

GIÁM ĐỊNH SẢN LÃ PHÔI *PARAGONIMUS HETEROTEMUS* Ở VIỆT NAM VÀ XÂY DỰNG PHÃ HỆ CÁC LOẠI SẢN LÃ GÂY BỆNH TRÊN NGƯỜI SỬ DỤNG CHI THỊ GEN *NAD1*

Vũ Thị Tiến, Đỗ Thị Roan, Lê Thanh Hòa

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Bệnh sản là phổi - paragonimiasis do sản là thuộc giống *Paragonimus* gây nên. Ở Việt Nam, bệnh phát triển mạnh ở 10 tỉnh biên giới phía Bắc, nguyên nhân duy nhất là do *P. heterotremus*. Cho đến nay, việc giám định sản là phổi chủ yếu dựa vào hình thái học và đặc tính gây bệnh. Bên cạnh đó, gen *cox1* và *ITS2* cũng được ứng dụng để phát hiện và phân biệt ấu trùng cũng như sản trưởng thành. Mặc dù gen *nad1* là chi thị nhân diên và phát sinh loài, do nghiên cứu trình tự gen *nad1* giúp cung cấp dữ liệu phân tử quan trọng đối với việc phát hiện và chẩn đoán chính xác sản là phổi. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu PHE13F – PHE14R để thực hiện phản ứng PCR nhân đoạn DNA có kích thước 1,7 kb chứa toàn bộ gen *nad1* có kích thước 906 bp của sản là phổi *P. heterotremus*. Sản phẩm PCR được nhân dòng vào vector PCR2.1 TOPO và được giải trình tự và trình tự gen *nad1* của *P. heterotremus* được được so sánh và phân tích phả hệ cùng với các loài sản là khác từ dữ liệu từ ngân hàng gen. Kết quả thu được, về sự tương đồng của gen *nad1* giữa *P. heterotremus* và *P. ohirai* là 81% về nucleotide và 86% về amino acid, giữa *P. heterotremus* và *P. westermani* là 75% về nucleotide và 82% về amino acid. Trong phân tích phả hệ *P. heterotremus* cùng với *P. ohirai* và *P. westermani* hợp thành nhóm paragonimid, các loài sản khác thuộc nhóm opisthorchid hoặc fasciolid.

Từ khóa: Giám định, gen *nad1*, phả hệ, Sản là phổi, *Paragonimus heterotremus*

DAT VẤN ĐỀ

Bệnh sản là phổi - paragonimiasis do sản là phổi thuộc giống *Paragonimus* gây nên, bệnh xuất hiện ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt bệnh gia tăng nhanh chóng ở các nước châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan, Ấn Độ, Philippin, Việt Nam, Lào và Thái Lan (Miyazaki, Vajrasthira, 1966; Kino *et al.*, 1995; De *et al.*, 2003; Doanh *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2006; Odermatt *et al.*, 2009). Ở Việt Nam, ca bệnh đầu tiên về sản là phổi được phát hiện năm 1993 tại Sơn Hòa - Lai Châu, cho đến nay bệnh phát triển mạnh ở 10 tỉnh biên giới phía bắc bao gồm Lai Châu, Sơn La, Hòa Bình, Lào Cai, Yên Bái, Phú Thọ, Lạng Sơn, Nghệ An và Tuyên Quang. Thông thường, bệnh xảy ra ở các vùng núi vùng sâu vùng xa, lây nhiễm chủ yếu trong cộng đồng dân tộc thiểu số, đặc biệt, ở trẻ em đang học cấp 1, 2, do có thói quen ăn lá ấu của, uống nước ấu trùng sản là phổi nướng chưa chín (Le *et al.*, 2006).

Hiện nay, có khoảng 50 loài sản là phổi *Paragonimus* đã được công nhận trong đó có trên 10 loài gây bệnh trên người và các loài quan trọng nhất là *P. westermani*, *P. heterotremus* và *P. ohirai* (Blair *et al.*, 2005). Theo các nghiên cứu của nhóm

tác giả Phạm Ngọc Doanh và đồng tác giả, ở nước ta đã xuất hiện ấu trùng của một số loài *Paragonimus*, tuy nhiên nguyên nhân gây bệnh thì chỉ duy nhất *P. heterotremus*. Sản là phổi *Paragonimus* sử dụng 2 dạng vật chủ trung gian là ốc (đối với ấu trùng đuôi) rồi đến các loài giáp xác như tôm và cua đá (đối với ấu trùng nang) trước khi xâm nhập vào vật chủ chính là động vật có vú để phát triển thành sản trưởng thành. Người hoặc động vật ăn phải động vật trung gian mang ấu trùng nang chưa được nấu chín, bao nang đi vào đường tiêu hóa sẽ nở (exyst) ở tá tràng và xuyên qua thành ruột vào ổ bụng, từ ổ bụng 2 cá thể kết đôi với nhau xuyên thủng lên phổi kết thành nang và phát triển thành sản trưởng thành (De *et al.*, 2003).

Phương pháp giám định sinh vật dựa trên các marker phân tử đã được nghiên cứu và ứng dụng trên nhiều đối tượng khác nhau và có độ tin cậy rất cao và không phụ thuộc vào giai đoạn phát triển cả thể Do vậy, giám định phân tử hết sức có ý nghĩa đối với sinh vật có vòng đời phức tạp như các loài sản là. Các marker phân tử như gen *cox1* và *nad1* thuộc hệ gen ty thể và *ITS2* thuộc hệ gen nhân đã được ứng dụng trong giám định các loài sản là gan lớn, sản là gan bé và sản là ruột. Đối với sản là phổi, các dữ liệu

phần tử còn rất hạn chế, cho đến nay chỉ duy nhất hệ gen ty thể của *P. westermani* được giải mã và một số gen *cox1* và *ITS-2* có trong Ngân hàng gen (Blair et al., 2005; Doanh et al., 2009). Tại Việt Nam, nghiên cứu giải mã sản lá phổi *P. heterotremus* và phát hiện ấu trùng của một số loài sản lá phổi khác của các tác giả dựa trên một phần gen *cox1* và *ITS2* Mặc dù gen *nad1* có nhiều tiềm năng trong việc nhận diện và phát sinh loài, nhưng chưa có nghiên cứu nào về gen này. Do đó, nghiên cứu phân tích gen *nad1* của *P. heterotremus* nhằm cung cấp thêm dữ liệu phân tử và làm sáng tỏ thêm quan hệ giữa *P. heterotremus* với các loài lân cận và hướng tới chẩn đoán chính xác bệnh sản lá phổi trong tương lai.

NGUYÊN/VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu vật sản lá phổi

Mẫu vật sản lá phổi trưởng thành được thu thập từ bệnh nhân tỉnh Lai Châu đã được thăm định về hình thái học, ký hiệu mẫu là *P.het*. Mẫu vật được rửa sạch bằng nước muối sinh lý sau đó được bảo quản trong cồn 70° ở -20°C cho đến khi sử dụng

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit tách chiết DNA tổng số của Bioneer - Hàn Quốc theo quy trình của nhà sản xuất. Mô tả tóm tắt như sau: Mẫu vật bảo quản trong cồn 70° được lấy ra cắt một mẫu nhỏ khoảng 50mg trên lam kính, để mẫu cho cồn bay hơi hết, sau đó rửa nhiều lần bằng đệm PBS. Mẫu được nghiền kỹ và xử lý bằng các dung môi của bộ kit. DNA tổng số được hấp phụ lên màng và sau đó được ly chiết theo quy trình tách chiết

Quy trình phản ứng PCR và đóng gói sản phẩm

Cặp mồi PHE13F 5'GTTGGTGAGGGGGTATC3' và PHE14R. 5'CCTAATACTCCCACTCAGC3' được thiết kế nhân đoạn ADN có kích thước 1,7 kb trong đó bao gồm gen *nad1* có kích thước 906 bp. Phản ứng PCR được thực hiện bằng bộ kit AccuPower[®] ProFi Taq PCR premix của Bioneer - Hàn Quốc. Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy MJ Thermal Cycler PCT-100 (MJ Research, USA) gồm các bước như sau: 94°C/5 phút trong 1 chu kỳ; tiếp theo sau là 35 chu kỳ ở 94°C/1 phút, 55°C/1, 72°C/3 phút, chu kỳ cuối kéo dài 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PCR Purification Kit của Bioneer - Hàn Quốc và sau đó được đóng gói vào vector PCR2.1 TOPO

(Invitrogen Inc). Vector tiếp nhận sản phẩm PCR được chuyển nạp vào dòng tế bào khả biến *E.coli* GT116 và chọn lọc theo phương pháp kháng sinh và chỉ thị màu Xgal (Sambrook và Russell, 2001). Vector tái tổ hợp được tách chiết bằng bộ kit tách chiết DNA plasmid của hãng Bioneer - Hàn Quốc.

Giải trình trình tự và xử lý số liệu

Trình tự nucleotid của DNA trong plasmid chứa sản phẩm PCR tái tổ hợp được giải trình trên máy tự động ABI 3100 Avant Genetic Analyzer của hãng Perki - Elmer (Mỹ). Giám đồ giải trình tự (chromatogram) được biên tập bằng chương trình SeqEdv1 và sắp xếp chuỗi nucleotide bằng AssemblyLIGN v 1.9c. Sau đó được phân tích bằng phần mềm MacVector 8.2 package (Accelrys Inc). Các trình tự tương ứng với đoạn DNA nghiên cứu được thu nhận từ ngân hàng gen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank> sau khi truy cập bằng BLAST hoặc từ dữ liệu riêng của chúng tôi nghiên cứu. Phân tích phả hệ được thực hiện bằng hai phần mềm GENEDEC2.7 và MEGA5.2.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân dòng gen *nad1* của *P. heterotremus*

DNA tổng số sản lá phổi *P. heterotremus* tách chiết từ mẫu vật sản lá phổi trưởng thành được thu thập từ bệnh nhân tỉnh Lai Châu được ký hiệu là *P.het* và được hiệu chỉnh về nồng độ 50 ng/μl.

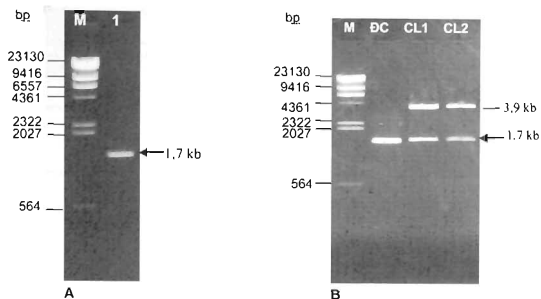
Phản ứng PCR được thực hiện bởi cặp mồi PHE13F - PHE14R và bộ kit PCR AccuPower[®] ProFi Taq PCR premix được ký hiệu là *P.hetpcr1*. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, hiệu điện thế 100V trong 30 phút (Hình 1A). Sản phẩm PCR có kích thước 1,7 kb được tinh sạch trước khi đóng gói.

Sản phẩm PCR tinh sạch được nối với vector PCR2.1 TOPO và ký hiệu là PCR2 1-P *hetpcr1*, sản phẩm tái tổ hợp được nhân dòng trong tế bào *E. coli* GT116. Các khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy ở 37°C, lắc 200 vòng/phút qua đêm trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin để tách chiết plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp được cắt bằng enzyme giới hạn *EcoRI* và điện di trên gel agarose 1%, hiệu điện thế 100V trong 30 phút, ảnh điện di thể hiện trên (Hình 1B).

Sản phẩm plasmid tái tổ hợp cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *EcoRI* có kích thước 3,9 kb và 1,7

kb bằng với kích thước của vector PCR2.1 TOPO và kích thước của sản phẩm P.hetpcr1, chúng tôi

P.hetpcr1 đã được nhân dòng trong vector PCR2.1 TOPO.



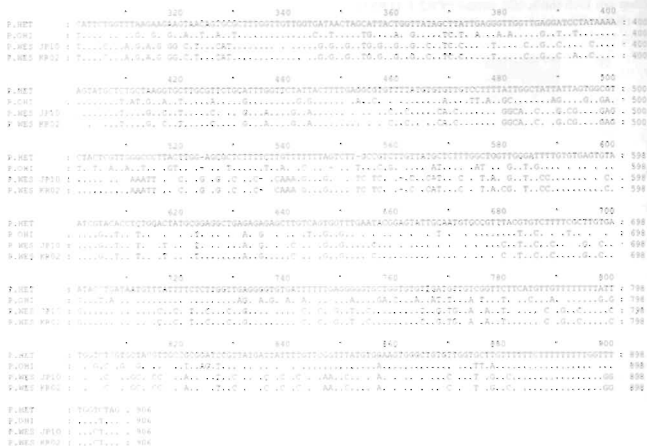
Hình 1. Sản phẩm PCR bằng cặp mồi đặc hiệu mang gen *nad1* của *P. heterotremus* (A) và kết quả điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp cắt bằng *EcoRI* của PCR2.1-P.hetpcr1 (B). Ghi chú: M Marker ADN (Lamda cắt bằng *HindIII*), 1 P.hetpcr1 (A), DC P.hetpcr1, CL1: PCR2.1-P.hetpcr1 clone 1, CL2: PCR2.1-P.hetpcr1 clone 2 (B)

Giải trình tự và so sánh với trình tự gen *nad1* của san là phổ khác

Các plasmid tái tổ hợp được giải trình tự và xử lý số liệu, gen *nad1* của *P. heterotremus* có kích thước 906 bp. Trình tự gen *nad1* của *P. heterotremus* được so sánh với gen *nad1* của *P. ohirai* Nhật Bản (từ dữ liệu nghiên cứu của chúng tôi) và gen *nad1* của *P. westermanni* từ ngân hàng gen trên phần mềm GENE:DOC2.7 (Hình 2).

Kết quả so sánh tương đồng về nucleotid cho thấy giữa *P. heterotremus* của Việt Nam với *P. ohirai* Nhật bản đạt 81%, với *P. westermanni* của Hàn Quốc và Nhật Bản đạt 75%. Sự tương đồng về amino axit giữa *P. heterotremus* của Việt Nam với *P. ohirai* Nhật bản đạt 86%, với *P. westermanni* của Hàn Quốc và Nhật Bản đạt 82%, trong khi đó sự tương đồng về cả nucleotide và amino acid giữa hai chủng cùng loài *P. westermanni* của Nhật Bản và Hàn Quốc đạt đến 99%.

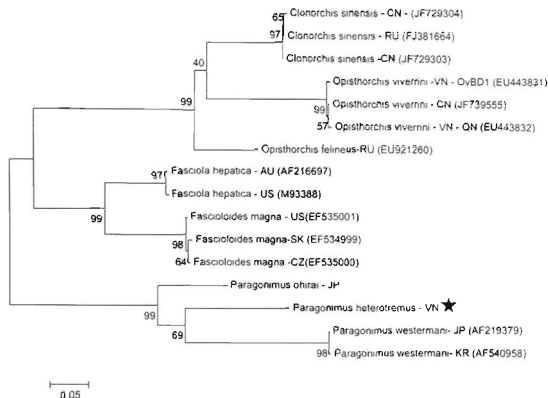




B.



Hình 2. So sánh trình tự nucleotide (A) và amino acid (B) của gen *nad1* giữa *P. heterotremus* với *P. chirai* và *P. westermani*. Ghi chú: P.het: *P. heterotremus* của Việt Nam, P.ohi: *P. chirai* của Nhật Bản, P.wes KR02: *P. westermani* của Hàn Quốc; P.wes JP10: *P. westermani* của Nhật Bản.



Hình 3. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ nguồn gốc phổ hệ của *P. heterotremus* Việt Nam (*P. het*) với các loài sán lá khác trên cơ sở phân tích thành phần chuỗi nucleotide gen *nad1* sử dụng chương trình MEGA5.2, phương pháp kết nối liền kề (NJ, neighbour-joining), hệ số tin tưởng 1000 lần (1000 bootstraps)

Mối quan hệ phả hệ giữa *P. heterotremus* với các loài sán lá khác

Trình tự nucleotide gen *nad1* của *P. heterotremus* và *P. ohrirai* cùng với trình tự gen *nad1* của các loài sán gây bệnh trên người từ Ngân hàng gen được đưa vào chương trình MEGA5.2 phân tích phả hệ, thể hiện trên hình 3

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy *P. heterotremus* (mẫu Việt Nam) cùng nhóm với *P. ohrirai* và *P. westermani* (nhóm paragoninid); trong khi đó các loài sán lá khác hợp thành nhóm opisthorchid, fasciolid riêng biệt. Điều đó chứng tỏ rằng *nad1* là chỉ thị phân tử đáng tin cậy trong giám định phân tử đối với sán lá phổi cũng như các loài sán lá gây bệnh trên người

KẾT LUẬN

Sán lá phổi *P. heterotremus* được thâm định và phân biệt với các loài sán lá khác dựa trên phân tích trình tự gen *nad1*. Trình tự gen *nad1* thu được đóng

góp thêm dữ liệu phân tử phục vụ cho việc phát hiện và chẩn đoán bệnh nhiễm sán lá phổi sau này. Bên cạnh các gen *cox1* và *ITS2*, gen *nad1* được khuyến nghị là một chỉ thị phân tử nên được sử dụng trong chẩn đoán và giám định bệnh sán lá phổi *Paragonimus*.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí để tài cấp bộ từ của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cho Vũ Thị Tiên, và Tổ chức ICGEB (Italy) cho Lê Thanh Hòa. Chúng tôi cảm ơn sự hỗ trợ trang thiết bị thí nghiệm tại Phòng Miễn dịch học và Phòng thí nghiệm trong đằm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Blair D, Chang Z, Chen M, Cui A, Wu B, Agatsuma I, Iwagami M, Corlis D, Fu C, Zhan X (2005) *Paragonimus skrjabini* Chen, 1959 (Digenea: Paragonimidae) and

related species in eastern Asia: a combined molecular and morphological approach to identification and taxonomy. *Syst Parasitol* 60: 1-21.

De NV, Murrell KD, Cong LD, Cam PD, Chau LV, Toan ND, Dalsgaard A (2003) The Food-borne Trematode zoonoses of Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34 Suppl 1: 12-34

Doanh PN, Le NT, The DT (2005) *Paragonimus* and paragonimiasis in Vietnam. *Asian Parasitol* 1: 149-153.

Doanh PN, Shimohara A, Horii Y, Yahiro S, Habe S, Vannavong N, Sirobel M, Nakamura S, Nawa Y (2009) Morphological differences and molecular similarities between *Paragonimus bangkokensis* and *P. harmasutai*. *Parasitol Res* 105: 429-439

Le TH, De NV, Blair D, McManus DP, Kino H and

Agatsuma T (2006) *Paragonimus heterotremus* Chen and Hsia, 1964, in Vietnam: a molecular identification and relationships of isolates from different hosts and geographical origins. *Acta Trop* 98: 25-33

Kino H, De NV, Vien HV, Chuyen LT and Sano M (1995) *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964 found from a dog in Vietnam. *Jap J Parasitol* 44: 470-472.

Miyazaki J, Vajrasthira S (1966) Occurrence of the lung fluke *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964, in Thailand. *J Parasitol* 53: 207.

Odermatt P, Keiser J, Felger I (2009) PCR Diagnosis of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* Infections in a Laos Community in an area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys. *J Clin Microbiol* 47: 1517-1523.

IDENTIFICATION OF LUNG FLUKE PARAGONIMUS HETEROTREMUS IN VIETNAM AND CONSTRUCTION PHYLOGENIC WITH OTHER FLUKES USING NAD1 GENE MARKER

Vũ Thị Tiên, Đỗ Thị Hoàn, Lê Thanh Hòa*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Lung fluke disease or *Paragonimiasis* is caused by *Paragonimus* genus. In Vietnam, this disease occurs in 10 provinces in the northern border and *P. heterotremus* is the only pathogen. Today, identification of *Paragonimus* lung fluke is almost based on morphology and pathogenic properties in experimental animals, beside that, morphological and molecular phylogenetic study based on sequences of *ITS2* and a part of *cox1* genes are also performed for detection and identification. *Nad1* is a potential marker in identification and phylogenetic analysis. Using specific primer pair PHE13F - PHE14R, a 1,7 kb DNA fragment containing the entire *nad1* gene of *P. heterotremus* was amplified by PCR reaction. PCR product was cloned into PCR2.1 TOPO vector and sequenced. *Nad1* sequence of *P. heterotremus* is 906 bp, which was used for comparative and phylogenetic analysis with those *nad1* of other flukes. As results, the homology of *nad1* between *P. heterotremus* and *P. ohirai* is 81% in nucleotide and 86% in amino acid, between *P. heterotremus* and *P. westermani* is 75% in nucleotide and 82% in amino acid. In phylogenetic analysis, *P. heterotremus*, *P. ohirai* and *P. westermani* are placed in the paragonimid group, others in the opisthorchiid or fasciolid groups.

Keywords: Identification, *nad1*, phylogeny, lung fluke, *Paragonimus heterotremus*