

DẠNG LAI TRONG MẪU SÁN LÁ GAN LỚN TRÊN TRÂU BÒ VÀ NGƯỜI TẠI QUẢNG NGÃI

TRẦN THANH DƯƠNG, *Cục Y tế dự phòng, Bộ Y tế*
NGUYỄN THU HƯƠNG, NGUYỄN THỊ HƯƠNG BÌNH
Viện Sốt rét - KST-CT.TW

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu đã khẳng định có dạng lai giữa *F. hepatica* và *F. gigantica* trong các mẫu sán lá gan lớn trên trâu bò và người tại Quảng Ngãi. Nghiên cứu cho thấy, vùng gen nhân ITS-2 với độ dài 924bp có 13 vị trí biến đổi nucleotide. Sự biến đổi này khác nhau cho 3 loài *F. hepatica*, *F. gigantica* và dạng trung gian *F. hepatica/F. gigantica*. Dạng trung gian này xuất hiện ở cả mẫu sán thu được từ trâu bò và trên người. Đây là một bằng chứng cho dạng gen lai giữa 2 loại sán lá gan lớn tại Việt Nam cũng như Đông Nam Á. Điều này, góp phần giải thích cơ chế gây bệnh sán lá gan lớn trên người của Việt Nam và Đông Nam Á có những nét đặc trưng không giống như các vùng khác trên thế giới. Đây chính là một sự đa dạng sinh học và phức tạp của các loài ký sinh trùng truyền lây từ động vật sang người.

Từ khóa: Kỹ thuật PCR và PCR-RFLP, sán lá gan lớn, *F. gigantica*, *F. hepatica*, hệ gen nhân, ITS-2, kiểu lai *F. gigantica/F. hepatica*.

SUMMARY

HYBRID FORM IN ISOLATE OF FASCIOLA OBTAINED IN HUMAN AND CATTLE IN QUANG NGAI PROVINCE

Study results have confirmed hybrid form between *F. hepatica* and *F. gigantica* in Quang Ngai province. Nucleotide sequence of ITS-2 gene with 924bp length of the ribosomal region have 13 position nucleotide difference between three *Fasciola* spp. forms coexist in Quang Ngai province. Molecular methods identified for 3 different species of *F. hepatica*, *F. gigantica* and hybrid *F. hepatica/F. gigantica*. This intermediate form present in both samples collected in cattle and humans. This is an evidence for hybrid genetic between two types of *Fasciola* in Vietnam and Southeast Asia. This explains the mechanism that causes human fascioliasis in Vietnam and Southeast Asia has characteristics unlike the other regions of the world. This is a biodiversity and complexity of the zoonotic.

Keywords: *F. hepatica*, *F. gigantica*, ITS-2

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sán lá gan lớn được biết đến như một là một trong những ký sinh trùng quan trọng và có ảnh hưởng đến sức khỏe của động vật và người (WHO, 1998). Người nhiễm chủ yếu là *F. hepatica* và *F. gigantica* (Mac-Coma, 1997). Trong những năm qua bệnh được phát hiện ngày càng nhiều ở người hơn có thể do sự thích nghi ký chủ người của sán lá gan lớn. Một giả thiết cũng được đặt ra, có thể có sự biến đổi gen nên có sự thích nghi ký sinh này. Tác giả Mac-Coma (1997&2005) cho rằng không dễ gì phân biệt về hình

thái học giữa *F. gigantica* và *F. hepatica* tại các vùng nhiễm cả hai loài trên cho người và gia súc. Tuy nhiên, trong những năm gần đây với sự phát triển của y học đặc biệt trong lĩnh vực sinh học phân tử, các nhà khoa học đã có thể thẩm định loại và xác định được loài phụ, loài mới. Đây là một trong những tiến bộ của giới khoa học trong thế kỷ trước. Mặc dù, đòi hỏi kỹ thuật chi phí tốn kém và nhiều kinh nghiệm. Trong lĩnh vực nghiên cứu về gen di truyền các loài ký sinh trùng truyền từ động vật sang người, như sán lá gan lớn cần thiết khảo sát hệ gen ty thể và áp dụng những chỉ thị phân tử thích hợp (Mas-Coma, 2009). Tại Việt Nam, sử dụng chỉ thị di truyền ITS-2 (thuộc gen nhân) và COX1 (thuộc gen ty thể) các nghiên cứu đã xác định sán lá gan lớn trên động vật và người là *F. gigantica*. Ngoài ra các tác giả còn nhận thấy có sự lai tự nhiên giữa *F. gigantica* với *F. hepatica* (Lê Thanh Hòa và CS, 2002, 2004; Nguyễn Thị Giang Thanh và CS, 2009; Nguyễn Văn Đề và CS, 2006).

Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu xác định loài sán lá gan lớn trên người và động vật, qua thực hiện phân tích gen nhân ITS-2 từ mẫu trứng sán lá gan lớn thu được trên người và mẫu con sán trưởng thành thu được trên trâu bò Quảng Ngãi.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 37 mẫu con sán lá gan lớn thu được trên gan trâu bò tại lò mổ và 4 mẫu trứng sán lá gan lớn thu được từ trong phân 4 người. Đây là kết quả trích ra từ một phần trong một nghiên cứu dịch tễ học sán lá gan lớn tại 2 xã Tịnh Kỳ và Nghĩa Sơn, Tỉnh Quảng Ngãi.

2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu:

- Khoa Ký sinh trùng và Khoa Sinh học phân tử của Viện Sốt rét-KST-CT.TƯ.

- Thời gian: từ năm 2009-2011

3. Vật liệu nghiên cứu:

Sử dụng các máy móc và hóa chất chuyên dụng cho từng kỹ thuật

4. Thu thập mẫu tại thực địa và phòng xét nghiệm

Các cá thể sán lá gan lớn và trứng thu được sẽ được rửa chung trong nước muối sinh lý (NaCl 0,9%) và sau đó bảo quản trong cồn ethanol 70% cho tới khi tách chiết ADN hệ gen.

5. Phương pháp sinh học phân tử

5.1. Tách ADN tổng số:

Mẫu sán sau khi được xử lý sẽ sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết DNeasy kit của hãng QIAGEN, Mỹ để tách ADN tổng số. Sản phẩm AND sau tách chiết sẽ được bảo quản ở -20°C cho đến khi dùng.

5.2 Kỹ thuật PCR và PCR-RFLP

Kỹ thuật PCR mỗi đặc hiệu: Cặp mỗi nhân đoạn gen được thiết kế theo Mc Garry và CS (2007) với đoạn ITS-2 và trình tự gần mỗi 5,8S và 28S (ITS-2+) [129]. Trình tự cặp mỗi 1 là: mỗi xuôi 5'-GCG GCC AAA TAT GAG TCA- 3' và mỗi ngược 5'-CTG GAG ATT CCG GTT ACC AA-3'. Nhân bản đoạn gen có kích thước 391 bp; và bộ mỗi 2 là 5'-GTT CAG GTG ACA AGC CAA-3' và mỗi ngược 5'- ATC ACA CCG TGA AGC AGA-3', nhân bản đoạn gen có kích thước 235 bp. Những mẫu dương tính với cả hai cặp mỗi được xác định là *F.hepatica*. Những mẫu chỉ dương tính với cặp mỗi 2 được xác định là *F.gigantica*.

- Kỹ thuật PCR-RFLP theo qui trình của Mahami Oskouei và cs (2011). Khuếch đại đoạn gen ITS2 bằng đôi mỗi: Mỗi xuôi: 5' GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA 3'; mỗi ngược là 5' TAT GCT TAA ATT CAG CCG GT -3', có kích thước khoảng 1000bp. Cắt sản phẩm PCR bằng Enzyme giới hạn Fast restrict enzyme Tsp509I (Fermentas) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả phân tích PCR-RFLP những mẫu bị cắt thành 4 đoạn ADN với kích thước 102, 171, 343 và 427 bp được xác định là *F. hepatica*, những mẫu bị cắt thành 5 đoạn ADN với kích thước 102, 171, 208, 219 và 343 bp được xác định là *F. gigantea*.

5.3. Giải trình tự gen

Sử dụng bộ kit tinh sạch ADN của hãng Qiagent. Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch được gửi đi giải trình tự gen tại công ty Cổ phần dịch vụ phân tích di truyền Gentis các mẫu được giải trình tự trên máy giải trình tự tự động ABI3130 Trình tự gen được so sánh và đối chiếu với gân hàng GENBANK . Xác định phả hệ dựa trên trình tự đoạn ADN bằng các phần mềm MEGA 5.

KẾT QUẢ

1. Kết quả phân tích PCR và PCR-LPLF

Chúng tôi đã tiến hành phân tích 37 mẫu vật sản trường thành thu thập trên các vật chủ trâu bò tại Quảng Ngãi và 4 mẫu trứng sản thu từ phân người.

Kỹ thuật PCR mỗi đặc hiệu. Kết quả trong 37 mẫu con sản trường thành có 32 mẫu dương tính với cả 2 cặp mỗi (có sản phẩm ADN dài 391bp, và 235bp) là *F.hepatica*, 5 mẫu dương tính chỉ dương tính với cặp mỗi 1 (có sản phẩm ADN dài 391bp) là *F.gigantica*. Trong số 4 mẫu trứng sản lá gan lớn, chỉ tách được 1 mẫu có ADN với cả 2 cặp mỗi xác định là *F. hepatica*.

Kỹ thuật PCR-RFLP, tất cả 37 mẫu sản đều cho sản phẩm ADN có độ dài 1.000bp. Dùng enzyme giới hạn Tsp509I cắt các sản phẩm ADN thu được kết quả có 11 mẫu bị cắt tại 3 điểm tạo thành 4 băng có kích thước tương ứng 102, 171, 343 và 427 bp xác định là *F.hepatica*. Có 5 mẫu cắt tại 4 điểm tạo thành 5 băng có kích thước 102, 171, 208, 219 xác định là *F. hepatica*. Còn lại 21 mẫu có đến 6 băng kích thước là 102, 171, 208, 219, 343 và 427 bp xác định là dạng lai *F.hepatica/F.gigantica*.

2. Kết quả phân tích đặc điểm chuỗi nucleotide của ITS-2.

Sản phẩm PCR của vùng gen ITS-2 được tinh sạch và giải trình tự. Với 4 mẫu sản thu được từ Quảng Ngãi (1 mẫu *F. hepatica*, 1 mẫu *F. gigantea*, 1 mẫu sản trường thành dạng lai *F. hepatica/F. gigantea* và 1 mẫu trứng dạng lai *F. hepatica/F. gigantea*) được so sánh với mẫu một mẫu *F. hepatica* mẫu chuẩn lấy từ Nhật. Sự khác biệt về trình tự các nucleotide tại một số vị trí được thể hiện ở bảng 2:

Bảng 2. Vị trí biến đổi của nucleotide của vùng gen ITS-2 của mẫu sản

Vị trí nucleotit	Tên loài sản		
	<i>F.hepatica</i>	<i>F.gigantica</i>	<i>F.hepatica/F. gigantea</i>
7	C	T	C/T
107	A	T	A/T
191	C	T	C/T
269	T	A	T/A
289	C	T	C/T
780	T	C	T/C
804	T	C	T/C
843	C	T	C/T
849	C	T	C/T
900	T	-	T/-
901	C	-	C/T
902	-	-	T/-
908	G	A	G/A

Kết quả trên cho thấy, có tất cả 13 vị trí biến đổi nucleotide trong chuỗi 924bp của trình tự gen ITS-2. Đặc biệt, tại vị trí 900, 901 và 902 sự thiếu hụt T sẽ cho phép xác định được loài *Fasciola spp.* Nếu thiếu hụt T ở cả 3 vị trí sẽ cho chuỗi còn 921bp sẽ là *F. gigantea*. Nếu thiếu hụt T tại vị trí 902 sẽ cho chuỗi còn 923 bp là *F. hepatica*. Nếu 3 vị trí này là TCT hoặc thiếu hụt 1 trong 3 vị trí thì có thể là *F. hepatica/F. gigantea* (Bảng 2 và hình 1).

```
#F.gigantica_(VN)      TAC TCT TAC ACA AGC GAT ACA CGT GTG ACC GTC ATG TCA TGC GAT AAA AAT TTG CGG ACG
#F.h/F.g_1_(trung)    ... .. C.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.h/F.g_1_(truong_thanh) ... .. C.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.h/F.g_2_(trung)    ... .. C.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.h/F.g_2_(truong_thanh) ... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.hepatica_(Nhat)    ... .. C.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.hepatica_(VN)      ... .. C.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
```

```
#F.gigantica_(VN)      GCT ATG CCT GGC TCA TTG AGG TCA CAG CAT ATC CGA TCA CTG ATG GGG TGC CTA CCT GTA
#F.h/F.g_1_(trung)    ... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.h/F.g_1_(truong_thanh) ... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.h/F.g_2_(trung)    ... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.h/F.g_2_(truong_thanh) ... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.hepatica_(Nhat)    ... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
#F.hepatica_(VN)      ... .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
```

#F.gigantica_(VN)	TGA TAC TCC GAT GGT ATG CTT GCG TCT CTC GGG GCG CTT GTC CAA GCC AGG AGA ACG GGT
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	

#F.gigantica_(VN)	TGT ACT GCC ATG ATT GGT AGT GCT AGG CTT AAA GAG GAG ATT TGG GCT ACG GCC CTG CTC
#F.h/F.g_1_(trung)	C.
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	C.
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	C.
#F.hepatica_(VN)	C.

#F.gigantica_(VN)	CCG CCC TAT GAA CTG TTT CAT TAC TAC AAT TAC ACT GTT AAA GTG GTA TTG AAT GGC TTG
#F.h/F.g_1_(trung)	T. C..
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	T. C..
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	T. C..
#F.hepatica_(VN)	T. C..

#F.gigantica_(VN)	CCA TTC TTT GCC ATT GCC CTC GCA TGC ACC CGG TCC TTG TGG CTG GAC TGC ACG TAC GTC
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	

#F.gigantica_(VN)	GCC CGG CGG TGC CTA TCC CGG GTT GGA CTG ATA ACC TGG TCT TTG ACC ATA CGT ACA ACT
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	

#F.gigantica_(VN)	CTG AAC GGT GGA TCA CTC GGC TCG TGT GTC GAT GAA GAG CGC AGC CAA CTG TGT GAA TTA
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	

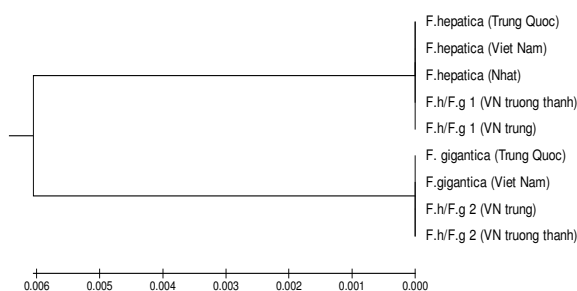
#F.gigantica_(VN)	ATG CAA ACT GCA TAC TGC TTT GAA CAT CGA CAT CTT GAA CGC ATA TTG CGG CCA TGG GTT
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	

#F.gigantica_(VN)	AGC CTG TGG CCA CGC CTG TCC GAG GGT CGG CTT ATA AAC TAT CAC GAC GCC CAA AAA GTC
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	

#F.gigantica_(VN)	GTG GCT TGG GTT TTG CCA GCT GGC GTG ATC TCC TCT ATG AGT AAT CAT GTG AGG TGC CAG
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	

#F.gigantica_(VN)	ATC TAT GGC GTT TCC CTA ATG TAT CCG GAT GCA CCC TTG TCT TGG CAG AAA GCC GTG GTG
#F.h/F.g_1_(trung)	
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	
#F.hepatica_(VN)	
#F.gigantica_(VN)	AGG TGC AGT GGC GGA ATC GTG GTT TAA TAA TCG GGT TGG TAC TCA GTT GTC AGT GTG TTC
#F.h/F.g_1_(trung)	T
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	T
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	T
#F.hepatica_(VN)	T
#F.gigantica_(VN)	GGC GAT CCC CTA GTC GGC ACA CTC ATG ATT TCT GGG ATA ATT CCA TAC CAG GCA CGT TCC
#F.h/F.g_1_(trung)	T
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	T
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	T
#F.hepatica_(VN)	T
#F.gigantica_(VN)	GTT ACT GTT ACT TTG TCA TTG GTT TGA TGC TGA ACT TGG TCA TGT GTC TGA TGC TAT TTC
#F.h/F.g_1_(trung)	..CCT
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	..CCT
#F.h/F.g_2_(trung)	
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	
#F.hepatica_(Nhat)	..CCT
#F.hepatica_(VN)	..CCT
#F.gigantica_(VN)	--A TAT AAC GAC GGT ACC CTT CGT
#F.h/F.g_1_(trung)	CT.G.
#F.h/F.g_1_(truong_thanh)	CT.G.
#F.h/F.g_2_(trung)	T-.
#F.h/F.g_2_(truong_thanh)	T-.
#F.hepatica_(Nhat)	C-.G.
#F.hepatica_(VN)	C-.G.

Hình 1. So sánh chuỗi nucleotide ở các vị trí biến đổi vùng giao gen ITS-2 của các mẫu sán thu được tại Quảng Ngãi và mẫu *F. hepatica* của Nhật Bản. Dấu (.) biểu thị giống nucleotide và dấu (-) biểu thị khuyết nucleotide so với chuỗi nucleotide dòng trên



Hình 2. Sơ đồ hình cây biểu hiện mối quan hệ giữa các mẫu *F. gigantica*, *F. hepatica* và mẫu lai thu thập tại Việt Nam so với mẫu thu thập tại Trung Quốc và Nhật Bản.

Kết quả giải trình tự khẳng định kết quả của phương pháp PCR-RFLP, các mẫu lai mang kiểu gen (dị hợp tử) của cả hai loài *F. hepatica* và *F. gigantica*. So sánh trình tự ADN của *F. hepatica* và *F. gigantica* của Việt Nam với các trình tự đoạn gen ITS-2 (924 bp) của hai loài này ở các nước lân cận như Trung Quốc và Nhật Bản thấy độ tương đồng lên tới 99,994%.

BÀN LUẬN

Hình thái học rất khó xác định chính xác loài sán gan lớn và không dễ dàng để đánh giá đưa ra kết luận chúng thuộc loài *F. hepatica* hay *F. gigantica*. Theo tác giả Valero và cộng sự (1996 & 1999) loài sán lá gan lớn *Fasciola spp.* đã có sự thay đổi hình thái học về 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. Tác giả Mas-Coma và Bargues (1997) cũng cho rằng *F. gigantica* và *F. hepatica* khó phân biệt tại các vùng địa lý có mặt cả hai loài gây bệnh cho người và gia súc. Với sự tiến bộ các nghiên cứu về sinh học phân tử ngày càng phổ biến và ưu thế trong chẩn đoán và phân biệt loài. Hệ gen ty thể là dạng đơn bội di truyền dòng mẹ không tái tổ hợp và có tỷ lệ biến đổi nucleotit cao hơn hệ gen nhân 10 đến 15 lần. Điều này giúp cho việc phân tích họ hàng và tiến hoá sinh vật, trong đó có KST trở nên đơn giản và chính xác hơn ở cấp độ phân tử (Lê Thanh Hòa, 2002). Điều này, giúp xác định hệ loài tam bội và nhị bội ở Nhật Bản, Hàn Quốc và Việt Nam (Hashimoto, 1997; Itagaki, 2009; Terasaki, 2000), làm sáng tỏ loài lai

châu Á (Agatsuma, 2000; Terasaki, 2000). Bằng sinh học phân tử đã xác định *F. gigantica* gây bệnh trên người Việt Nam (Đặng Tất Thế, 2005; Lê Thanh Hòa, 2007; Itagaki, 2009). Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng cho thấy *F. gigantica* Việt Nam có thể là loài lai tự nhiên của *F. gigantica* và *F. hepatica*, do có những đoạn gen chung giữa 2 loài, đây là những nhận định của nhóm tác giả Lê Thanh Hòa và cộng sự. Tại nghiên cứu này chúng tôi tiến hành trên các mẫu con sán lá gan thu trên trâu bò và mẫu trứng sán lá gan lớn thu trên người. Đã thẩm định loài sán bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Kỹ thuật PCR-RFLP (Mahami Oskoue, 2011) bằng chỉ thị gen nhân ITS2 kết quả có 5 mẫu *F. gigantica*, 11 mẫu *F. hepatica* và 21 mẫu *F. gigantica* và *F. hepatica*. Đây có thể là những mẫu vật mang cả đoạn gen của hai loài này. Mẫu vật tách từ trứng cũng được xác định mang đoạn gen đặc trưng của *F. gigantica* và *F. hepatica*. Kết quả này phù hợp với tác giả Lê Thanh Hòa về xác định loài *Fasciola* lai tại Việt Nam.

Để làm sáng tỏ nhận định trên của kết quả PCR và PCR-RFLP, chúng tôi đã giám định và xác định loài *Fasciola* spp. thực hiện qua phân tích gen ITS-2 (gen nhân). Tiến hành giải trình tự 5 mẫu sán lá gan lớn bao gồm một mẫu *F. hepatica* mẫu chuẩn lấy từ Nhật, 1 mẫu *F. hepatica*, 1 mẫu *F. gigantica*, 1 mẫu sán trưởng thành *F. hepatica/F. gigantica* và 1 mẫu trứng *F. hepatica/F. gigantica* được xác định bằng phương pháp RFPL. Kết quả nhận thấy mẫu được xác định là *F. hepatica* tại Quảng Nam và mẫu *F. hepatica* thu thập từ người và con trưởng thành sán lá gan lớn của người và con trưởng thành sán lá gan lớn trên trâu bò tại Quảng Ngãi dạng trung gian giữa *F. hepatica* và *F. gigantica*. Điều này đã được phát hiện trong quần thể sán lá gan lớn tại Việt Nam trên các vật chủ khác nhau (Lê Thanh Hòa, 2008; Nguyễn Thị Giang Thanh, 2009; Nguyễn Văn Đề, 2011). Đặc điểm này, một lần nữa được xác định tại mẫu vật của Quảng Ngãi. Tuy nhiên, do hạn chế của đề tài nên chúng tôi chưa có điều kiện giải trình tự gen của tất cả các mẫu vật thu được và so sánh với các mẫu của một số khu vực lân cận. Nhưng kết quả của nghiên cứu cũng thêm một bằng chứng về sự lai giữa hai loài sán lá gan lớn tại Việt Nam. Nó gợi ý về những đặc điểm bệnh cảnh lâm sàng bệnh sán lá gan lớn trên người Việt Nam có một số không giống các khu vực khác.

KẾT LUẬN

Các mẫu sán thu được trên trâu bò và người tại Quảng Ngãi có 3 kiểu gen: *F. gigantica*, *F. hepatica* và cả 2 gen *F. gigantica* và *F. hepatica*. Mẫu trứng sán thu được trên người là dạng trung gian giữa *F.*

gigantica và *F. hepatica*. Đây là một bằng chứng về dạng di truyền mới được xác định tại Quảng Ngãi cũng như tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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, tr. 53-58
2. Lê Thanh Hoà, Nguyễn Văn Đề và CS (2007), "Xác định lai ngoại loài giữa *F. gigantica* và *F. hepatica* trong quần thể SLGL ở Việt Nam trên cơ sở phân tích sinh học phân tử", *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*, 2, tr. 89-97.
3. Nguyễn Văn Đề, Nguyễn Thị Khuê, Lê Thanh Hòa (2011), "Tính lai chéo ngược dòng ở mẫu sán lá gan lớn *Fasciola* sp. thu nhận trên một bệnh nhân tại Nghệ An", *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 76 (6), tr. 34-40.
4. Agatsuma T., Arakawa Y., Iwagami M., Honzako Y., Cahyaningsih U., Kang S. Y., and Hong S. J. (2000), "Molecular evidence of natural hybridization between *F. hepatica* and *F. gigantica*", *Parasitol. International*, 49, pp. 231-238.
5. Itagaki, T., Kikawa, M., Terasaki, K., Shibahara, T. and Fukuda, K. (2005b), "Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola* spp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene", *J Vet Med Sci*, 67, pp. 1115-1118.
6. Itagaki, T., Sakaguchi, K., Terasaki, K., Sasaki, O., Yosshihara, S., Van Dung, T. (2009), "Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization base on nuclear and mitochondrial DNA", *Parasitol. Int.*, 58, pp. 81-85.
7. Mas-Coma S., Bargues MD., and Valero MA. (2005), "*Fascioliasis* and other plant-borne trematode zoonoses", *Int J Parasitol*, 35, pp. 1255-1278.
8. Mas-Coma S. (1998), "Human fascioliasis in Europe and Latin America", Balaban Publishers, Rehovot. Israel., pp. 1-17.
9. McGarry J W., Ortiz PL., Hodgkinson JE., Goreish I., Williams DJL. (2007), "PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences", *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101(5), pp. 415-421.
10. Thanh Nguyen TG, 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: 354-36.
11. WHO (1995), "Control of foodborne trematode infections". Report of a WHO Study Group. WHO Technical Report Series, No. 849: annex