

# PHÂN BIỆT SÁN LÁ RUỘT NHỎ *Haplorchis taichui* và *H. pumilio* VỚI CÁC LOÀI SÁN LÁ KHÁC SỬ DỤNG CHỈ THỊ ITS-2 (Internal Transcribed Spacer)

Discrimination of tiny trematodes (*Haplorchis taichui* and *H. pumilio*) to other species using ITS-2 (Internal Transcribed Spacer) markers

Kim Văn Vạn<sup>1,3</sup>, Lê Thanh Hòa<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Bích Nga<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thị Tuyết Nhung<sup>2</sup> và Anders Dalgaard<sup>3</sup>

## SUMMARY

*Haplorchis* spp are tiny trematodes can be found in the small intestines of various definitive hosts such as human, birds, cats, dogs and rats. Human and other definitive hosts are infected by eating raw freshwater fishes containing encysted metacercariae. *Haplorchis* spp. is not easy to discriminate from other trematodes due to their minute size, similar morphology of eggs, cercaria, metacercaria and adult worm. A molecular method, for the first time in Vietnam, was applied to identify *H. pumilio* and *H. taichui* based on amplification of ITS-2 using forward primer, 3SF: 5'-GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG-3' and reverse primer BD2R: 5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3-BD2R) with annealing at 50°C in the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for analyzing the nucleotide composition. Samples including adult worm and metacercariae were collected on human and fish in NamDinh province, Vietnam and Bangkok, Thailand. The length of ITS-2 specific for *H. taichui* is 446bp; and for *H. pumilio* is 290bp. ITS-2 sequence in *H. taichui* was found longer than that in *H. pumilio*, due to the insertion of 154 nucleotides between nucleotide 198 and 352. There was high identity rate (99-100%) of nucleotides in the ITS-2 gene in *H. taichui* and *H. pumilio* of Vietnamese and Thai collected sample, respectively.

**Key words:** *Haplorchis* spp, *H. taichui*, *H. pumilio*, PCR, identity.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sán lá ruột nhỏ (*Haplorchis* spp.) thuộc họ Heterophyidae thường ký sinh trong ruột non của người, gia súc và gia cầm (Yamaguti, 1958; Pear, 1964; Cheng, 1974; Pearson, 1982). Người và các động vật trên cạn nhiễm loài sán này do ăn gỏi, ăn lẩu hoặc ăn cá sống có chứa ấu trùng metacercariae. Người và động vật trên cạn nhiễm sán lá ruột nhỏ với số lượng lớn thường có biểu hiện đau đầu, buồn nôn, viêm ruột và ỉa chảy. Tác hại trực tiếp của loài sán này đối với người và động vật không lớn nhưng khi sán ký sinh tạo các vết loét là cửa ngõ cho các tác nhân khác

xâm nhập vào cơ thể. *Haplorchis* spp. là loại ký sinh trùng gây ra bệnh truyền lây giữa động vật dưới nước (cá) và động vật trên cạn (Fish-born parasites, FZP). Khi cá nhiễm các loại ấu trùng này thường bị giảm chất lượng sản phẩm và giảm giá trị hàng hoá, đặc biệt khi sản phẩm thủy sản được xuất khẩu sang các thị trường khó tính như châu Âu, Mỹ và Nhật Bản.

Trong một tế bào của cơ thể động vật luôn tồn tại 2 hệ gen: hệ gen nhân tế bào và hệ gen ty thể, hai hệ gen này hoạt động có tính chất vừa độc lập vừa tương tác và hệ gen ty thể chịu ảnh hưởng điều hòa của hệ gen nhân tế

<sup>1</sup> Khoa Chăn nuôi - Thủy sản, Trường ĐH Nông nghiệp I

<sup>2</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup> Khoa Bệnh học Thú Y, Trường ĐH Thú Y và Nông nghiệp Đan Mạch.

bào. Hệ gen nhân tế bào có hệ số đột biến thấp hơn hệ gen ty thể. Bất kể sự thay đổi nào của các gen cũng có thể dẫn đến sự biến đổi hệ gen có tính chất đặc trưng của loài. Hệ gen nhân chịu hướng bảo tồn rất cao và có giá trị trong giám định. Trong nhân tế bào có một nhóm gen quan trọng là 5,8S; 18S; 28S và vùng nucleotide nối giữa các gen đó là ITS-1 và ITS-2 (Internal transcribed spacer) được dùng trong phân tích phân loại (Lê Thanh Hòa, 2002) (Hình 1).

*Haplorchis* là một loài sán lá ruột nhỏ để hoàn thành vòng đời chúng phải trải qua nhiều loài vật chủ phức tạp (vật chủ chính, vật chủ trung gian) nên thường ít được quan tâm (kể cả y tế, thú y, ngư y). Do kích thước rất nhỏ, hình dạng của trứng, ấu trùng (cecaria, metacercaria) và kể cả dạng trưởng thành rất giống với hình dạng của một số loài sán lá khác nên rất dễ chẩn đoán nhầm (Tesana và cs., 1991). Nghiên cứu ứng dụng sinh học phân tử đối với các bệnh ký sinh trùng truyền lây nhằm khắc phục những tồn tại của các phương pháp nghiên cứu cổ truyền là hướng mới được quan tâm trong nhiều năm qua ở nước ta. Mặc dù có nhiều nghiên cứu sinh học phân tử trong giám định phân loại phả hệ và dịch tễ học phân tử một số sán lá, sán dây ở Việt Nam, nhưng cho đến nay đối với *Haplorchis*, rất ít nghiên cứu đề cập đến. Với sự giúp đỡ của dự án FIBOZOPA (Fishborne Zoonotic Parasites: dự án ký sinh trùng truyền lây giữa động vật thủy sinh, động vật trên cạn kể cả người) đã tạo điều kiện cho chúng tôi

thực hiện xác định, thẩm định loài và phân biệt chúng với các loài sán lá khác.

Trong bài báo này, chúng tôi chủ yếu tập trung nghiên cứu gen ITS-2 nhằm mục đích giám định phân tử 2 loài sán lá ruột nhỏ nói trên, so sánh đặc điểm của gen này trong các loài sán lá truyền lây giữa cá - động vật trên cạn và xây dựng cây phả hệ tìm mối liên quan giữa sán lá ruột nhỏ *Haplorchis* với các loài sán lá truyền lây khác.

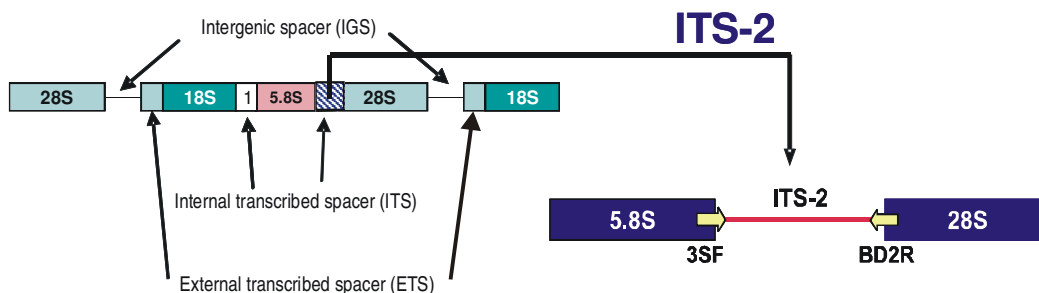
## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Mẫu và nguồn gốc mẫu

Mẫu sán lá ruột nhỏ trưởng thành và ấu trùng (*metacercariae*) của *Haplorchis* được các đối tác tham gia dự án FIBOZOPA cung cấp: Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng trung ương (NIMPE), Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1 (RIA1). Nguồn mẫu này được thu từ người nhiễm sán lá ruột nhỏ và cá nhiễm ấu trùng sán lá ruột nhỏ vùng Nam Định (bảng 1).

Mẫu sán (cả ấu trùng và sán trưởng thành của sán lá ruột nhỏ *Haplorchis taichui* và *H. pumilio*) đã được xác định hình thái chuẩn do Khoa Ký sinh trùng, Trường Đại học Mahidol, Băng Cốc, Thái Lan cung cấp.

Mẫu sán và ấu trùng sán được lưu giữ trong cồn 70° và bảo quản lạnh cho đến khi sử dụng.



**Hình 1.** Vùng gen ribosom của hệ gen nhân tế bào (18S-5,8S-28S) và điểm bám mồi (3SF-BD2R) nhân đoạn gen ITS-2

**Bảng 1. Danh sách mẫu, nguồn gốc của mẫu trong nghiên cứu và nguồn gen tham khảo**

Loài sán	Ký hiệu mẫu	Loại mẫu (ADN)	Nguồn mẫu	Ký chủ	Nguồn gen ITS-2
<i>H. pumilio</i>	Hpu (TL1)	Sán trưởng thành	Thái Lan	Người	Ando và cs., 2001
<i>H. pumilio</i>	HpM (TL)	Metacercaria	Thái Lan	Cá	Nghiên cứu này
<i>Haplorchis</i> sp.	HspMND (VN)	Metacercaria	Việt Nam	Cá	Nghiên cứu này
<i>H. pumilio</i>	Hpu (AY245706)				Dzikowski và cs., 2004; AY245706
<i>Haplorchis</i> sp.	HspND (VN)	Sán trưởng thành	Việt Nam	Người	Nghiên cứu này
<i>Haplorchis</i> sp.	HspNDV (VN)	Sán trưởng thành	Việt Nam	Người	Nghiên cứu này
<i>H. taichui</i>	Hta (TL1)	Sán trưởng thành	Thái Lan	Người	Ando và cs., 2001
<i>Haplorchis</i> sp.	HspMND2 (VN)	Metacercaria	Việt Nam	Cá	Nghiên cứu này
<i>H. taichui</i>	Hta (AY245705)				Dzikowski và cs., 2004; AY245705
<i>O. viverrini</i>	Ovi (AY584735)				Sanath và cs., 2004; AY584735
<i>O. viverrini</i>	Ovi (TL1)	Sán + ấu trùng	Thái Lan	Người	Ando và cs., 2001
<i>C. sinensis</i>	Csi (SKR)				Lee và cs., 1999; AF217095

## 2.2. Phân tích ITS-2

Quá trình phân tích sinh học phân tử được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Miễn dịch học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Hà Nội).

Mẫu sán lá ruột nhỏ trưởng thành và ấu trùng sán được tách chiết ADN tổng số bằng QIAamp DNA kit (QIAGEN Inc., USA).

Sau khi thu được ADN tổng số, tiến hành thực hiện phản ứng PCR với chu trình nhiệt: Nhiệt độ ủ bung liên kết là 94°C trong 1 phút, nhiệt độ bám mỗi là 50°C trong 1 phút, nhiệt độ cung cấp cho quá trình tổng hợp chuỗi ADN là 72°C trong vòng 2 phút. Toàn bộ quá trình thực hiện phản ứng PCR là 35 chu kỳ (Lê Thanh Hòa và cs., 2002).

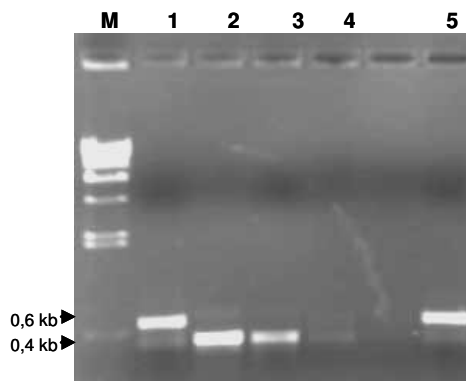
Mỗi để thực hiện phản ứng: mỗi xuôi 3SF (5'-GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG-3') và mỗi ngược BD2R (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3'). Đây là mỗi chung cho phân tích gen ITS-2 của các loài sán lá (Bowles và cs., 1995). Sơ đồ hệ gen nhân, điểm bám mỗi và mỗi dùng được mô phỏng ở hình 1.

Phản ứng PCR tiến hành với dung tích là 50 ml (25 ml PCR master mix, 2 ml primer (10 pmol/ml), 4 ml khuôn và 17 ml nước) và kiểm tra sản phẩm trên thạch agarose 1%.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ QIAquick Purification kit (QIAGEN Inc.) và được dòng hóa vào vector pCR2.1TOPO (TA-cloning kit, hãng Invitrogen). Sau khi tách dòng, ADN plasmid tái tổ hợp được giải trình trình tự trên máy ABI-3100 Avant Genetic Analyzer tại Viện Công nghệ sinh học. Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03, sau đó so sánh sử dụng chương trình AssemblyLIGN v1.9c và MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh. So sánh trình tự chuỗi ITS-2 của mẫu nghiên cứu với trình tự gen ITS-2 của *H. taichui* và *H. pumilio* từ Ngân hàng gen, từ tài liệu tham khảo (Ando và cs., 2001) và so sánh với gen ITS-2 của một số loài sán lá truyền lây khác (bảng 1). Các chương trình GENEDOC2.5 và MEGA3.1 được sử dụng để phân tích và so sánh về thành phần nucleotide (Nicholas và Nicholas, 1999; Kumar và cs., 2004).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sản phẩm PCR vùng ITS-2



**Hình 2.** Sản phẩm PCR vùng gen ITS-2 trên thạch agarose 1%. M: chỉ thị ADN (Lambda cắt bằng HindIII); 1: Hta(TL), mẫu *H. taichui* của Thái Lan; 2: HpM(TL), mẫu metacercaria *H. pumilio* của Thái Lan; 3: HspMND(VN), mẫu metacercaria *Haplorchis* sp. thứ nhất của Việt Nam; 4: HspND(VN), mẫu *Haplorchis* sp. của Việt Nam; 5: HspMND2(VN), mẫu metacercaria *Haplorchis* sp. thứ 2 của Việt Nam

Kết quả cho thấy có sự sai khác về chiều dài của vùng gen ITS-2 giữa các mẫu *Haplorchis* sp. thu được ở Việt Nam và giữa mẫu *H. taichui* và *H. pumilio* của Thái Lan (mẫu đã được xác định hình thái học). Độ dài của vùng gen ITS-2 giới hạn giữa cặp mồi (3SF và BDR) của *H. taichui* khoảng 0,6 kb và của *H. pumilio* khoảng 0,4 kb. Mẫu sán *Haplorchis* sp. của Việt Nam cũng có độ dài vùng gen ITS-2 tương tự như mẫu sán của Thái Lan (hình 2).

#### 3.2 Trình tự vùng gen ITS-2

So sánh trình tự nucleotide các mẫu nghiên cứu được trình bày ở hình 3. Kết quả giải trình tự cho thấy có sự sai khác về độ dài gen ITS-2 giữa *H. taichui* và *H. pumilio*. Đối với *H. taichui*, gen ITS-2 có độ dài là 445-446 bp còn đối với mẫu sán *H. pumilio* là 290 bp. Gen ITS-2 của *H. taichui* dài hơn *H. pumilio* do có một đoạn 154 nucleotide từ nucleotide thứ 198 đến nucleotide 352 được chèn vào (hình 3). Sự sai khác nhiều về trình tự sắp xếp các nucleotide giữa *H. taichui* và *H. pumilio* chủ yếu xảy ra ở các vị trí sau đoạn chèn, còn các vị trí trước đoạn chèn có sự tương đồng lớn.

Các mẫu sán ruột nhỏ và ấu trùng của chúng thu được từ người và cá ở Việt Nam bao gồm mẫu HspMND2(VN) có độ dài gen ITS-2 là 446 bp, tương đương ITS-2 của *H. taichui*; và mẫu HspMND(VN) có độ dài gen ITS-2 là 290 bp, tương đương gen ITS-2 của *H. pumilio*.

#### 3.3. So sánh sự tương đồng của nucleotide trong gen ITS-2

So sánh giữa các mẫu sán và ấu trùng thu được ở Việt Nam với *H. taichui* và *H. pumilio* của Thái Lan và so sánh với một số sán lá truyền lây khác như sán lá gan nhỏ (*C. sinensis* và *O. viverrini*) về mức độ tương đồng các nucleotide được thể hiện trong bảng 2.

Phân tích sự tương đồng nucleotide vùng gen ITS-2 của các mẫu nghiên cứu và một số mẫu trong ngân hàng gen cho thấy giữa mẫu *H. pumilio* ((HpuM(TL) nguồn gốc từ Thái Lan) phân tích ở nghiên cứu này và mẫu của Ando và cs (2001) (từ Thái Lan) có sự tương đồng nucleotide của gen ITS-2 là 96% và giữa mẫu HspMND(VN) với mẫu *H. pumilio* của Thái Lan trong nghiên cứu này HpuM(TL) và mẫu phân tích của Ando (2001) có sự tương đồng nucleotide tương ứng là 99 và 96%. Trong khi đó sự tương đồng nucleotide trong các mẫu *H. pumilio* của Thái Lan và cả mẫu HspMND(VN) so với Hpu (AY245706) từ ngân hàng gen chỉ đạt 94%. Mức độ tương đồng nucleotide giữa các mẫu (1-4) đạt tỷ lệ tương đối cao (94-99%) tỷ lệ này phản ánh tương đồng thường thấy ở trong một loài. Như vậy có thể kết luận mẫu HspMND (VN) của Việt Nam là *H. pumilio*.

Đối với mẫu *H. taichui* có nguồn gốc Thái Lan trong nghiên cứu này Hta (TL) với mẫu Hta (TL1) trong nghiên cứu của Ando năm 2001 cho thấy có sự tương đồng nucleotide là 99%. Trong khi đó mẫu HspMND2 (VN) có sự tương đồng rất cao từ 99-100% so với mẫu *H. taichui* của Thái Lan và có sự tương đồng rất thấp với các mẫu *H. pumilio* chỉ đạt từ 52-54%, và đây là mức độ tương đồng thường thấy ở 2 loài khác nhau. Vì vậy có thể kết luận mẫu HspMND2 (VN) của Việt Nam là *H. taichui*.

Đối với mẫu ký hiệu HspNDV (VN) khi phân tích sự tương đồng nucleotide vùng gen ITS-2 cho thấy tương đồng tuyệt đối 100% so với *O. viverrini* từ ngân hàng gen. Lê Thanh Hòa và cs (2003) cho rằng sán lá gan nhỏ *O.*

*viverrini* chủ yếu phân bố ở vùng Nam Trung bộ và phía Nam, nhưng mẫu HspNDV (VN) đem phân tích ở đây lại được tìm thấy ở vùng

Nam Định. Điều này cho thấy cần thiết có nghiên cứu bổ sung về nguồn gốc để có kết luận chắc chắn hơn.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100							
Hpu (TL1)	:	TTATAAACTATCA	CGACGCCCAAATAGTCGTGGCTGGGCTTGGCCAGCTGGCGTGATTC	-----	TTGTGC	-TAT	-TGCATGGGGTGCCAGATCA	:	90								
HpuM (TL)	:	.....G.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	90								
Hpu (AY2457)	:	.....G.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....A.....	:	90								
HspMND (VN)	:	.....G.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	90								
HspND (VN)	:	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....A.....	:	90								
HspNDV (VN)	:	.....A.....	.....	A.....	.....	.....	.....CC.C.....A.....TG.....G.....T.....	:	90								
Hta (TL1)	:	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....A.....	:	90								
Hta (TL)	:	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....A.....	:	90								
HspMND2 (VN)	:	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....A.....	:	90								
Hta (AY2457)	:	.....A.....	.....	T.....	.....	G.....	.....AG-GT.....CT.....A.....T.....T.....	:	90								
Ovi (TL) AY5	:	.....A.....	.....	A.....	.....	.....	.....CC.C.....A.....TG.....G.....T.....	:	90								
Ovi (TL1)	:	.....A.....	.....	A.....	.....	.....	.....CC.C.....A.....TG.....G.....T.....	:	90								
Csi (SKR)	:	.....A.....	.....	A.....	.....	.....	.....CC.ACACAA.....TG.....G.....TG.....G.....T.....	:	100								
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200							
Hpu (TL1)	:	ATGGCTTCTCCCTAATGTGCGAAACGCAACCATGTCGGGTGA	-----	ATGCCTGGATGAGGGGGTGGCGGGAGTCGTGGCTCAATTTATGTAT	-----	:	182										
HpuM (TL)	:	.....	.....	.....	.....	A.....	.....	T.A.G.AT	:	182							
Hpu (AY2457)	:	G.....	.....	.....	.....	A.....	.....	G.TT	:	184							
HspMND (VN)	:	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T.A.G.AT	:	182							
HspND (VN)	:	.....	.....	.....	.....	C.....C.....	.....	AA.G.....	GGT.A.....AT	:	184						
HspNDV (VN)	:	.....T.....C.....G.....	.....	C.....	.....	C.....	.....	A.....	GT.....TA	:	182						
Hta (TL1)	:	.....T.....G.....	.....	T.C.....	.....	CG.....	.....	AA.....	GA.AA.....GTCC	:	185						
Hta (TL)	:	.....T.....G.....	.....	T.C.....	.....	CG.....	.....	AA.....	GA.AA.....GTCC	:	185						
HspMND2 (VN)	:	.....T.....G.....	.....	T.C.....	.....	CG.....	.....	AA.....	GA.AA.....GTCC	:	185						
Hta (AY2457)	:	G.....TC.....	.....	G.....	.....	TA.....	.....	C.....TGGA.G.....	ATCTA.....T.....	AAT.A.....	183						
Ovi (TL) AY5	:	.....T.....C.....G.....	.....	C.....	.....	C.....	.....	A.....	GT.....TA	:	182						
Ovi (TL1)	:	.....T.....C.....G.....	.....	C.....	.....	C.....	.....	A.....	GT.....TA	:	182						
Csi (SKR)	:	.....T.....C.....G.....	.....	C.....	.....	C.....	.....	A.....	GT.....TA	:	190						
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300							
Hpu (TL1)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
HpuM (TL)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
Hpu (AY2457)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
HspMND (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
HspND (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
HspNDV (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
Hta (TL1)	:	CGCGCTCCAAGCTTAACTCTGCTGGGCTGACGGCTTGGATGAGGAAGTGGGGCGGAGTCGTGGCTCAATGAAAATGTGGCGCTCCAAGCTTA	:	285													
Hta (TL)	:	CGCGCTCCAAGCTTAACTCTGCTGGGCTGACGGCTTGGATGAGGAAGTGGGGCGGAGTCGTGGCTCAATGAAAATGTGGCGCTCCAAGCTTA	:	284													
HspMND2 (VN)	:	CGCGCTCCAAGCTTAACTCTGCTGGGCTGACGGCTTGGATGAGGAAGTGGGGCGGAGTCGTGGCTCAATGAAAATGTGGCGCTCCAAGCTTA	:	285													
Hta (AY2457)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
Ovi (TL) AY5	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
Ovi (TL1)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
Csi (SKR)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:						
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400							
Hpu (TL1)	:	-----	-----	-----	-----	TTTTTATCATGT	-----	GGCGCTCCGCTG	-----	AAAACCTTCGTCTGTGCC	:	227					
HpuM (TL)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	227					
Hpu (AY2457)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	228					
HspMND (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	227					
HspND (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	229					
HspNDV (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	230					
Hta (TL1)	:	ACCTCTGCTGGGCTGACGGTTTGGATGAGGAAGCGGGCGGAGTCGTGGC	CAA	GAAA.....	CCA.....	AAA	TTT.....	CT.....	A.....	-----	:	384					
Hta (TL)	:	ACCTCTGCTGGGCTGACGGTTTGGATGAGGAAGCGGGCGGAGTCGTGGC	CAA	GAAA.....	CCA.....	AAA	TTT.....	CT.....	A.....	-----	:	383					
HspMND2 (VN)	:	ACCTCTGCTGGGCTGACGGTTTGGATGAGGAAGCGGGCGGAGTCGTGGC	CAA	GAAA.....	CCA.....	AAA	TTT.....	CT.....	A.....	-----	:	384					
Hta (AY2457)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	226					
Ovi (TL) AY5	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	230					
Ovi (TL1)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	230					
Csi (SKR)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	237					
	*	420	*	440	*	460	*										
Hpu (TL1)	:	TGTGA-TGCTA-GGATGTGGCAATGCATTCGATGCAAAATAA-TTGTGCACAT-ATG-TGCCATATT-TA	:	290													
HpuM (TL)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	290					
Hpu (AY2457)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	291					
HspMND (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	290					
HspND (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	288					
HspNDV (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	296					
Hta (TL1)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	446					
Hta (TL)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	445					
HspMND2 (VN)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	446					
Hta (AY2457)	:	G.....TCAG.....TTAT.A.....	.....	C.....A.....	.....	C.G.T.....	.....	A.....	.....	G.T.....	.....	C.....	.....	T.....	G.C.....	:	289
Ovi (TL) AY5	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	296					
Ovi (TL1)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	296					
Csi (SKR)	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	302					

Hình 3. So sánh trình tự nucleotide gen ITS-2 của các mẫu sán lá ruột nhỏ *Haplorchis* Việt Nam, Thái Lan và sán lá gan bé (*Clonorchis sinensis*; *Opisthorchis viverrini*)

Ghi chú: Sai khác trình tự của các chủng so với Hpu(TL1) biểu thị bằng chính ký hiệu nucleotide của chúng; dấu (.) biểu thị sự giống nhau; dấu (-) không có nucleotide tương ứng.

**Bảng 2. Sự tương đồng nucleotide trong gen ITS-2 giữa một số loài sán lá truyền lây qua cá**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		96	94	96	88	79	54	54	54	54	79	79	76
2			94	99	88	78	53	53	53	68	78	78	75
3				94	84	76	52	52	52	66	76	76	74
4					88	78	53	53	53	68	78	78	76
5						77	76	57	56	66	77	77	74
6							50	50	50	69	100	100	87
7								99	100	45	50	50	50
8									99	45	50	50	50
9										45	50	50	50
10											69	69	68
11												100	87
12													87
13													

Ghi chú: 1: Hpu(TL1); 2: HpuM(TL); 3: Hpu(AY245706); 4: HspMND(VN); 5: HspND(VN); 6: HspNDV(VN); 7: Hta(TL1); 8: Hta(TL); 9: HspMND2(VN); 10: Hta(AY245705); 11: Ovi(AY584735); 12: Ovi(TL1); 13: Csi(SKR)

Trình tự gen ITS-2 của Hta (AY245705) thu thập từ ngân hàng gen đem so sánh với mẫu nghiên cứu của chúng tôi và các mẫu tham khảo khác cho thấy có tỷ lệ tương đồng rất thấp (45%) với nhóm *H. taichui* và 54-68% với nhóm *H. pumilio*. Vậy chắc chắn trình tự này trong ngân hàng gen là không đúng với *H. taichui*.

#### 4. KẾT LUẬN

Hai loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* và *H. pumilio* đã được giám định bằng phương pháp sinh học phân tử dựa trên phân tích gen ITS-2, từ các mẫu sán lá ruột nhỏ vùng Nam Định của Việt Nam. Mẫu ấu trùng sán ký hiệu là HspMND(VN) được xác định loài là *H. pumilio* và mẫu HspMND2(VN) là *H. taichui*. Về độ dài gen ITS-2 của *H. taichui* là 446 bp và của *H. pumilio* là 290 bp.

Giữa 2 loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* và *H. pumilio* có sự sai khác về độ dài và trật tự gen ITS-2 được thể hiện ở sự chèn đoạn gen 154 nucleotide, làm cho đoạn gen ITS-2 của *H. taichui* dài hơn đoạn gen ITS-2 của *H. pumilio*.

Có rất ít sự sai khác về trình tự nucleotide trong gen ITS-2 của *H. pumilio* giữa mẫu sán của Việt Nam và mẫu sán của Thái Lan trong nghiên cứu này (tương đồng đạt 99%) và có sự sai khác không đáng kể giữa mẫu sán của Thái Lan trong nghiên cứu này với mẫu sán Thái Lan trong nghiên cứu của các tác giả khác.

Có sự giống nhau hoàn toàn về trình tự sắp xếp nucleotide trong gen ITS-2 của *H. taichui* giữa mẫu sán Việt Nam và mẫu sán Thái Lan trong nghiên cứu này và giống nhau gần như tuyệt đối với mẫu sán Thái Lan của Ando và cs (2001).

## Lời cảm ơn

Các tác giả xin gửi lời cảm ơn Tổ chức DANIDA và dự án FIBOZOPA đã cung cấp kinh phí và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho nghiên cứu này. Xin cảm ơn PGS. TS. Nguyễn Văn Đê (Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và côn trùng Trung ương), TS. Jitra Waikagul (Trường ĐH Y Mahidol, Băng Cốc, Thái lan và KS. Nguyễn Thị Hằng (Viện Nghiên cứu NTTS 1) đã cung cấp mẫu cho nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ando, K.; Sathithaworn, P.; Nuchjungreed, C.; Tesana, S.; Srisawangwong, T.; Limviroj, W. and Chinzei, Y. (2001). Nucleotide sequence of mitochondrial CO I and ribosomal ITS-2 genes of *Opisthochis viverrini* in Northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32: 17-22.
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1995). A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Mol Phylogenet Evol* 4: 103-109.
- Cheng, T. C. (1974). General parasitology. New York: Academic Press, 1974.
- Dzikowski, R.; Levy, M. G.; Poore, M. F.; Flowers, J. R. and Paperna, I. (2004). Use of rDNA polymorphism for identification of Heterophyidae infecting freshwater fishes. *Dis Aquat Org* 2004; 59: 35-41.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei M. (2004). MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Le T.H., N. V. Chuong, N. V. De, P. Sithithaworn, N. B. Nga, T. N. Trung, L. K. Thuan (2003). Report on molecular analysis of *Opisthorchis viverrini* collected from Phu Yen province. Proceedings of National Conference on Molecular Biology and Biochemistry, Hanoi (22-24.10.2003).
- Le, T.H., Blair, D. and McManus, D.P. (2002). Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol*, 18: 206-213.
- Nicholas, K.B. and H.B. Nicholas (1999). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by authors.
- Pear, J. C. (1964). A revision of the subfamily Haplorchinae Looss, 1899 (Trematoda: Heterophyidae). *Parasitology* 1964; 54: 601-76.
- Pearson, J. C. and C. K. Ow-Yang (1982). New species of *Haplorchis* from Southeast Asia, together with keys to the *Haplorchis* - group of Heterophyid trematodes of the region. *Southeast Asia J. Trop. Med. Pub. Health*, 13: 53-60.
- Tesana S., Srisawangwong T., Kaeckes S., Sithithaworn P., Kanla P., Arunyanart C. (1991). Eggshell morphology of the small eggs of human trematodes in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1991; 22: 631-6.
- Yamaguti S. (1958). Systema Helminthum. Vol I. The digenetic trematodes of vertebrates Part 1 & II. New York: Interscience Publishers, 1958: 1575 pp.

