

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

-----

**NGUYỄN THỊ KHUÊ**

**NGHIÊN CỨU GIẢI TRÌNH TỰ VÙNG GEN  
TRONG HỆ GEN TY THỂ CỦA LOÀI SÁN LÁ RUỘT NHỎ  
*HAPLORCHIS TAICHUI* PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội – 12/2013**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**  
**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

---

**Nguyễn Thị Khuê**

**Nghiên cứu giải trình tự vùng gen trong hệ gen ty thể  
của loài sán lá ruột nhỏ *Haplorchis taichui* phân lập tại Việt Nam**

**Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số : 60 42 01 14**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn: PGS.TS. LÊ THANH HÒA**

**Viện Công nghệ sinh học**

**Hà Nội – 12/2013**

## MỞ ĐẦU

Sán lá ruột nhỏ nguyên nhân gây ra bệnh sán lá ruột nhỏ (haplorchiasis), một bệnh kí sinh trùng lây truyền từ động vật sang người (zoonotic), được phát hiện lưu hành phổ biến ở nhiều nước châu Á, một phần châu Phi và miền Trung Nam Mỹ.

Các kết quả nghiên cứu gần đây về dịch tễ lưu hành, phân bố của sán lá ruột nhỏ tại Việt Nam, trong dự án FIBOZOPA do Đan Mạch tài trợ, đã ghi nhận có sự lưu hành của nhiều loài sán lá ruột nhỏ, trong đó chủ yếu là *Haplorchis taichui* (*H. taichui*), nguyên nhân gây bệnh sán lá ruột nhỏ ở người tại nhiều địa phương trong cả nước.

Sán lá ruột nhỏ *H. taichui* có nhiều đặc điểm tương đồng về hình thái, cũng như đặc tính gây bệnh các loài sán lá ruột nhỏ trong cùng giống *Haplorchis* và một số loài sán lá gây bệnh khác. Đây là vấn đề gây nhiều khó khăn cho việc chẩn đoán, giám định, phân biệt loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* với các loài sán lá ruột nhỏ, dựa trên các phương pháp hình thái học và sinh lí học truyền thống. Do đó, việc nghiên cứu phát hiện chỉ thị đặc trưng của loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* so sánh với các loài sán lá, đặc biệt là sán lá ruột nhỏ, nhằm tìm ra nguồn gốc lây nhiễm, phục vụ công tác giám định, phân loại, chẩn đoán, giúp cho việc áp dụng các biện pháp phòng ngừa và điều trị hiệu quả là thực sự cần thiết hiện nay.

Phương pháp nghiên cứu di truyền cho phép phân tích sự biến đổi gen ở mức độ phân tử, qua đó đánh giá những biến đổi đặc tính di truyền, bổ sung các dữ liệu có giá trị khắc phục nhược điểm của phương pháp truyền thống trong việc giám định và phân loại sinh vật. Trong đó, dữ liệu di truyền hệ gen ty thể của sinh vật, là một trong các cơ sở dữ liệu đang được sử dụng phổ biến cho việc phân tích quan hệ họ hàng và phân loại tiến hóa sinh vật, bao gồm cả các loài ký sinh trùng.

Trên thế giới, việc sử dụng một phần hoặc toàn bộ hệ gen ty thể, làm chỉ thị phân tử trong chẩn đoán, giám định nghiên cứu kí sinh trùng và sán lá ruột nhỏ đã được nhiều nước áp dụng. Ở Việt Nam, một số tác giả đã áp dụng chỉ thị di truyền trong chẩn đoán, giám định nhiều loài ký sinh trùng như: sán dây *Taenia asiatica*, sán lá phổi *Paragonimus heterotremus*, sán lá gan lớn *Fasciola gigantica*. Đặc biệt,

đổi với loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* lưu hành tại Việt Nam, một số công trình bước đầu cũng đã nghiên cứu sinh học phân tử sử dụng chỉ thị gen *cox1*, ITS-2, 16S và 18S, so sánh với các gen tương ứng trong hệ gen ty thể của các chủng thu nhận từ Ngân hàng gen (GenBank) để chẩn đoán phân loại và thẩm định loài. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có những dữ liệu hệ gen ty thể hoàn chỉnh cho các loài sán lá ruột nhỏ (heterophyid) lây truyền từ động vật sang người nói chung và *H. taichui* nói riêng, lưu hành ở các quốc gia trên thế giới cũng như tại Việt Nam trong cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen.

Xuất phát từ yêu cầu thực tế trên, nhằm bổ sung dữ liệu hệ gen ty thể của loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* lưu hành tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu giải trình tự vùng gen trong hệ gen ty thể của loài sán lá ruột nhỏ *Haplorchis taichui* phân lập tại Việt Nam”**.

**- Đối tượng nghiên cứu:**

Chủng *H. taichui* trưởng thành phân lập trên người tại Quảng Trị (Việt Nam) - kí hiệu là HTAQT.

**- Mục tiêu của đề tài:**

Giải mã một phần hệ gen ty thể (chủ yếu là gen *cox1*, 16S RNA ribosome) của loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* – loài sán lá động vật lây sang người (ĐVLSN) phổ biến (mẫu thu tại Việt Nam), phân tích và so sánh đặc điểm sinh học phân tử với các loài sán lá khác trong ngành sán dẹt (Platyhelminthes); ứng dụng chỉ thị ty thể thu được để phát triển các phương pháp chẩn đoán giám định loài.

**- Nội dung nghiên cứu:**

1. Thu nhận khoảng 3 kb dữ liệu di truyền của hệ gen ty thể chứa các gen mã hóa protein, gen RNA vận chuyển (tRNA), gen RNA ribosome (rRNA) và phân tích trật tự sắp xếp và thành phần gen của chúng trong hệ gen ty thể của chủng HTAQT.

2. Thống kê, phân tích về độ dài, trình tự nucleotide của từng nhóm gen.

3. Phân tích so sánh trình tự nucleotide và amino acid một gen đại diện mã hóa cho protein (gen *cox1*), của sán lá ruột nhỏ *H. taichui* chủng HTAQT với gen tương ứng của các chủng đại diện trong lớp sán lá.

4. Xác lập cây phả hệ sử dụng một đoạn gen đại diện (đoạn gen *coxI*) trong hệ gen ty thể chủng sán lá ruột nhỏ *H. taichui* đang nghiên cứu, với các chủng đại diện một số loài thuộc lớp sán lá.

5. Xác định vị trí sắp xếp và trình tự nucleotide trong cấu trúc bậc một (mạch thẳng) của gen mã hóa cho protein, cung cấp mô phỏng cấu trúc bậc hai của gen RNA vận chuyên (tRNA), của loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* chủng HTAQT.

## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. PHÂN LOẠI VÀ DỊCH TỄ SÁN LÁ RUỘT NHỎ *H. TAICHUI*

##### 1.1.1. Sơ lược phân loại và dịch tễ sán lá ruột nhỏ

Sán lá ruột nhỏ gồm nhiều họ khác nhau thuộc bộ Plagiorchiida (phân bộ Opithorchiata), lớp Trematoda (lớp phụ Digenea), ngành Platyhelminthes, giới Animalia, lưu hành phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới.

Trong số 70 loài sán lá ruột nhỏ được biết là ký sinh ở người, có tới 69 loài sán ruột nhỏ thuộc 11 họ sán lá ruột nhỏ khác nhau được phát hiện ký sinh ở người, trong đó:

- Họ Heterophyidae có 31 loài;
- Họ Echinostomatidae có 21 loài;
- Họ Leicithodendriidae có 5 loài;
- Họ Plagiorchiidae có 4 loài;
- Ba họ: Diplostomidae, Nanophyetidae và Paramphistomatidae, mỗi họ có 2 loài;
- Bốn họ: Gastrodiscidae, Gymnophallidae, Microphllidae và Strigeidae, mỗi họ chỉ có 1 loài được phát hiện kí sinh ở người.

Đáng chú ý là hai họ Heterophyidae và Echinostomatidae, có số loài được phát hiện kí sinh ở người nhiều nhất và lây truyền chủ yếu qua cá (WHO/WR, 2002). Họ Heterophyidae được Odhner phát hiện năm 1914, thường ký sinh ở chim, một số loài động vật có vú và người (Chai *et al.*, 2007). Trong họ này, các loài trong giống *Haplorchis* được đặc biệt quan tâm. Hiện nay, đã có 5 loài thuộc giống *Haplorchis* được thông báo gây bệnh trên người, bao gồm: *H. taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *H. pleurolophocerca* và *H. vanissimus* (WHO/WR, 2002). *H. pumilio*, *H. taichui* và *H. yokogawai* là ba loài gây bệnh haplorchiasis được thường xuyên công bố tại các nước châu Á bao gồm: Trung Quốc, Philippin, Thái Lan, Lào, Campuchia và Việt Nam (Belizario *et al.*, 2004; Chai *et al.*, 2009; 2010; Dung *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2010). Loài *H. yokogawai* được phát hiện ký sinh trên người ở

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu <http://www.lrc-tnu.edu.vn/>

Philippin, Indonesia, Thái Lan, Trung Quốc và Đài Loan, bởi Katsuta vào năm 1932. *H. pumilio* được Loss phát hiện năm 1986, phân bố lưu hành và ký sinh trên người ở các quốc gia: Đài Loan, Trung Quốc, Philippin, Ai Cập, Thái Lan, Australia và cả ở Việt Nam (De, Le, 2011).

### 1.1.2. Dịch tễ học sán lá ruột nhỏ *H. taichui*

Sán lá ruột nhỏ *H. taichui* thuộc giống *Haplorchis* trong họ Heterophyidae được Nishigori phát hiện lần đầu tiên vào năm 1924, ký sinh trên người ở Philippin. Cho đến nay, *H. taichui* được ghi nhận là lưu hành rộng rãi ở Thái Lan, Lào, Đài Loan, Bangladesh, Ấn Độ, Sri Lanka, Palestin, Ai Cập, I rắc, nam Trung Quốc, Malaysia và Việt Nam (Dung *et al.*, 2007; Chai *et al.*, 2004; 2007; 2012; De, Le, 2011). Sán lá ruột nhỏ *H. pumilio* được Loss phát hiện năm 1986, phân bố lưu hành và ký sinh trên người ở Đài Loan, Trung Quốc, Philippin, Ai Cập, Thái Lan, Australia và Việt Nam (De, Le, 2011).

Điều tra quốc gia về tình hình nhiễm bệnh giun sán tại Hàn Quốc năm 2004 cho thấy, tỉ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis* và sán lá ruột nhỏ (Heterophyidae) đã tăng lên so với các năm điều tra trước. Tổng số người được xét nghiệm phân dương tính với sán lá nhỏ họ Heterophyidae là 228.253 người (Kim *et al.*, 2009).

Tại Lào, sán lá ruột nhỏ trưởng thành *H. taichui* được phát hiện đầu tiên năm 1991 trên 5 học sinh tại trường Czechslovakia (Giboda *et al.*, 1991). Từ đó đến nay, tình hình nhiễm *H. taichui* tại Lào ngày càng phổ biến. Năm 2007, tại tỉnh Savannakhet có 67,1% người nhiễm các loài sán lá gan nhỏ và sán lá ruột nhỏ, nhiễm phối hợp *O. viverrini* và 6 loài sán lá ruột nhỏ khác. Trong tổng số 7.693 sán trưởng thành được thu nhận, đa số là các loài *H. taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *Prosthodendrium molenkampii*, *Phaneropsolus bonnei*, và *Echinostoma spp* (Chai *et al.*, 2007). Tại một nghiên cứu khác ở hai tỉnh của Lào cho thấy có 65,2% số người được xét nghiệm bị nhiễm phối hợp giữa sán lá gan nhỏ *O. viverrini* với sán lá ruột nhỏ bao gồm các loài *H. taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *Centrocestus caninus*, *P. molenkampii*, *P. bonniei*. Tiếp đó, năm 2009, một nghiên cứu sử dụng phương pháp xét nghiệm phân cho thấy 62,9% những người được xét nghiệm (97 người) đã

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu <http://www.lrc-tnu.edu.vn/>

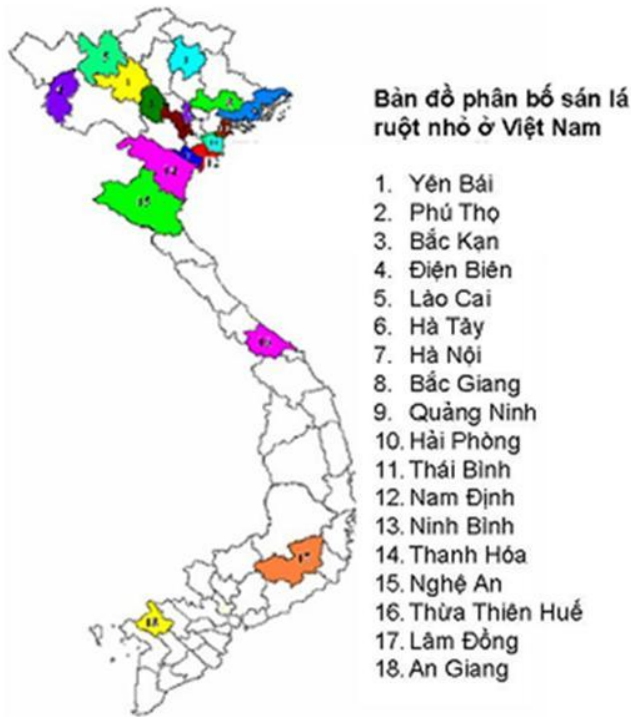
nhiễm các loại sán lá ruột nhỏ, sau khi được điều trị và tẩy đái. Sán lá trưởng thành thu thập bao gồm 76/97 (78,4%) *H. taichui*, trong khi tỷ lệ nhiễm với *P. bonnie* là 22.7%, *P. molenkampi* (14.4%), *H. pumilio* (5.2%), *H. yokogawai* (3.1%) và *Echinochasmus japonicus* (3.1%) (Sayasone *et al.*, 2009). Trong nghiên cứu của Chai và cộng sự năm 2013 tại Lào, cho thấy người nhiễm sán lá ruột nhỏ *H. taichui* rất phổ biến, với tỉ lệ nhiễm cao ở hai tỉnh Saravane và Champasak trung bình 121.565 và 12.079 sán/người (Chai *et al.*, 2013).

Tại Thái Lan có 14 loài sán lá đã được ghi nhận, trong khi đó tại Philippin là 12 loài, tại Indonesia là 8 loài và Malaysia là 4 loài (Waikagul, 1991). Một cuộc điều trị tổng quát ở phía Nam Phillipin cho thấy 36% bệnh nhân có biểu hiện đau vùng bụng do heterophyid, chủ yếu là do *H. taichui* (Liu, 2012).

Chính do sự phân bố rộng rãi đó mà bệnh sán lá ruột nhỏ đang ngày càng chiếm lĩnh sự quan tâm của cộng đồng ở châu Á, châu Phi và Trung Nam Mỹ (Chai *et al.*, 2009; 2010; Dung *et al.*, 2007). *H. pumilio*, *H. taichui* và *H. yokogawai* là ba loài gây bệnh haplorchiasis được thường xuyên công bố tại các nước châu Á bao gồm: Trung Quốc, Philippin, Thái Lan, Lào, Cambodia và Việt Nam (Belizario *et al.*, 2004; Chai *et al.*, 2009; 2010; Dung *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2010).

Tại Việt Nam, haplorchiasis được ghi nhận do nhiều loài sán lá ruột nhỏ. Do tập quán ăn gỏi cá nên con người cũng bị nhiễm với tỷ lệ cao ở một số vùng đặc hữu. Tỉnh Nam Định được biết đến như một vùng đặc hữu với tỷ lệ nhiễm sán lá truyền qua cá (Fish-borne zoonotic trematodes (FZT)) cao ở người (64,9%), mèo (70,2%) và chó (56,9%) (Dung *et al.*, 2007). Đặc biệt, có trường hợp bệnh nhân được phát hiện mang trong người tới 4.834 sán lá ruột nhỏ và sán lá gan nhỏ (De, 2004). Chó, mèo và lợn cũng bị nhiễm sán lá lây truyền từ cá với tỷ lệ 13 - 38% (Skov *et al.*, 2009; Dung *et al.*, 2007; Van *et al.*, 2009). Mười tám tỉnh của Việt Nam, đặc biệt là ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam đã được xác định là vùng dịch tễ cho sán lá ruột nhỏ. Các khu vực này bao gồm vùng cao nguyên và cao nguyên miền núi, đồng bằng sông Hồng, vùng đồng bằng ven biển và đồng bằng sông Cửu Long (De, Hop, 2006) (Hình 1.1).





**Hình 1.1.** Bản đồ phân bố sán lá ruột nhỏ ở Việt Nam  
(Nguyễn Văn Đề và cs., 2008)

## 1.2. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC SÁN LÁ RUỘT NHỎ *H. TAICHUI*

### 1.2.1. Hình thái, cấu tạo

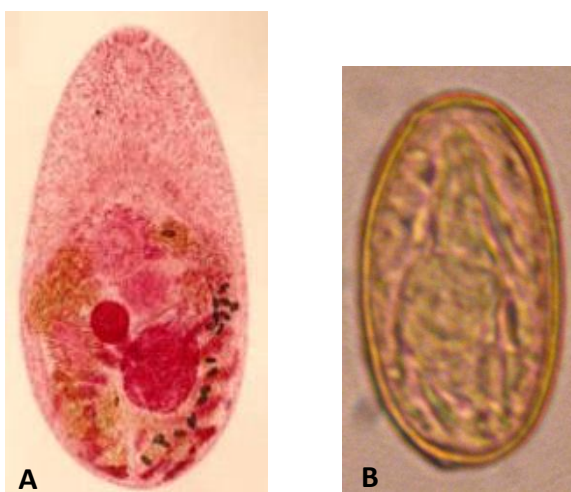
Giống như nhiều loài sán lá ruột nhỏ khác, *H. taichui* trưởng thành có hình chiếc lá dẹt theo hướng lưng bụng hoặc hình trụ. Kích thước cơ thể dao động từ 0,1-120  $\mu\text{m}$ .

Cơ quan bám đặc trưng là giác bám và gai bám thường nằm phần trước và phần sau mặt bụng. Giác miệng nằm ở phía trước cơ thể có đường kính khoảng 0,06 mm, giác bụng nằm lệch về phía bên phải dọc trục cơ thể nối với giác sinh dục tạo thành cơ quan giác bụng - sinh dục. Buồng trứng nằm phía trước tinh hoàn, tử cung chứa đầy trứng tạo thành nhiều gấp khúc. Tinh hoàn lớn, nằm ở phía dưới (Le *et al.*, 2004) (Hình 1.2A).

Trứng của *H. taichui* hình oval, vỏ dày, nhẵn, có nắp nhô lên giống như có vai, có thể có mấu nhỏ ở phía dưới hoặc không, kích thước (25-28)  $\mu\text{m}$  x (12-15)  $\mu\text{m}$  (Mishra *et al.*, 2007) (Hình 1.2B). Trong một nghiên cứu tại Nam Định, kích thước của *H. taichui* là: (24,2-28)  $\mu\text{m}$  x (12,8-16)  $\mu\text{m}$ ; của *H. pumilio* là (25,5-31,9)  $\mu\text{m}$  x

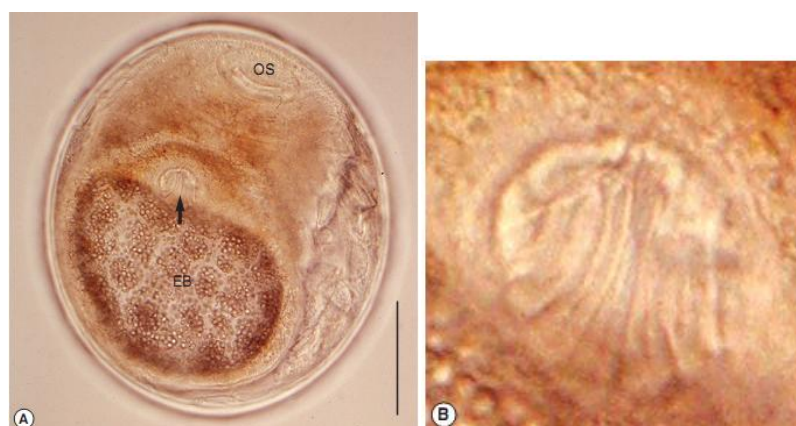
Số hóa bởi Trung tâm Học liệu <http://www.lrc-tnu.edu.vn/>

(12,8-17,9)  $\mu\text{m}$  (De Lellis *et al.*, 2008). Trứng của các loài sán lá ruột nhỏ này có hình thái và kích thước gần giống nhau, do đó bằng kỹ thuật xét nghiệm phân thông thường như Kato hoặc Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972), không thể phân biệt được trứng của loài sán lá ruột nhỏ này với trứng của loài sán lá khác (Nguyễn Văn Đê và Lê Thanh Hòa, 2006).



**Hình 1.2.** Sán lá ruột nhỏ *H. taichui* trưởng thành (A) và trứng của *H. taichui* (B) (Dung *et al.*, 2007).

Ấu trùng (metacercaria) của *H. taichui* có hình elip có kích thước (0,19-0,22) x (0,16-0,19) mm, giống như quả bóng chày (Hình 1.3A). Bộ phận sinh dục ở phần bụng có 11-19 hạt kitin và một hệ bài tiết hình bầu dục, gọi là túi sinh dục – bụng (ventrogenital). Bộ phận này chiếm một khoảng không gian lớn nằm ở phía đuôi (Rim *et al.*, 2008) (Hình 1.3B).



**Hình 1.3.** Ấu trùng *H. taichui* (Rim *et al.*, 2008). (A): Ấu trùng *H. taichui* phát hiện trong cá nước ngọt ở Lào; (B): Hình phóng to các túi ventrogenital hình găng tay (mũi tên trong hình A). **Ghi chú:** OS (oral sucker): giác miệng, EB (excretory bladder): bộ phận bài tiết.

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu

<http://www.lrc-tnu.edu.vn/>