

NGHIÊN CỨU GIÁM ĐỊNH LOÀI SÁN LÁ GAN LỚN (*FASCIOLA SPP.*) GÂY BỆNH Ở DÊ TẠI VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Nguyễn Thị Giang Thanh¹, Triệu Nguyên Trung², Lê Thanh Hòa³

¹Viện Thú y

²Viện Sốt rét - Ký sinh trùng và Côn trùng Quy Nhơn

³Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Fasciola hepatica và *Fasciola gigantica* (thuộc họ Fasciolidae) là hai loài gây bệnh sán lá gan ở động vật và người. Động vật ăn cỏ: trâu, bò, dê, cừu cảm nhiễm với sán lá gan lớn (*Fasciola spp.*) tàng trữ nguồn bệnh lây sang người. Ở Việt Nam trong những năm gần đây, tỷ lệ nhiễm bệnh sán lá gan ở gia súc và ở người ngày càng gia tăng. Chúng tôi đã khảo sát gen *cox1* (Cytochrome C Oxidase subunit I) và gen *nad1* (Nicotinamide dehydrogenase subunit I) của hệ gen ty thể và ITS-2 (internal transcribed spacer 2) của hệ gen nhân trên đối tượng là dê để đánh giá sự biến đổi di truyền trong quần thể sán lá gan lớn (*Fasciola spp.*) gây bệnh trên đối tượng vật chủ khác nhau. Kết quả giải trình tự của các gen khảo sát và so sánh với Ngân hàng gen cho thấy, phần lớn các mẫu sán thu thập trên dê được thẩm định thuộc loài *Fasciola gigantica*; nhưng có một số mẫu lại là trung gian lai giữa *F. hepatica* (đực) x *F. gigantica* (cái), các dạng này cùng tồn tại trong quần thể sán lá gan lớn ở Việt Nam. Hiện tượng lai khác loài (interspecific hybridization) và lai chéo ngược (introgression) ở quần thể sán lá gan ở dê được phát hiện đã làm phức tạp hóa đặc tính phân tử di truyền của chúng. Đây là những kết quả đầu tiên nghiên cứu phân tử về biến đổi di truyền sán lá gan trên dê của ở Việt Nam và thế giới.

Từ khóa: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, hệ gen ty thể, lai chéo ngược, lai khác loài, sán lá gan

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sán lá gan lớn là bệnh chung của người và gia súc chủ yếu do hai loài *Fasciola hepatica* và *Fasciola gigantica* (thuộc họ Fasciolidae) gây nên. *Fasciola spp.* gây bệnh chủ yếu trên động vật ăn cỏ trâu, bò, cừu, dê, nhưng chúng có khả năng thích ứng và gây bệnh trên người (MasComa *et al.*, 2009). Sự phân bố của hai loài *F. hepatica* và *F. gigantica* khác nhau trên thế giới, loài *F. hepatica* gây bệnh ở các vùng có nhiệt độ ôn đới; trong khi *F. gigantica* có mặt rộng rãi ở các châu lục, đặc biệt ở vùng có khí hậu nhiệt đới. Sự phân bố theo vùng như thế này không phải là tuyệt đối, vì cả hai loài *F. hepatica* và *F. gigantica* đều tồn tại ở một số nước thuộc vùng Trung và Đông Nam Á như: Pakistan, Iran, Nhật Bản và Trung Quốc (MasComa *et al.*, 2009).

Tại Việt Nam, gia súc ăn cỏ trâu, bò, dê nhiễm sán lá gan lớn tỷ lệ cao nhưng chưa xác định được chính xác và rõ ràng loài sán lá gan nào gây bệnh là chủ yếu. Theo những tài liệu nghiên cứu trước đây, bằng phương pháp giám định về hình thái học, Houdemer (1938) và Drozd (1967) đã từng có những công bố sự có mặt của cả hai loài *F. hepatica* và *F. gigantica* (Đỗ Dương Thái, Trịnh Văn Thịnh,

1978) và các công trình nghiên cứu sau này khẳng định loài *F. gigantica* gây bệnh chủ yếu cho gia súc ở nước ta (Phan Địch Lân, 1980). Hiện nay, các công trình nghiên cứu định loài trên thế giới đã ứng dụng việc giám định gen và biến đổi di truyền bằng phương pháp sinh học phân tử (Le *et al.*, 2002). Đối với các loài sán lá (lớp Trematoda), một số gen trong hệ gen ty thể (mitochondrial DNA) như *cox1* (cytochrome c oxidase subunit I), *nad1* (nicotinamide dehydrogenase subunit 1), *cob* (cytochrome b) và vùng giao gen ITS-2 (internal transcribed spacer 2) thuộc hệ gen nhân (nuclear DNA) đã được xác nhận là chỉ thị phân tử thiết yếu trong công tác giám định/thẩm định loài (Itagaki *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2004; Le *et al.*, 2002; 2008; Itagaki *et al.*, 2009).

Hệ gen ty thể là một vòng kép DNA có kích thước khoảng 16 - 20 kb, gồm 36 - 37 gen mã hóa cho 12 - 13 loại protein, 2 RNA ribosome (rRNA) và 22 RNA vận chuyển (*trn*) (Le *et al.*, 2002). Các protein được mã hóa trong hệ gen ty thể là các enzyme tham gia vào các quá trình hô hấp của tế bào trong hoạt động sống. Các gen trong ty thể có hệ số biến đổi nhanh hơn gen trong nhân tế bào 10 - 15 lần, do vậy, đây là chỉ thị phân tử thuận lợi cho

nghiên cứu về tiến hóa và biến đổi di truyền (MasComa *et al.*, 2009). Hệ gen ty thể có hướng di truyền theo dòng mẹ, các gen ty thể trong cùng chủng, cùng loài có tính bảo tồn sinh học cao ở một số gen như: *cox1*, *nad1*, do vậy bất cứ sự thay đổi nhỏ nào cũng là dấu hiệu giá trị trong giám định và phân loại. Bên cạnh các gen của hệ gen ty thể, vùng giao gen ITS-2 của hệ gen nhân cũng được khảo sát để khẳng định về sự di truyền dòng bố cũng như biến đổi hệ gen trong quần thể sán lá gan lớn (Itagaki *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2004).

Công tác giám định loài ở quần thể sán lá gan sử dụng hệ gen ty thể đã bước đầu thu được nhiều kết quả ở nước ta. Một số nghiên cứu định loại phân tử đầu tiên đã cho biết loài sán lá gan lớn gây bệnh cho người và bò ở nước ta thuộc về loài *F. gigantica*, mặc dù vẫn có một số mẫu cho thấy có sự lai khác loài (interspecific hybridization) và lai chéo ngược (introgression) ở quần thể sán lá gan trên động vật và người (Lê Thanh Hòa, Nguyễn Văn Đê, 2002; Đặng Tất Thế, Nawa, 2005; Le *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009). Để có thêm những bằng chứng về nghiên cứu thẩm định loài sán lá gan lớn gây bệnh ở nước ta, chúng tôi tiến hành giám định phân tử dựa trên các gen *cox1*, *nad1* và ITS-2 của loài *Fasciola* spp. trên vật chủ nhiễm bệnh là dê, một loài gia súc ăn cỏ được chăn nuôi rộng rãi ở nước ta.

NGUYỄN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu mẫu sán lá gan lớn và bảo quản

Mẫu sán lá gan lớn được thu ở lò mổ dê và dê nuôi ở một số tỉnh miền núi và trung du là Bắc Kạn, Ninh Bình và Yên Bái. Mẫu sán lá gan lớn sử dụng giám định gen được thu từ ổ áp-xe trong gan của dê, được rửa sạch và bảo quản trong cồn 70%, cất giữ ở nhiệt độ -20°C cho tới khi sử dụng. Ngoài ra, một số mẫu thu từ bò của một số tỉnh: Cao Bằng, Nghệ An, Ninh Bình, Hà Tĩnh và Quảng Nam cũng được nghiên cứu.

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết bằng bộ hoá chất DNeasy Tissue Kit (QIAGEN Inc.) theo quy trình của nhà sản xuất. Mô tả ngắn gọn như sau: Lấy một con sán ra khỏi cồn 70%, cắt lấy một mẫu nhỏ khoảng 100 mg (bằng hạt gạo) cho vào ống Eppendorf, để cồn bay hơi hết, rồi rửa nhiều lần bằng nước cất hai lần khử ion. Mẫu vật được nghiền kỹ và xử lý dung môi theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA tổng số thu được được bảo quản -20°C cho tới khi sử dụng.

Thiết kế mồi và thực hiện phản ứng PCR

Cặp mồi nhân đoạn gen *cox1* (JB3F - JB4.5R) và ITS-2 (3SF - BD2R) được thiết kế trên cơ sở các công bố trước đây (Huang *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2009). Các gen đã chọn được nhân lên bằng PCR tiêu chuẩn với bộ hóa chất Master Mix Kit (Promega). Chu trình nhiệt được sử dụng trong quá trình PCR là: 94°C - 5 phút, 35 chu kỳ tiếp theo: 94°C - 1 phút, 55°C - 1 phút và 72°C - 1 phút, chu kỳ cuối kéo dài 10 phút ở 72°C.

Giải trình tự, xử lý số liệu và phân tích biến đổi gen

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên thạch agarose 0,8%, tinh sạch bằng bộ hóa chất QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.) và dòng hóa vào vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen Inc.). Giải trình tự gen trực tiếp từ sản phẩm PCR sau tinh sạch hoặc DNA plasmid tái tổ hợp của các clone sau khi cắt kiểm tra bằng enzyme *EcoRI*, được thực hiện trên máy giải trình tự động ABI 3100 Genetic Analyzer. Sắp xếp đối chiếu trình tự tương ứng của từng đoạn gen được thực hiện bằng hệ chương trình máy tính AssemblyLIGN 1.9 và MacVector 8.2 (Accelrys Inc.). So sánh đối chiếu với các chuỗi gen thu từ Ngân hàng gen và phân tích biến đổi gen bằng chương trình GENEDOC.

Bảng 1. Chọn gen giải trình tự và các cặp mồi tương ứng.

STT	Gen	Cặp mồi	Nhiệt độ bám mồi (°C)	Độ dài sản phẩm (bp)
1	<i>cox1</i>	JB3F (5' TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT 3') JB4.5R (5'TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG 3')	37	423
2	ITS-2	3SF (5' GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG 3') BD2R (5' TATGCTTAAATTCAGCGGGT 3')	55	550

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả xác định hình thái học



Hình 1. Hình ảnh một số sán lá gan lớn thu được ở dê tại Yên Bái.

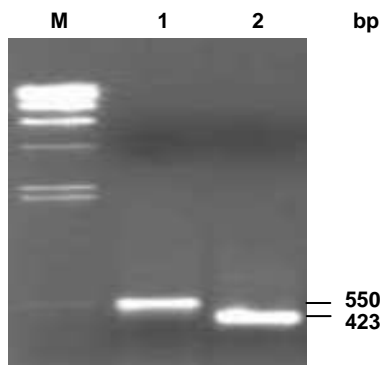
Số lượng sán lá gan lớn thu được trên cùng mỗi một con dê được quan sát và đánh giá về mặt hình thái học. Đa số sán thu được là sán trưởng thành, có hình thái kích thước khác nhau, mặc dù ký sinh trong cùng một vật chủ (Hình 1). Trong tổng số sán thu được (31 con) có 7/31 số sán có hình dạng nghiêng về loài *F. gigantica*, với kích

thước chiều dài trung bình ~35 mm × 12 - 15 mm, 5/31 số sán có hình dạng nghiêng về loài *F. hepatica*, với kích thước trung bình 20 - 25 mm × 12 - 15 mm; và 19/31 số sán có kích thước trung gian khoảng 30 - 35 mm (Hình 1; Bảng 2).

Nếu chỉ dựa vào kết quả quan sát về hình thái của những con sán đã thu được để đánh giá đưa ra kết luận chúng thuộc loài *F. hepatica* hay *F. gigantica* gây bệnh thì không chính xác. Hơn nữa, những kết quả của các công trình nghiên cứu trên thế giới về hình thái học của loài sán lá gan lớn *Fasciola* đã cho thấy sự thay đổi kích thước của chiều dài, chiều rộng cũng như khoảng cách của các giác miệng phụ thuộc vào vật chủ ký sinh cuối cùng mà sán ký sinh (Valero *et al.*, 1996; 1999) và phân biệt về hình thái học giữa hai loài sán lá gan *F. gigantica* và *F. hepatica* gặp rất nhiều khó khăn trong việc định loài ở các vùng địa lý có mặt cả hai loài gây bệnh cho người và gia súc (Mas-Coma, Bargues, 1997). Do vậy, kết luận chính xác sán lá gan lớn ký sinh và gây bệnh ở dê thuộc loài nào và biến đổi di truyền như ra sao đòi hỏi cần khảo sát hệ gen ty thể và nhân áp dụng những chỉ thị phân tử thích hợp (MasComa *et al.*, 2009).

Bảng 2. Số lượng và kích thước chiều dài của sán lá gan lớn thu thập từ dê ở một số tỉnh của Việt Nam.

Tỉnh	Ký hiệu	Kích thước chiều dài (mm)			Số lượng sán
		> 35	30 - 35	20 - 25	
Bắc Kạn	FBKD	0	11	2	13
Ninh Bình	FNBD	1	0	0	1
Yên Bái	FspYB	6	8	3	17
Tổng số		7	19	5	31



Hình 2. Kiểm tra sản phẩm PCR của ITS-2 và *cox1* trên thạch agarose 0,8%. M: marker; 1: sản phẩm ITS-2 (550 bp); 2: sản phẩm đoạn gen *cox1* (423 bp).

Kết quả giải trình tự và phân tích so sánh các gen

Các mẫu sán đại diện cho tổng số mẫu thu thập ở các vùng địa lý khác nhau, có kích thước hình thái khác nhau, được tách DNA tổng số làm khuôn cho phản ứng PCR. Các gen ITS-2 và *cox1* được nhân lên bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Hình 2 giới thiệu sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra trên thạch agarose 0,8% của một mẫu sán thu trên dê ở Yên Bái: vùng giao gen ITS-2 có độ dài 550 bp (gồm cả phần 5,8S và 28S của mỗi bóm vào) và gen *cox1* có độ dài 423 bp.

Sản phẩm PCR của các gen ITS-2 và *cox1* được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp. Vùng giao gen ITS-2 từ các mẫu sán có độ dài khác nhau: 361 bp hoặc 362 bp, chênh lệch nhau bởi một nucleotide (T)

ở vị trí 327 (Bảng 3). Trình tự nucleotide của ITS-2 của các mẫu sán lá gan lớn trên dê ở Việt Nam được so sánh với ITS-2 của các mẫu ở Indonesia (đặc trưng cho loài *F. gigantica* thuần), Nhật Bản, Belgium, Australia (đặc trưng cho loài *F. hepatica* thuần) và một số mẫu thu thập ở Việt Nam ở các vật chủ khác. Bảy vị trí biến đổi của nucleotide đã được xác định trên trình tự của gen ITS-2 (Bảng 3), trong đó tại vị trí 327, hai mẫu thu từ dê (FspYB1 và FspYB1-2) có nucleotide T, hai mẫu khác cũng từ dê (FBKD và FgNBD) không có nucleotide này.

Nghiên cứu giám định phân tử loài sán lá gan lớn *Fasciola* spp. gây bệnh ở dê đã sử dụng 2 chỉ thị di truyền là ITS-2 (thuộc hệ gen nhân) và *cox1* (thuộc hệ gen ty thể). Gen ITS-2 đã được sử dụng nhiều trong việc định loài và đặc biệt đối với loài sán lá gan lớn (Agatsuma *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2008; Itagaki *et al.*, 2009). Sự khác nhau giữa số lượng của các cặp nucleotide của gen ITS-2 là một đặc điểm để phân biệt giữa hai loài *F. gigantica* và

F. hepatica: Sự thiếu hụt 1 cặp nucleotide ở vị trí số 327 của ITS-2 làm cho tổng số cặp nucleotide còn 361, cho phép xác định gen ITS-2 đó sẽ thuộc về nhóm *F. gigantica* và số cặp nucleotide là 362 thì gen ITS-2 thuộc nhóm *F. hepatica*. Sự biến đổi của các nucleotide thường gặp ở 7 vị trí: 207, 218, 231, 270, 327, 334 của chuỗi gen ITS-2 đã xuất hiện trong các mẫu sán ở Việt Nam không những mẫu sán ký sinh ở dê mà còn ở các loài vật chủ khác là bò trong khi đó ở những vị trí này các nucleotide không thay đổi ở loài *F. gigantica* và *F. hepatica* thuần (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu này cũng trùng hợp với kết quả khi giám định gen của các mẫu sán ở vùng Đông và Đông Nam Á: Trung Quốc (Huang *et al.*, 2004), Hàn Quốc (Agatsuma *et al.*, 2000), Việt Nam (Le *et al.*, 2008; Itagaki *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009), đó cũng là những bằng chứng để khẳng định khả năng hình thành một số dạng di truyền (genotype) mới trong quần thể sán lá gan lớn tại Việt Nam và thế giới.

Bảng 3. So sánh các nucleotide ở các vị trí biến đổi của vùng giao gen ITS-2 của các mẫu sán lá gan lớn ở các vùng địa lý và vật chủ khác nhau.

Ký hiệu	Nguồn gốc	Vật chủ	Vị trí biến đổi							Cơ sở dữ liệu	Đánh giá phân loại
			a	b	c	d	e	f	g		
Fg(IndoT)	Indonesia	Bò	C	T	C	T	T	-	A	AB010977	<i>F. gigantica</i>
FCCB	Cao Bằng	Bò	C	T	C	T	T	-	A	Nghiên cứu này	<i>F. gigantica</i>
FBKD	Bắc Kạn	Đê	C	C	C	T	T	-	A	Nghiên cứu này	<i>F. gigantica-like*</i>
FgQNaB	Quảng Nam	Bò	C	C	C	T	T	-	A	Nghiên cứu này	<i>F. gigantica-like*</i>
FgHaTiB	Hà Tĩnh	Bò	C	C	C	T	T	-	A	Nghiên cứu này	<i>F. gigantica-like*</i>
FgNBD	Ninh Bình	Đê	C	C	C	T	T	-	A	Nghiên cứu này	<i>F. gigantica-like*</i>
FspBDB	Bình Định	Bò	C	C	C	T	T	-	A	EU260057	
FspYB1	Yên Bái	Đê	T	T	T	T	T	T	G	Nghiên cứu này	<i>F. hepatica-like*</i>
FspYB1-2	Yên Bái	Đê	C	T	C	T	T	T	G	Nghiên cứu này	<i>F. hepatica-like*</i>
FspT	Nghệ An	Bò	C	T	T	C	C	T	G	Nghiên cứu này	<i>F. hepatica-like*</i>
FspHokai-JB	Nhật Bản	Bò	T	T	T	C	C	T	G	AB207150	<i>F. hepatica</i>
Fh-Be	Belgium	Bò	T	T	T	C	C	T	G	Nghiên cứu này	<i>F. hepatica</i>
Fh-AUS	Australia	Bò	T	T	T	C	C	T	G	Le <i>et al.</i> , 2008	<i>F. hepatica</i>

Ghi chú: Vị trí có biến đổi trong ITS-2: a) 207; b) 218; c) 231; d) 270; e) 276; f) 327; g) 334; *F. gigantica-like**: dạng trung gian giống *F. gigantica*; *F. hepatica-like**: dạng trung gian giống *F. hepatica*.

Mối quan hệ về loài trên cơ sở phân tích phả hệ sử dụng gen ty thể

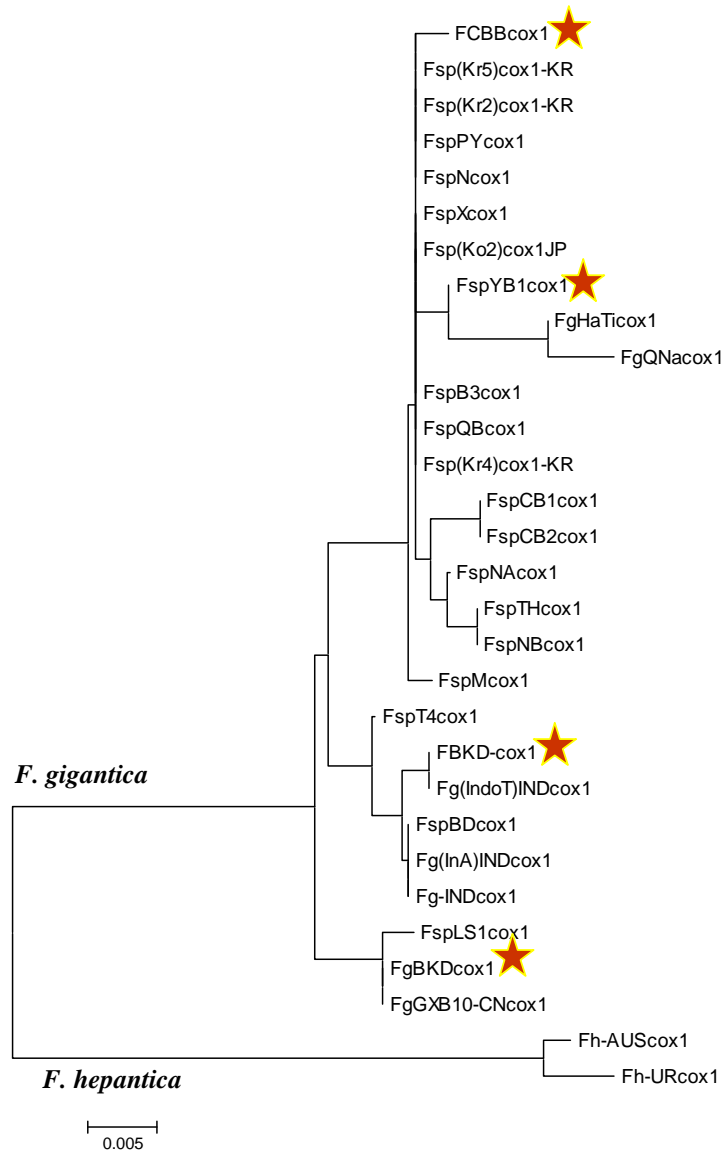
Trên cơ sở thành phần chuỗi gen *cox1*, mối quan hệ về loài dựa trên phân tích phả hệ của các mẫu sán

lá gan của Việt Nam và các mẫu của các nước châu Á đã được xây dựng. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu trong nghiên cứu này đều thuộc nhóm *F. gigantica* (Hình 3). Như vậy, các mẫu sán lá gan phân lập ở dê mang tính chất di truyền hệ gen ty thể

(*cox1*) theo dòng mẹ thuộc về loài *F. gigantica*; trong khi đó phân tích vùng gen ITS-2 cho thấy mẫu sán lá gan phân lập từ dê tại Yên Bái có tính di truyền hệ gen nhân theo dòng bố thuộc về loài *F. hepatica*. Đây là một dạng trung gian, kết quả của lai khác loài giữa *F. hepatica* và *F. gigantica* và lai chéo ngược được nhiều nghiên cứu khẳng định trên các mẫu của quần thể sán lá gan ở Hàn Quốc, Trung Quốc, Nhật Bản và Việt Nam (Agatsuma *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004; Le *et al.*, 2008; Itagaki *et al.*, 2009). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng khẳng định tính lai khác loài của *Fasciola* và đặc

tính lai này được phát hiện đầu tiên trên dê của Việt Nam.

Dạng di truyền mới này của sán lá gan lớn phát hiện ở các vật chủ khác nhau, có nhiều khả năng biến đổi gen nhân theo dòng bố là *F. hepatica* và hệ gen ty thể thuộc dòng mẹ là *F. gigantica* sẽ được bảo tồn và thể hiện đặc tính gây bệnh. Tuy nhiên những biến đổi về gen trong quần thể sán lá gan lớn ở người và động vật tại Việt Nam cần phải tiếp tục được nghiên cứu thêm để đưa ra những kết luận xác đáng về nguyên nhân bùng nổ bệnh này ở trên người hiện nay và những kế hoạch phòng chống hiệu quả.



Hình 3. Mối quan hệ về loài trên cơ sở phân tích phả hệ của các mẫu sán lá gan lớn (*Fasciola* spp.) phân lập tại các vùng địa lý khác nhau ở Việt Nam và thế giới dựa vào dữ liệu gen *cox1*. Dấu ngôi sao là các mẫu phân lập từ dê ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

Sử dụng chỉ thị di truyền vùng giao gen ITS-2 (thuộc hệ gen nhân) và *cox1* (thuộc hệ gen ty thể), thẩm định loài bằng sinh học phân tử đối với sán lá gan lớn gây bệnh ở dê đã được thực hiện. Kết quả cho thấy ở tất cả các mẫu gen *cox1* (ty thể) không biến đổi và di truyền theo dòng mẹ *F. gigantica*, trong khi đó vùng giao gen ITS-2 (nhân) đã phân ra hai loại mới: loại trung gian giống như *F. gigantica* và loại trung gian giống như *F. hepatica* dựa trên biến đổi các nucleotide ở 7 vị trí của vùng giao gen ITS-2. Vị trí 327 ở vùng giao gen ITS-2 có giá trị phân biệt dòng bố và tính lai khác loài (và lai chéo ngược) giữa *F. hepatica* và *F. gigantica*, lần đầu tiên được xác định ở sán lá gan lớn thu từ dê của Việt Nam. Kết quả này đóng góp thêm bằng chứng về dạng di truyền mới trung gian giữa *F. gigantica* và *F. hepatica* gây bệnh cho người và gia súc ở vùng Đông Nam Á.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với tài trợ kinh phí của Dự án quốc tế VLIR (Belgium) cho Nguyễn Thị Giang Thanh, ICGEB (Italy) cho Lê Thanh Hòa, và sử dụng trang thiết bị Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agatsuma T, Arakawa Y, Iwagami M, Honzako Y, Cahuaningsin U, Kang SY, Hong SJ (2000) Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitol Int* 49: 231-238.

Dang TT, Nawa Y (2005) *Fasciola* and Fascioliasis in Vietnam. *Asian Parasitol* 1: 57-60.

Đỗ Dương Thái, Trịnh Văn Thịnh (1978) Công trình nghiên cứu ký sinh trùng ở Việt Nam (Tập 2). Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.

Huang WY, He B, Wang CR, Zhu XQ (2004) Characterisation of *Fasciola* species from mainland China by

ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Vet Parasitol* 120: 75-83.

Itagaki T, Tsutsumi K (1998) Triploidy form of *Fasciola* in Japan: genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined by ITS-2 sequence of nuclear rDNA. *Int J Parasitol* 28: 777-781.

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

Lê Thanh Hòa, Nguyễn Văn Đề (2002) Xác định sán lá gan lớn (*Fasciola spp.*) ở Việt Nam bằng phương pháp sinh học phân tử hệ gen ty thể sử dụng gen *nad1* (nicotinamide dehydrogenase subunit 1). *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng* 4: 53-58

Le TH, Blair D, McManus DP (2002) Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol* 18: 206-213.

Le TH, De NV, Agatsuma T, Nguyen TGT, Nguyen QD, McManus DP, Blair D (2008) Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of *Fasciola* in Vietnam. *Int J Parasitol* 38: 725-730.

Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasit* 69: 41-146.

Phan Dịch Lâm (1980) Bệnh sán lá gan trâu do *Fasciola gigantica* ở phía Bắc Việt Nam. *Luận án PTS khoa học Nông Nghiệp*.

Valero MA, Marcos MD, Comes AM, Sendra M, Mas-Coma S (1999) Comparison of adult live flukes from highland and lowland populations of Bolivian and Spanish sheep. *J Helminthol* 73: 341-345.

Valero MA, Marcos MD, Mas-Coma S (1996) A mathematical model for the ontogeny of *Fasciola hepatica* in the definitive host. *Res Rev Parasitol* 56: 13-20.

Nguyen TGT, De NV, Vercruysse J, Dorny P, Le TH (2009) Genotypic characterization and species identification of *Fasciola* spp. with implications regarding the isolates infecting goats in Vietnam. *Exp Parasitol* 123: 354-361

IDENTIFICATION OF *FASCIOLA* SPP. ISOLATED IN GOATS IN VIETNAM USING MOLECULAR MARKERS

Nguyen Thi Giang Thanh¹, Trieu Nguyen Trung², Le Thanh Hoa^{3,*}

¹National Institute of Veterinary Research

²Institute of Malariology, Parasitology and Entomology Quy Nhon

³Institute of Biotechnology

SUMMARY

Fasciola hepatica and *Fasciola gigantica* (Fasciolidae) are the two species which cause fascioliasis in ruminants and humans. The ruminant animals: buffaloes, cattle, goats, sheep are highly susceptible to *Fasciola* spp. maintaining a reservoir and playing the role of transmission to humans. In recent years in Vietnam, the prevalence of fascioliasis in animals is very high and number of human cases infected with the liverfluke are dramatically increased. Genetic markers of mitochondrial *cox1* (cytochrome c oxidase subunit 1) and nuclear ITS-2 (internal transcribed spacer 2) have been obtained and sequenced from the liverflukes collected from goats in order to evaluate the genetic variation in the *Fasciola* population in different hosts. The sequences obtained were comparatively analyzed with those taken from GenBank revealed that major portion of *Fasciola* spp from goats were identified as “pure” *Fasciola gigantica*; but some of them were intermediate forms as hybrids between *F. hepatica* (male) x *F. gigantica* (female). All of these forms coexist in the fluke population in Vietnam. The interspecific hybridization and back-crossing (introgression) detected in the fluke population in goats makes their molecular genetics more complicated. This is the first time to confirm the hybrid form of *Fasciola* and their genetic variation in goat in Vietnam and worldwide.

Keywords: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, interspecific hybridization, introgression mitochondrial genome, liverfluke

* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37567297; E-mail: imibtvn@gmail.com