

XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM VÀ THÀNH PHẦN SÁN LÁ KÝ SINH TRÊN MÈO Ở TỈNH BẾN TRE BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÌNH THÁI VÀ CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Nguyễn Hữu Hưng¹, Nguyễn Hồ Bảo Trân¹, Phạm Thị Kim Phụng²

TÓM TẮT

Đề tài “Xác định tỷ lệ nhiễm và thành phần sán lá ký sinh trên mèo ở tỉnh Bến Tre bằng phương pháp hình thái và chỉ thị phân tử” đã được thực hiện ở 2 huyện Bình Đại và Châu Thành, tỉnh Bến Tre từ tháng 8/2015 đến tháng 9/2016. Tổng số 61 con mèo đã được mổ khám để tìm sán lá ký sinh. Mẫu sán lá được định danh dựa vào hình thái học, sau đó 5 mẫu được ly trích DNA để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu và giải trình tự gene ITS+.

Kết quả khảo sát cho thấy mèo nuôi ở Bến Tre nhiễm sán lá với tỷ lệ 18,03%. Tỷ lệ mèo >24 tháng tuổi nhiễm sán lá (24,24%) cao hơn rất nhiều so với mèo ở nhóm 13-24 tháng tuổi (0,07%). Có 4 loài sán lá đã được tìm thấy ở mèo, trong đó có 3 loài ký sinh ở gan-mật là *Opisthorchis felineus* (14,57%); *Platynosomum fastosum* (3,28%) và *Opisthorchis viverrini* (1,64%) và 1 loài ký sinh ở ruột non là *Amphimerus pseudofelineus* (3,28%). So sánh trình tự nucleotide của đoạn gene mã hóa ITS+ của 2 mẫu sán lá *O. viverrini* trên mèo với các mẫu gene tương tự của loài sán lá này trên Ngân hàng Gene đã khẳng định 2 mẫu sán lá kiểm tra đều thuộc loài *Opisthorchis viverrini*, chứng tỏ kết quả xác định các loài sán lá nhỏ dựa vào đặc điểm hình thái ở trên là chính xác.

Từ khóa: mèo, sán lá nhỏ, tỷ lệ nhiễm, định loài, giải trình tự gene ITS+, tỉnh Bến Tre

The prevalence of small flukes in domestic cats in Ben Tre province and their species identification by morphology and molecular markers

Nguyen Huu Hung, Nguyen Ho Bao Tran, Pham Thi Kim Phung

SUMMARY

This study was conducted to investigate the prevalence of small flukes in the domestic cats in Binh Dai and Chau Thanh districts, Ben Tre province from August 2015 to September 2016 and to identify their species by morphological characteristics and molecular markers. A total of 61 cats were necropsied to find the small flukes. The collected flukes were identified firstly by morphological characteristics, then five fluke samples were randomly collected for DNA extraction. After that PCR was conducted with specific primers and ITS+ gene sequence.

The investigated results showed that the domestic cats in Ben Tre were infected with flukes with the rate of 18.03%. The infected rate with flukes of the cats older than 24 months was (24.24%) higher than that of the cats at 13-24 months old (0.07%). Four species of flukes were detected, of which three species were found in liver and bile, including *Opisthorchis felineus* (14.57%), *Platynosomum fastosum* (3.28%), *Opisthorchis viverrini* (1.64%) and one (*Amphimerus pseudofelineus*) was found in intestine (3.28%). Comparison of nucleotide sequence of the two gene segments encoding ITS+ of the 2 small fluke samples identified in cats with those from GenBank confirmed that 2 fluke samples belonged to species *O.viverrini*. This result indicates that determination of small fluke species based on morphological characteristics is applicable.

Keywords: cat, small flukes, prevalence, species identification, ITS+gene sequencing, Ben Tre province

¹ Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và SHƯĐ, Đại học Cần Thơ

² Trường Cao đẳng Nông nghiệp Bến Tre

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các loài sán lá gan nhỏ như *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* là một trong những nguyên nhân gây nhiễm trùng đường mật, sỏi mật, ung thư mật, ung thư gan trên người (Sripa, B, 2011). Bệnh ung thư đường mật (Cholangio carcinoma) còn được ghi nhận là một trong những nguyên nhân dẫn đến tử vong người ở vùng Đông Bắc Thái Lan và ước tính trên thế giới có 9 triệu người bị nhiễm loài sán lá gan này, trong đó Thái Lan chiếm 7 triệu (Kuper & cs, 2000). Việt Nam và Thái Lan đều nằm trong cùng khu vực Đông Nam Á nên điều kiện khí hậu khá tương đồng, thuận lợi cho các loài sán lá ký sinh phát triển. Thêm vào đó, số lượng chó và mèo được nuôi như thú cưng ở Việt Nam ngày càng tăng lên đáng kể. Chó và mèo được xem là ký chủ dự trữ (reservoir hosts) đối với nhiều loài sán lá, trong đó có loài *O.viverrini*. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về khu hệ sán lá trên mèo ở Việt Nam. Chính vì vậy, chúng tôi tập trung nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm và thành phần các loài sán lá ký sinh trên mèo nhằm góp phần bảo vệ sức khỏe vật nuôi cũng như ngăn chặn nguồn lây lan dịch bệnh sang người, ảnh hưởng tới sức khỏe cộng đồng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm tiến hành thí nghiệm

Thời gian: từ tháng 8 năm 2015 đến tháng 9 năm 2016.

Địa điểm: lấy mẫu ở lò mổ mèo tư nhân và tại các phòng mạch thú y trên địa bàn 2 huyện Châu Thành và Bình Đại thuộc tỉnh Bến Tre. Tiến hành định danh tại phòng thí nghiệm Ký sinh trùng-Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Đối tượng khảo sát

Số mèo mổ khảo sát tìm sán lá ký sinh thuộc 2 nhóm tuổi từ 13-24 tháng tuổi và trên 24 tháng tuổi. Việc xác định lứa tuổi dựa vào phương pháp xem răng đoán tuổi theo Sisson (1959).

2.3 Phương pháp bảo quản và định danh mẫu

vật bằng phương pháp truyền thống dựa vào đặc điểm hình thái

Sán lá được rửa sạch bằng nước muối sinh lý, bảo quản trong cồn 70°. Việc định danh phân loại mẫu sán lá dựa vào một số đặc điểm về hình thái, cấu tạo của sán lá theo khóa định loài sán lá nhỏ của tác giả Nguyễn Thị Lê (2000).

2.4 Phương pháp định danh sán lá nhỏ bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Phương pháp chiết tách DNA

Mẫu vật bảo quản trong cồn 70% được lấy ra và cho cồn bay hơi hết trong ly tâm chân không, sau đó rửa nhiều lần bằng PBS. Mẫu vật được nghiền kỹ, cho bi sắt vào và lắc bằng máy lắc. Sau đó cho Lysis buffer vào mẫu đã được nghiền và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Mẫu được ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút, trong 10 phút và giữ lại phần dịch lỏng. Cho ethanol 95% với tỷ lệ 1:1 so với dung dịch lỏng vừa thu được, ly tâm 13000 vòng/phút, trong 10 phút, và thu kết tủa. Phần kết tủa được rửa bằng ethanol 70%, ly tâm 13000 vòng/phút, trong 5 phút. Kết tủa sau khi ly tâm tiếp tục sấy khô chân không và hòa tan trong TE 0.1X.

Phương pháp PCR và giải trình tự gene ITS+

Các mẫu DNA sán lá có độ tinh sạch cao (OD_{260}/OD_{280} : 1.8-2) và đạt nồng độ lớn hơn 50 ng/ μ l được sử dụng để nhân đoạn gene ở vùng ITS+ bằng phương pháp PCR, sử dụng 1.25 units Tag polymerase, 0.4 mM dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 50 pmol cho cả mỗi xuôi và mỗi ngược, và PCR buffer. Primer được sử dụng trong thí nghiệm là ITS-F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', và ITS-R: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' (Gasser & cs, 1996).

Chu trình luân nhiệt để nhân đoạn gene ITS+ là 94°C/5 phút, 35 chu kỳ tiếp theo: 94°C/1 phút, 54°C/30 giây, 72°C/1 phút, và chu kỳ kéo dài 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1%, sau đó nhuộm ethidium bromide, chụp ảnh gel và kiểm tra kích thước của sản phẩm.

Giải trình tự chuỗi nucleotide của ITS+

Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch sẽ được gửi đến công ty MacroGen (Hàn Quốc) để giải trình

tự. Trình tự gene ITS+ rDNA được sử dụng để xác định vị trí phân loại của loài trên cơ sở so sánh với trình tự nucleotide của các mẫu gene tương ứng của loài sán lá *O.viverrini* có trên GenBank.

Phân tích và xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Excel để tính trị số trung bình và sai số chuẩn. Trình tự đoạn gene ITS+ của

mẫu vật được sử dụng truy cập Ngân hàng Gene dùng chương trình Blast (NCBI) để so sánh với trình tự trong GenBank; MEGA 7 để vẽ cây phả hệ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm sán lá ở mèo tại các địa điểm khảo sát

Bảng 1. Tỷ lệ nhiễm sán lá ở mèo tại các địa điểm khảo sát

Địa điểm	SMMK	Số mèo nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)
Huyện Bình Đại	32	7	21,88
Huyện Châu Thành	29	4	13,79
Tổng	61	11	18,03

*SMMK:số mèo mổ khám

Qua số liệu ở bảng 1, khi mổ khảo sát 61 con mèo ở 2 huyện Bình Đại (32 con) và Châu Thành (29 con), cho thấy mèo nhiễm sán lá với tỷ lệ nhiễm chung là 18,03%. Xét về tỷ lệ nhiễm theo huyện khảo sát: huyện Bình Đại, huyện Châu Thành có tỷ lệ nhiễm lần lượt là 21,88% và 13,99%. Ở đây qua khảo sát cho thấy mèo đều thường xuyên ăn thức ăn tươi sống theo tập tính tự săn bắt mồi nên rất dễ

nhiễm sán lá. Kết quả thu được qua mổ khám mèo trong từng huyện đã cho thấy một mức nhiễm sán lá đáng báo động trên địa bàn khảo sát.

3.2 Kết quả tình hình nhiễm sán lá ở mèo theo lứa tuổi

Tỷ lệ nhiễm sán lá ở mèo theo lứa tuổi được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm sán lá ở mèo theo lứa tuổi

Lứa tuổi (tháng)	SMMK	Số mèo nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)
13-24	28	3	10,71
> 24	33	8	24,24

* SMMK:số mèo mổ khám

Với 28 mèo được mổ khám ở lứa tuổi 13-24 tháng và 33 mèo ở lứa tuổi >24 tháng, kết quả cho thấy mèo >24 tháng tuổi nhiễm sán lá với tỷ lệ 24,24%, cao hơn rất nhiều so với mèo ở giai đoạn 13-24 tháng tuổi (10,71%). Nhận thấy ở giai đoạn trưởng thành, mèo dễ tiếp xúc với các vật chủ trung gian như nhau nên dễ nhiễm bệnh sán lá và nhiễm với tỷ lệ khá cao.

3.3 Kết quả xác định thành phần loài sán lá ký sinh ở mèo tại tỉnh Bến Tre

Qua thu thập 614 mẫu sán lá ký sinh ở mèo, dựa vào khóa định danh phân loại của Nguyễn

Thị Lê (2000) đã tìm thấy có 4 loài sán lá ký sinh trên mèo, trong đó có 3 loài ký sinh ở gan-mật là *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, *Platynosomum fastosum* và 1 loài ký sinh ở ruột là *Amphimerus pseudofelineus*. Trong 4 loài sán lá phát hiện, loài sán lá gan *Opisthorchis felineus* nhiễm với tỷ lệ cao nhất 14,57%, kế đến là loài *Platynosomum fastosum* có tỷ lệ nhiễm 3,28%, loài *Amphimerus pseudofelineus* có tỷ lệ nhiễm 3,28% và thấp nhất là loài *Opisthorchis viverrini* 1,64%. Mèo ở nhóm tuổi 13-24 tháng tuổi nhiễm 1/4 loài tìm thấy là *Opisthorchis felineus*, mèo ở nhóm tuổi >24 tháng tuổi nhiễm 4/4 loài tìm thấy.

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm các loài sán lá ở mèo

TT	Thành phần loài	VTKS	Nhiễm trùng		CDN $\bar{X}_{\min}-\bar{X}_{\max}$	Nhiễm theo lứa tuổi	
			SMN	TLN (%)		13-24	>24
					TLN (%)	TLN (%)	
1	<i>Amphimerus pseudofelineus</i>	RN	2	3,28	3-7	0	6,06
2	<i>Opisthorchis felineus</i>	G-M	9	14,75	1-24	10,71	18,18
3	<i>Opisthorchis viverrini</i>	G-M	1	1,64	359	0	3,03
4	<i>Platynosomum fastosum</i>	G-M	2	3,28	60-118	0	6,06

VTKS: vị trí ký sinh, *STT: số thứ tự; SMN: số mèo nhiễm; TLN: tỷ lệ nhiễm; CDN: cường độ nhiễm; G-M: Gan-Mật; \bar{X}_{\min} : số sán/cá thể thấp nhất; \bar{X}_{\max} : số sán/cá thể cao nhất

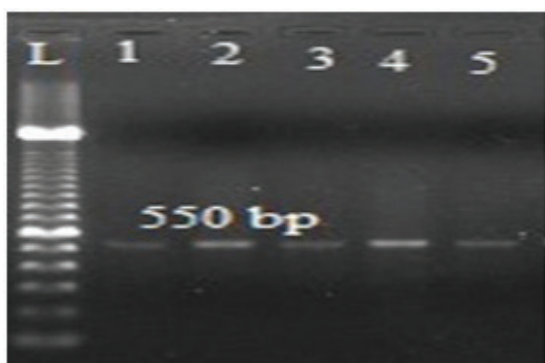
Về cường độ nhiễm, các loài sán lá gan nhiễm với số lượng khá cao; 359 con/cá thể đối với loài sán lá gan *Opisthorchis viverrini*, với loài *Platynosomum fastosum* 60-118 con/cá thể, với loài *Opisthorchis felineus* nhiễm 1-24 con/cá thể. Trong đó cường độ nhiễm thấp nhất ở loài sán lá ruột *Amphimerus pseudofelineus* 3-7 con/cá thể.

Trong 4 loài sán lá được tìm thấy trong nghiên cứu về sán lá ký sinh ở mèo tại tỉnh Bến Tre cho thấy tất cả các loài này đều có thể truyền lây sang người. Qua nghiên cứu của tác giả Sripa & cs (2011), (2012) tổng hợp chó, mèo nhiễm sán lá gan do *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus*, và *Clonorchis sinensis* là một vấn đề y tế công cộng lớn ở Đông Á và Đông Âu. Hiện nay, có hơn 600 triệu người có nguy cơ nhiễm các loại sán. Muller Ralph (2000) đã tổng hợp có 73 loài sán lá mà ký chủ cuối cùng là chó, mèo và người,

trong đó có các loài đã được tìm thấy như: *Echinochamus perfoliatus* (Lu, 1996); *Echinostoma revolutum* (Lu, 1982); *Heterophyes heterophyes* (Murrell, 1995); *Heterophyopsis continua* (Chai & Lee, 1990); *Amphimerus pseudofelineus* (Dill, 1993); *Opisthorchis felineus* (Lebedev, 1990); *Opisthorchis viverrini* (Hinz, 1996).

3.4 Kết quả định danh sán lá gan trên mèo bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Khi thu thập mẫu sán lá trong quá trình mổ khám, chúng tôi chọn 5 mẫu sán lá thuộc loài *Opisthorchis viverrini* đã được định danh bằng đặc điểm hình thái, đưa vào tách chiết DNA dùng cho phản ứng PCR. Sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,5%, kết quả cho thấy phản ứng đã nhận diện được đoạn gen đặc hiệu của các mẫu sán lá kích thước tương ứng là 550 bp (hình 1).

**Hình 1. Kết quả điện di trên gel**

Ghi chú: Giếng L: Thang chuẩn 100 bp; Giếng 1, 2, 3, 4, 5: mẫu *Opisthorchis viverrini*

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen ITS+ có độ dài 550 bp được tinh sạch và giải trình tự. Kết quả cho thấy 2/5 mẫu sản lá có băng điện di rõ được chọn để giải trình tự. So sánh mức độ tương đồng đoạn gen ITS+ của sản lá trên với các đoạn gen ITS+

bất kỳ tìm thấy trên Ngân hàng Gen đã khẳng định 2 mẫu khảo sát là loài *Opisthorchis viverrini* với mức tương đồng cao 99%.

3.5 Kết quả phân tích đặc điểm chuỗi nucleotide của đoạn gen ITS+

Bảng 4. Sự tương đồng về trình tự acid amin phía trên bên phải đường chéo ma trận và sự tương đồng về trình tự nucleotide phía dưới bên trái đường chéo ma trận

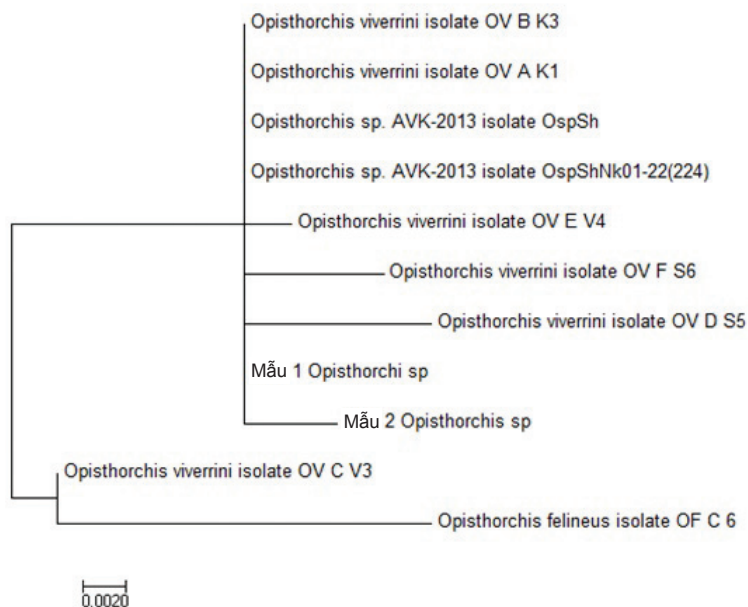
Seq->	OV_B_K3	OV_A_K1	AVK-2013	AVK-2013(224)	OV_E_V4	OV_F_S6	OV_D_S5	OV_C_V3	OF_C_6	Mẫu 1 O.sp	Mẫu 2 O.sp
OV_B_K3		100	100	100	99.3	98	98	98	94.1	100	98.7
OV_A_K1	100		100	100	99.3	98	98	98	94.1	100	98.7
AVK-2013	100	100		100	99.3	98	98	98	94.1	100	98.7
AVK-2013(224)	100	100	100		99.3	98	98	98	94.1	100	98.7
OV_E_V4	99.7	99.7	99.7	99.7		97.4	97.4	97.4	93.5	99.3	98
OV_F_S6	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1		96.1	96.1	92.2	98	96.7
OV_D_S5	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	98.4		96.1	92.9	98	96.7
OV_C_V3	98.7	98.7	98.7	98.7	98.4	98	97.8		96.1	98	96.7
OF_C_6	96.9	96.9	96.9	96.9	96.7	96.3	96.1	98.2		94.1	93.5
Mẫu 1 O.sp	100	100	100	100	99.7	99.3	99.1	98.7	96.9		98.7
Mẫu 2 O.sp	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	98.9	98.7	98.2	96.5	96.5	

Kết quả cho thấy trình tự nucleotide của mẫu 1 và mẫu 2 có 2 vị trí sai khác nucleotide dẫn đến khác biệt về 2 acid amin, như vậy mẫu 1 và mẫu 2 có thể cùng một loài. So sánh trình tự mẫu 1 với trình tự nucleotide các loài OV_B_K3, OV_A_K1, AVK-2013, AVK-2013(224) cho thấy không có vị trí nào sai khác. Tuy nhiên so với trình tự nucleotide của loài OF_C_6 cho thấy có đến 14 vị trí sai khác nucleotide, trong đó có 9 vị trí sai khác nucleotide dẫn đến sai khác acid amin. Các vị trí sai khác nucleotide dẫn đến sai khác về acid amin giữa mẫu 1 và loài OF_C_6 gồm: vị trí nucleotide thứ 60 (G↔A), 70 (C↔A), 140 (C↔T), 207 ((C↔T), 239 (T↔C), 270 (G↔A), 349 (T↔C), 370 (C-T), 391 (T↔C) dẫn đến thay đổi các acid amin ở các vị trí 20 (M↔T), 24 (P↔T), 47 (T↔I), 71 (M↔V), 80 (L↔T), 90 (M↔L), 117 (C↔R),

124 (L↔F), 131 (F↔L). Tương tự, so sánh trình tự mẫu 1 với trình tự các loài OV_E_V4, OV_F_S6, OV_D_S5, OV_C_V3 cho thấy có ít vị trí sai khác hơn so với loài OF_C_6. Như vậy, cho thấy mẫu 1 và mẫu 2 là loài *Opisthorchis viverrini*.

Qua ma trận ở bảng 4 cho thấy mẫu 1 và mẫu 2 có độ tương đồng cao nhất về nucleotide từ 99,5%-100% và acid amin 98,7-100% so với loài OV_B_K3, OV_A_K1, AVK-2013, AVK-2013(224). Từ đó cho thấy có thêm độ tin cậy nữa là mẫu 1 và mẫu 2 là loài *Opisthorchis viverrini*.

Qua cây phả hệ cho thấy mẫu 1 và mẫu 2 cùng nhóm với loài OV_B_K3, OV_A_K1, AVK-2013, AVK-2013(224). Kết hợp với các phân tích trên có thể khẳng định mẫu 1 và mẫu 2 là loài *Opisthorchis viverrini*.



Hình 2. Cây phả hệ phát sinh loài dựa theo trình tự nucleotide gen ITS+

IV. KẾT LUẬN

Qua mổ khám cho thấy mèo ở Bến Tre nhiễm sán lá nhỏ với tỷ lệ là 18,03%. Tỷ lệ nhiễm sán lá ở mèo trên 24 tháng tuổi cao gấp 2 lần so với mèo dưới 24 tháng tuổi. Có 4 loài sán lá nhỏ được tìm thấy ở mèo tại Bến Tre là *Amphimerus pseudofelineus*; *Opisthorchis felineus*; *Opisthorchis viverrini* và *Platynosomum fastosum*. Trong 4 loài phát hiện, có 3 loài ký sinh ở gan-mật và 1 loài ký sinh ở ruột. Tất cả các loài đã phát hiện trong nghiên cứu này đều có khả năng truyền lây từ động vật sang người, do vậy cần được quan tâm nghiên cứu.

Trình tự gene mã hóa ITS+ dài 550 bp của loài *Opisthorchis viverrini* có độ tương đồng 99% với loài *Opisthorchis viverrini* từ Genbank.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Lê (2000) *Động vật chí*, tập 23: sán lá ký sinh. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội
2. Sisson S. (1959) *The anatomy of the domestic animal*, W.B.Saunders Philadelphia and London, Great Britain
3. Gasser RB, Stevenson LA, Chilton NB, Nansen P, Bucknell DG, Beveridge I (1996) Species markers for equine strongyles detected in intergenic rDNA by PCR-RFLP. *Molecular and Cellular Probes* 10: 371-378.
4. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of Internal Medicine* 248(3): 171-183.
5. Muller R (2000). Dogs and Trematode Zoonoses. In: Macpherson CLN, Meslin CF, Wandeler IA (eds).
6. Sripa B, Sithithaworn P, Andrews R, Nawa Y, Brindley PJ (2012) *Opisthorchiasis* and *Clonorchiasis*: Major neglected tropical diseases in Eurasia. *Parasitology International* 61(1): 1-222.
7. Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, Mulvenna J, Laha T, Hotez PJ, Brindley PJ (2011) *Opisthorchiasis* and *Opisthorchis*-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Tropica* 120(1): 158-168.