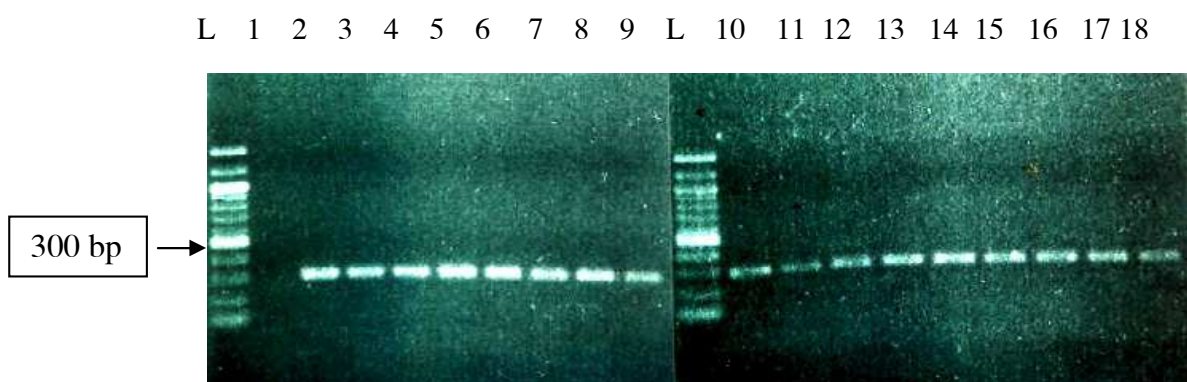
thiết phải tiến hành kỹ thuật PCR lồng trong chẩn đoán phân biệt giữa *F. hepatica* và *F. gigantica*.

- Kết quả PCR không có sự sai khác khi dùng ADN tổng số được tách chiết bằng QIAamp blood and tissue Kit (QIAGEN Inc.) và BioRad Chelex 100™ làm khuôn mẫu. Ưu điểm của phương pháp tách chiết ADN bằng BioRad Chelex 100™ là rẻ tiền, cần ít bước thao tác nên tránh được nguy cơ ngoại nhiễm mẫu.

Từ các kết quả thực nghiệm trên cho thấy dùng PCR với cặp mồi Fg, Rg và ADN mẫu tách chiết bằng BioRad Chelex 100™ là rất thích hợp cho việc xác định thành phần loài của quần thể sán lá gan lớn ở trâu, bò và đã được sử dụng để khảo sát lô mẫu vật đã thu. Kết quả cho thấy cả 45 cá thể sán của 3 nhóm F.h, F.hg và F.g (mỗi nhóm có 15 cá thể) đều là loài *F. gigantica*. Ngoài ra, redia chứa 10 cercaria cũng chỉ là một biến thể của redia thường gặp của *F.*

*gigantica*. Hình 3 trình bày một phần kết quả điện di các sản phẩm PCR đặc hiệu để chẩn đoán phân biệt các mẫu khảo sát.

Kết quả trên cho thấy quần thể sán lá gan lớn thu được ở trâu, bò của hai vùng Bình Định và Khánh Hòa thuộc loài *F. gigantica* và mức độ biến dị hình thái ngoài của loài này là rất lớn. Khả năng tồn tại quần thể *F. hepatica* ở vùng nghiên cứu là rất nhỏ, nghĩa là khả năng có *F. hepatica* ký sinh ở người cũng rất nhỏ. Kết quả nghiên cứu này cùng với những mâu thuẫn trong các kết quả điều tra *Fasciola* trước đây, đặt ra câu hỏi là có tồn tại các quần thể *F. hepatica* ở nước ta hay không? Vấn đề này cũng tương tự ở một số nước trong khu vực như Nhật Bản, gần đây trên cơ sở định loại bằng chỉ thị ADN đã khẳng định quần thể sán *Fasciola* trên đất nước của họ là *F. gigantica*, mặc dù trước đó loài *F. hepatica* cũng đã được ghi nhận trên cơ sở định loại hình thái [9].



Hình 3. Một phần kết quả điện di các sản phẩm PCR với cặp mồi Fg và Rg.

**Ghi chú:** L. thang cỡ đoạn (ladder) tính bằng bp, 1. F.hC- *F. hepatica* chuẩn của Ôxtrâyliá; 2-6: nhóm F.h; 7-11. nhóm F.hg; 12-16: nhóm F.g; 17: biến thể redia; 18: redia thường của *F. gigantica*.

### III. KẾT LUẬN

1. So sánh trình tự ADN của ty thể cho thấy hai cá thể sán lá gan lớn ở người thuộc loài *Fasciola gigantica* và lần đầu tiên loài sán này được xác nhận ký sinh ở người Việt Nam.

2. Quần thể sán lá gan lớn thu được ở trâu, bò ở hai vùng Bình Định và Khánh Hòa thuộc loài *F. gigantica* và khả năng tồn tại quần thể *F. hepatica* ở vùng này là rất nhỏ.

3. Mức độ biến dị hình thái ngoài của quần thể *F. gigantica* ở Việt Nam rất lớn; đã thu thập được 3 nhóm có biến dị hình thái ngoài là nhóm giống với *F. hepatica*, nhóm trung gian giữa *F. hepatica* và *F. gigantica* và nhóm giống *F. gigantica*, trong đó 2 nhóm đầu có tỷ lệ cao hơn nhiều ở trâu so với bò. Không có sự khác biệt về di truyền giữa các nhóm sán này.

4. Redia con của *F. gigantica* có biến thể chứa nhiều cercaria hơn loại thông thường.

5. Quần thể *F.gigantica* ở Việt Nam và một số nước vùng Nam Á, trừ Ấn Độ, có mức độ tương đồng khá cao về cấu trúc di truyền.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Tất Thế và cs.**, 2001: Thông tin Y học lâm sàng, 4: 77-83.
2. **Đỗ Dương Thái, Trịnh Văn Thịnh**, 1976-1978: Công trình nghiên cứu ký sinh trùng ở Việt Nam, tập 1 và 2. NXB KH&KT, Hà Nội.
3. **Nguyễn Thị Lê**, 2000: Động vật chí Việt Nam. NXB KH&KT, Hà Nội, 8: 52-64.
4. **Trần Vinh Hiển, Trần Thị kim Dung**, 1998: Nhân 125 trường hợp nhiễm sán lá gan *Fasciola hepatica* phát hiện ở người trong năm 1997. Thông tin phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng, 2: 42- 47.
5. **Agatsuma T. et al.**, 2000: *J. Parasitol. Int.*, 49: 231-238.
6. **Avise J. C.**, 1994: Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, NY, USA.
7. **Bogitsh J. B., Cheng C. T.**, 1996: Human parasitology. Saunderson College Publishing, USA. 174- 177.
8. **Brown W. H.**, 1969: Basic clinical parasitology. Appleton-Century-Croft, New York, USA. 227-229.
9. **Hashimoto K. T. et al.**, 1997: *Parasitol. Res.*, 83: 220-225.
10. **Hillis D. M., Mritz C., Mable B. K.**, 1996. Molecular systematics. Sinauer associate. USA.
11. **Itagaki T. I. et al.**, 1998: *J. Parasitol.*, 84: 445- 448.
12. **Kaufmann J.**, 1996: Parasitic infections of domestic animals. Birkhauser Verlag, Berlin.

## DNA IDENTIFICATION OF *FASCIOLA SPP.* ON HUMAN AND CATTLE IN CENTRAL VIETNAM

DANG TAT THE, LE QUANG HUNG, CAO VAN VIEN

### SUMMARY

The comparison and analysis of the DNA sequence of two *Fasciola* samples collected from humans and four other *Fasciola* samples with different morphology collected from cows in Binh Dinh province, to the homologous sequences of the nucleotide of other *Fasciola* from some countries in South Asia and around the world, shows that all *Fasciola* samples from both humans and cows are *F.gigantica*. For the first time, this *Fasciola* species is detected as endoparasites in humans in Vietnam. The *F.gigantica* population in Vietnam and some countries in South Asia except Indonesia have the relatively high structural homogeneity.

The macroscopic observation of 1350 *Fasciola* specimens collected from humans and cattle in Binh Dinh and Khanhhoa provinces identified three different morphological types of the body of *F.hepatica*, *F.gigantica* and the resemblance between *F.gigantica* and *F.hepatica*. Specified Polymerase Chain Reaction (PCR) shows that they are all *F.gigantica*. This means that *F.gigantica* has a high potential for morphological disguise, and that all samples *Fasciola* detected in cattle from Binh Dinh and Khanhhoa provinces are *F. gigantica*. It is possible that *F. hepatica* does not exist in this region. Also, based on the results of this study and the conflicting results before, existence of *F. hepatica* in Vietnam is still open to question. Furthermore, a variant of redia of *F. gigantica* with more cercaria than other common types was found from *Lymnaea* snails.

Ngày nhận bài: 11-10-2002