

## **XÁC ĐỊNH BỆNH GIUN ĐƯA Ở MÈO (Toxocariasis) TẠI VIỆT NAM DO LOÀI MỚI *Toxocara malaysiensis* GÂY RA BẰNG PHƯƠNG PHÁP SO SÁNH CHUỖI GEN VÀ PHÂN TÍCH PHẢ HỆ**

Lê Thanh Hòa<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Khuê<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Nga<sup>1</sup>,  
Đỗ Thị Thu Thúy<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Lan Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

<sup>2</sup>*Viện Thú y, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*

Email\*: imibtvn@gmail.com

Ngày gửi bài: 11.10.2015

Ngày chấp nhận: 28.01.2016

### **TÓM TẮT**

Toxocariasis là bệnh giun đũa chó mèo do các loài thuộc giống *Toxocara*, họ Toxocaridae, lớp Nematoda, bao gồm *Toxocara canis* (*T. canis*), *Toxocara cati* (*T. cati*) và *Toxocara malaysiensis* (*T. malaysiensis*), có khả năng truyền lây sang người. Ở Malaysia và Trung Quốc còn phát hiện mèo nhiễm thêm một loài giun đũa khác, đó là loài mới *T. malaysiensis* trong khi các nước khác chưa có thông tin về loài này. Mục đích của nghiên cứu này là phân tích đặc điểm chuỗi gen *atp6* (hệ gen ty thể) và ITS2 (hệ gen nhân tế bào) để xác định phân loại của 15 chủng *Toxocara* sp thu thập từ mèo ở các huyện Thường Tín và Thanh Oai (Hà Nội, Việt Nam). Kết quả sắp xếp đối chiếu trình tự nucleotide của gen *atp6* cho thấy 15 chủng *Toxocara* sp trên mèo của Việt Nam có mức độ đồng nhất đạt 99,3-100% với loài *Toxocara malaysiensis*. Trong khi đó với *T. cati*, tỷ lệ này chỉ là 89,6-90,1%; với *T. canis* là 86,7-87,9% và với *T. vitulorum* là 80,5-88,4%. Khoảng cách di truyền giữa các chủng *Toxocara* trên mèo của Việt Nam gần như không sai khác với loài *T. malaysiensis*, nhưng lại rất xa với loài *T. cati*. Phân tích phả hệ dựa trên chỉ thị gen *atp6* và ITS2 khẳng định, 15 chủng *Toxocara* sp. trên mèo của Hà Nội, Việt Nam cùng nhóm với *T. malaysiensis* trong khi đó các chủng của loài *T. cati*, *T. canis*, *T. vitulorum* và loài *Toxascaris leonina* (nhóm ngoại hợp) tách biệt hoàn toàn nằm trong các nhóm tương ứng của chúng. Nghiên cứu này cung cấp thêm một số đặc điểm về gen học và phân loại của *T. malaysiensis* và cũng là công bố đầu tiên về loài mới này, có nguồn gốc tại Việt Nam, tạo cơ sở cho giám sát dịch tễ học trong cộng đồng.

Từ khóa: *atp6*, ITS2, PCR, phả hệ, phân loại, ty thể, *Toxocara malaysiensis*.

### **Toxocariasis in Cats in Viet Nam Caused by *Toxocara malaysiensis*, A Novel Species, Identified by Sequence and Phylogenetic Analyses**

### **ABSTRACT**

Toxocariasis in cats and dogs is a disease caused by a species of the genus *Toxocara*, family Toxocaridae, class Nematoda, including *Toxocara canis* (*T. canis*), *Toxocara cati* (*T. cati*) and *Toxocara malaysiensis* (*T. malaysiensis*), which is potentially transmissible to humans. Cats might get infested with a different ascaridoid species, a novel species, namely *T. malaysiensis*, which was first time found in Malaysia and China, but there is no information about this novel species in other countries. In this study, we analyzed mitochondrial *atp6* and nuclear ITS2 sequences to clarify taxonomic identification for 15 strains of *Toxocara* sp. collected from cats from Thuong Tin and Thanh Oai districts (Ha Noi, Viet Nam). Comparative analysis of *atp6* nucleotide sequences showed that all 15 Vietnamese strains of *Toxocara* sp. from cats were identical with *Toxocara malaysiensis* species from 99.3 to 100%, but with *T. Cat* 89.6-90.1% , with *T. canis* 86.7-87.9%, and with *T. vitulorum* 80.5-88.4%. Genetic distances between *Toxocara* strains of Viet Nam and *T. malaysiensis* showed no difference, but it was highly distant from *T. cati*. Phylogenetic analysis based on genetic markers of *atp6* and ITS2 confirmed that all 15 strains of *Toxocara* sp. from Ha Noi, Viet Nam on cats were placed within the *T. malaysiensis* group, while the strains of *T. cati*, *T. canis*, *T. vitulorum* and *Toxascaris leonina* (an outgroup) were

separated completely, clustered within their respective groups. This study has provided some additional features on genetics and classification of *T. malaysiensis* and also was reported the first time regarding this novel species originated in Viet Nam for epidemiological surveillance in the community.

Keywords: atp6, classification, ITS2, mitochondrial, PCR, *Toxocara malaysiensis*, phylogeny.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh giun đũa chó mèo (toxocariasis) chủ yếu do các loài thuộc giống *Toxocara*, họ Toxocaridae, lớp Nematoda, bao gồm *Toxocara canis* (*T. canis*), *Toxocara cati* (*T. cati*) và *Toxocara malaysiensis* (*T. malaysiensis*) gây ra (McGuinness and Leder, 2014). Đây cũng là bệnh động vật lây sang người, ngày càng phổ biến và trở thành mối quan tâm trên toàn thế giới (Moreira et al., 2014; Fisher, 2003). Một loài mới được mô tả gần đây, *T. malaysiensis* (Gibbons et al., 2001), được phát hiện tại Malaysia và Trung Quốc, càng làm phức tạp sự đa nhiễm loài gây bệnh ở thú nuôi yêu thích là mèo trong gia đình, cùng với *T. cati* (Zhu et al., 1998; Li et al., 2006). *Toxocara* spp. thực hiện đầy đủ vòng đời ở vật chủ chó mèo và thải trứng ra môi trường, tạo nên nguồn lây nhiễm chung, kể cả người (Macpherson, 2013). Ở người, ấu trùng *Toxocara* có thể di chuyển trong bất kỳ bộ phận nào của cơ thể, gây ra bốn dạng bệnh có biểu hiện lâm sàng chủ yếu: i) ấu trùng di chuyển tới nội tạng, gây bệnh ở dạng nội tạng (VLM/VT: visceral larva migrans/toxocariasis); ii) ấu trùng di chuyển ở mắt, gây bệnh ở dạng mắt (OLM/OT: ocular larva migrans/toxocariasis); iii) gây bệnh ở dạng chung (CT: covert or common toxocariasis) và iv) gây bệnh ở dạng thần kinh (NT: neurotoxocariasis) (Macpherson, 2013). Toxocariasis ở người không phải là một bệnh kí sinh trùng gây tử vong nhưng thường tạo nên những biến chứng khó chịu như hen (asthma), rối loạn thoái hóa thần kinh (neurodegenerative disorders), viêm cơ tim (myocarditis), tràn dịch màng phổi (pleural effusion), tăng bạch cầu (eosinophilia) và viêm phì đại gan lách (hepatosplenomegaly) (Macpherson, 2013; Woodhall et al., 2014; Fan et al., 2015).

Ở Việt Nam, dịch tễ học của bệnh toxocariasis ở chó, mèo và người còn chưa được

biết một cách chi tiết, đặc biệt thành phần loài *Toxocara* spp. lưu hành kí sinh và gây bệnh hầu như chưa được xác định một cách có hệ thống. Có một trường hợp toxocariasis ở mắt của người được xác định do *T. canis* gây ra bằng chỉ thị phân tử (De et al., 2014); còn lại hầu hết là bằng huyết thanh học sử dụng ELISA với độ chính xác không cao. Hiện nay, một quan điểm mặc định được cho là *T. canis* chiếm ưu thế ở chó và *T. cati* ở mèo, nhưng không có nghiên cứu rõ ràng nào được tiến hành ở động vật nuôi để xác định chính xác phân loại *Toxocara* trên chó và mèo ở Việt Nam. Các nghiên cứu trước đây cho thấy mèo ở Malaysia và Trung Quốc đã bị nhiễm thêm loài mới *T. malaysiensis*, một loài khác biệt hoàn toàn so với *T. cati* (Zhu et al., 1998; Gibbons et al., 2001; Li et al., 2006), đặt ra câu hỏi liệu loài *T. malaysiensis* có phân bố ở vùng địa lý và quốc gia khác trên thế giới trong đó có Việt Nam hay không.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thực hiện nghiên cứu xác định các loài *Toxocara* spp. thu thập tại Việt Nam bằng sinh học phân tử từ mẫu giun trưởng thành cũng như trứng của chúng và xác định chỉ có loài *T. malaysiensis* mà không phát hiện loài *T. cati* trên các mẫu thu thập ở mèo tại Việt Nam.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là giun đũa *Toxocara* sp. trưởng thành và trứng được thu thập từ mèo ở huyện Thường Tín và Thanh Oai tại Hà Nội (Bảng 1) (Anh et al., 2015). Tất cả các mẫu giun trưởng thành đã được rửa sạch bằng nước muối sinh lý và sơ bộ được thẩm định loài bằng hình thái học (Hình 1A) (Anh et al., 2015), bảo quản trong cồn 70% và lưu giữ lạnh ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Xác định bệnh giun đũa ở mèo (*Toxocariasis*) tại Việt Nam do loài mới *Toxocara malaysiensis* gây ra bằng phương pháp so sánh chuỗi gen và phân tích phả hệ

## 2.2. Tách chiết DNA tổng số

Tất cả 14 mẫu giun trưởng thành và một mẫu trứng giun đũa *Toxocara* sp. được tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ sinh phẩm AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (hãng Bioneer, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Danh sách và kí hiệu mẫu được liệt kê ở bảng 1.

Quy trình tóm tắt như sau: Mẫu được nghiền kỹ, cho vào 180 µl dung dịch Tissue Lysis buffer (ATL), tiếp tục bổ sung 20 µl Proteinase-K (100mg/ml) và ủ 56°C/2 giờ. Tiếp tục bổ sung 200 µl dung dịch AL lắc đều, ủ tiếp 56°C/30 phút. Thêm 200 µl Ethanol (100%), trộn đều rồi chuyển toàn bộ hỗn dịch sang cột có màng lọc, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ phần dịch phía dưới. Thêm 500 µl dung dịch Washing buffer 1 (AW1) vào cột lọc, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch ly tâm bên dưới. Tiếp tục thêm 500 µl dung dịch Washing buffer 2 (AW2) vào để rửa DNA, ly tâm

13.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới, rồi ly tâm lại 13.000 vòng/phút trong 2 phút để làm khô màng. Chuyển cột sang ống Eppendorf mới, thêm 60 µl dung dịch Elution buffer (EL), để 3 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 2 phút. Bỏ cột, thu dịch bên dưới, đó là DNA tổng số, bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

## 2.3. Thu nhận gen ty thể *atp6* và gen nhân ITS2 bằng phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với khuôn là DNA tổng số của các mẫu, sử dụng cặp mồi do chúng tôi thiết kế:

Cho PCR vùng gen ITS2 hệ gen nhân (giữa 5.8S và 28S), sản phẩm PCR khoảng 0,4 kb:

- Mồi xuôi U3SF: 5' GGTACCGGTGGATC ACTCGGCTCGTG 3';

- Mồi ngược U28S2R: 5' ACAACCCGACTC CAAGGTC 3';

**Bảng 1. Danh sách mẫu *Toxocara* thu thập ở mèo, nguồn gốc địa lý nơi thu thập và các chỉ thị di truyền được sử dụng để xác định các loài *T. malaysiensis* trong nghiên cứu này**

| STT | Kí hiệu mẫu            | Vị trí thu thập (huyện/tỉnh) | Vật chủ | Trạng thái mẫu | Chỉ thị |             | Xác định thuộc loài    |
|-----|------------------------|------------------------------|---------|----------------|---------|-------------|------------------------|
|     |                        |                              |         |                | ITS2    | <i>atp6</i> |                        |
| 1   | Tspcat-Hctt(egg)-VN    | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | trứng*         | ✓       | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 2   | Tspcat-Tctt1B(adu)-VN  | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 3   | Tspcat-Tctt2B(adu)-VN  | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 4   | Tspcat-Tctt9B(adu)-VN  | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 5   | Tspcat-Tctt11(adu)-VN  | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 6   | Tspcat-Tctt12(adu)-VN  | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 7   | Tspcat-Tctt13(adu)-VN  | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 8   | Tspcat-Tctt14(adu)-VN  | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            | ✓       | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 9   | Tspcat-Tctt202(adu)-VN | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 10  | Tspcat-Tctt289(adu)-VN | Thường Tín/Hà Nội            | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 11  | Tspcat-Tcto25(adu)-VN  | Thanh Oai/Hà Nội             | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 12  | Tspcat-Tcto27(adu)-VN  | Thanh Oai/Hà Nội             | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 13  | Tspcat-Tcto100(adu)-VN | Thanh Oai/Hà Nội             | mèo     | GTT            | ✓       | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 14  | Tspcat-Tcto115(adu)-VN | Thanh Oai/Hà Nội             | mèo     | GTT            |         | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |
| 15  | Tspcat-TCHN(adu)-VN    | Đống Đa/Hà Nội               | mèo     | GTT            | ✓       | ✓           | <i>T. malaysiensis</i> |

Ghi chú: trứng\* và (egg): trứng thu thập từ lông mèo chải bằng lược dày; (adu) và GTT: giun trưởng thành thu thập từ mèo; Tspcat: Nhóm mẫu *Toxocara* thu thập từ mèo; VN: Việt Nam. Kí hiệu địa lý của mẫu được ghi ở giữa (ví dụ: Tctt1B(adu): giun trưởng thành thu từ mèo ở Thường Tín, Hà Nội).

Cho PCR thu gen ty thể *atp6* (giữa *nad2* và tRNA-Ser, của tất cả *Toxocara* spp., sản phẩm PCR khoảng 0,8 kb):

- Mồi xuôi TON2F: 5' GCTTACCCKCGTT TTCGTTATGA 3';

- Mồi ngược TOSER: 5' CCCAWAAYAGAT TTAGAAGACCT 3';

Thành phần phản ứng PCR gồm: 2 ml khuôn, 25 ml PCR Master Mix (Promega), 2 ml mỗi loại mồi (10 pmol/ml), 2 ml DMSO (dimethyl sulfoxide), 17 ml nước tinh khiết, trong tổng số 50 ml. Thực hiện phản ứng PCR trên máy PTC MJ-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA), theo chu trình nhiệt: 1 chu kỳ ở 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [94°C/30 giây, 52°C/30 giây, 72°C/2 phút], chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút. Sản phẩm được tách ra khỏi agarose ("thời gel") bằng bộ sinh phẩm Accuprep Gel Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và được giải trình tự trực tiếp để thu nhận chuỗi nucleotide cuối cùng, 333 nucleotide (ITS2) và 598 nucleotide (*atp6*) để phân tích đa chuỗi. Các chuỗi này được sử dụng để truy cập Ngân hàng gen sử dụng chương trình Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) và thu thập các chuỗi gen *atp6* và ITS2 đã công bố để phân tích so sánh trình tự nucleotide và mối quan hệ phả hệ để xác định phân loại, tất cả được liệt kê ở bảng 2.

nlm.nih.gov/Blast.cgi) và thu thập các chuỗi gen *atp6* và ITS2 đã công bố để phân tích so sánh trình tự nucleotide và mối quan hệ phả hệ để xác định phân loại, tất cả được liệt kê ở bảng 2.

## 2.4. Phân tích chuỗi gen và xử lý số liệu

Trình tự chuỗi nucleotide được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng. Trình tự của *T. canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* *T. vitulorum* (14 *atp6* và 18 ITS2) và *Toxascaris leonina* (1 chuỗi *atp6* và 2 chuỗi ITS2) trong cơ sở dữ liệu GenBank, cùng với 15 chuỗi *atp6* và 4 chuỗi ITS2 của các mẫu *Toxocara* trên mèo của Việt Nam thu được trong nghiên cứu này, đã được sử dụng phân tích so sánh để xác định phân loại (Bảng 1-2). Các chuỗi nucleotide của gen *atp6* và của ITS2 được sắp xếp theo chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Khoảng cách di truyền được tính bằng phép tính toán theo mô hình Kimura 2, phân tích phả hệ bằng phương pháp "kết nối liền kề" (neighbor-joining) và cây phả hệ được thực hiện bằng chương trình MEGA6.06, hệ số tin cậy 1000 bootstrap (Tamura et al., 2013).

**Bảng 2. Danh sách số đăng kí của các chuỗi gen tham chiếu của *atp6* và ITS2 sử dụng để so sánh xác định loài *T. malaysiensis* trên mèo tại Việt Nam trong nghiên cứu này**

| Loài                         | Số đăng kí ở Ngân hàng gen của các chỉ thị đã sử dụng                                                                    |                                                                                                                                                  |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                              | <i>atp6</i>                                                                                                              | ITS2                                                                                                                                             |
| <i>Toxocara malaysiensis</i> | Trung Quốc (CN): AM412316;                                                                                               | Malaysia (MY): AJ002440; Trung Quốc (CN): AM231609;                                                                                              |
| <i>Toxocara cati</i>         | Trung Quốc (CN): AM411622;<br>Ấn Độ (IN): KJ777175                                                                       | Trung Quốc (CN): JF837171; Iran: AB819326, AB819325, AB743611, AB743598; Ấn Độ (IN): JN391473; Nhật Bản (JP): AB571303; Malaysia (MY): AJ002441; |
| <i>Toxocara canis</i>        | Australia (AU): EU730761; Trung Quốc (CN): AM411108; Ấn Độ (IN): KJ777173, KJ777174; Sri Lanka (LK): FJ418787, JN593098; | Trung Quốc (CN): JF837169; JF837170, Iran (IR): AB819330, AB743617;                                                                              |
| <i>Toxocara vitulorum</i>    | Sri Lanka (LK): FJ664617, FJ418793; Ấn Độ (IN): KJ777176, KJ777177, KJ777178;                                            | Canada (CA): JQ083352<br>Vương Quốc Anh (UK): EU189085;                                                                                          |
| <i>Toxascaris leonina</i>    | Trung Quốc (CN): KC902750;                                                                                               | Trung Quốc (CN): JF837174; JF837175;                                                                                                             |

Ghi chú: Viết tắt tên quốc gia theo qui định tại: <https://countrycode.org/>.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Mẫu *Toxocara* sp. trên mèo và kết quả thực hiện phản ứng PCR

Mẫu giun đũa *Toxocara* sp. trưởng thành thu từ mèo có độ dài khác nhau, khoảng từ 5 -13 cm, đại diện cho các dạng trưởng thành của chúng (Hình 1A), được mô tả chi tiết trong một công bố gần đây (Anh et al., 2015). Về hình thái học, giun đũa *Toxocara* sp. trưởng thành ở mèo và ở chó không khác nhau; tương tự, trứng giun đũa của các loài *Toxocara* sp. cũng rất khó phân biệt và khó xác định phân loại chính xác. Do vậy, chúng tôi đã sử dụng chỉ thị phân tử và phân tích so sánh chuỗi gen để phân loại.

Từ DNA tổng số tách chiết từ các mẫu nghiên cứu, với thành phần và chu trình nhiệt PCR như trên, sản phẩm PCR vùng gen *atp6* với kích thước khoảng 0,8 kb đã được thu nhận (Hình 1B). Sau khi xử lý, trình tự chuỗi nucleotide của toàn bộ gen *atp6* có độ dài 598 bp. Mười lăm chuỗi *atp6* (598 bp) của tất cả và 4 chuỗi ITS2 (độ dài 333 bp) đại diện một số mẫu *Toxocara* sp. trên mèo đã được thu nhận (Bảng 1).

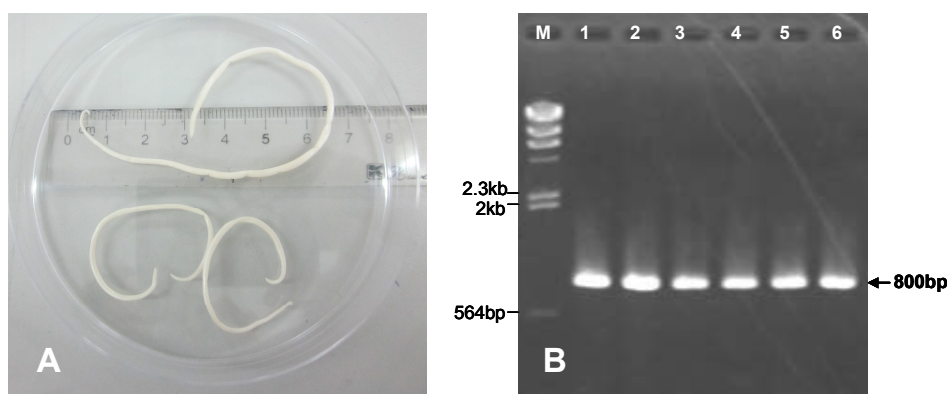
#### 3.2. So sánh tương đồng thành phần nucleotide gen *atp6* các mẫu *Toxocara* sp trên mèo của Việt Nam với *T. malaysiensis* (Trung Quốc) và các loài *Toxocara* khác

Trình tự gen *atp6* của 15 chủng *Toxocara* sp. trên mèo của Việt Nam (Anh et al., 2015)

được đưa vào tính toán đối chiếu xác định mức độ tương đồng và khoảng cách di truyền (genetic distance) với một chủng tham chiếu *T. malaysiensis* (Trung Quốc (CN): AM412316) và các chủng ngoại loài khác, bao gồm 2 chủng *T. cati* (Trung Quốc (CN): AM411622; Ấn Độ (IN): KJ777175), một chủng *T. canis* (Trung Quốc (CN): AM411108) và một chủng *T. vitulorum* (Ấn Độ (IN): KJ777176) bằng chương trình GENEDOC2.7.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy 10 chủng *Toxocara* sp. của mèo Việt Nam (số 1, 2, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13 và 15) có mức độ sai khác 0% (hay nói cách khác, có tỷ lệ đồng nhất 100%) và 5 chủng còn lại có sai khác rất thấp (2 chủng: số 3 và 5 là 0,2%; một chủng: số 10 là 0,5% và 2 chủng: số 6 và 14 là 0,7%). Như vậy, 15 chủng có mức độ đồng nhất đạt 99,3-100% với *Toxocara* thuộc loài *Toxocara malaysiensis*. Trong khi đó, với *T. cati* tỷ lệ này chỉ là 89,6 -90,1%; *T. canis* là 86,7-87,9% và *T. vitulorum* là 80,5 -88,4% (Bảng 3). Sai khác nội loài của các chủng này cũng chỉ biến động khoảng dưới 1,2%. Nếu nói về khoảng cách di truyền giữa các chủng, *Toxocara* trên mèo của Hà Nội, Việt Nam gần như không sai khác với loài *T. malaysiensis* được phát hiện tại Malaysia và Trung Quốc (Zhu et al., 1998; Li et al., 2006), nhưng lại rất xa với loài *T. cati*, một loài giun đũa rất phổ biến gây bệnh cho mèo trên thế giới.

Như vậy, 15 chủng *Toxocara* trên mèo trong nghiên cứu này là thuộc loài *T. malaysiensis*,



**Hình 1. Hình thái giun đũa *Toxocara* sp. trưởng thành trên mèo, được xác định là *T. malaysiensis* (A) và sản phẩm PCR vùng DNA chứa gen *atp6* (B)**

Ghi chú: M: chỉ thị DNA (Lambda cắt bằng HindIII); 1-6: sản phẩm vùng gen *atp6* của một số mẫu nghiên cứu.

**Bảng 3. Khoảng cách di truyền được tính toán đối chiếu khi so sánh chuỗi nucleotide của gen *atp6* giữa các chủng của các loài *Toxocara* spp.**

|                            | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20 |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 2. Tspcat-Tctt18(adu)-VN   | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 3. Tspcat-Tctt28(adu)-VN   | 0.002 | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 4. Tspcat-Tctt98(adu)-VN   | 0.000 | 0.000 | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 5. Tspcat-Tctt11(adu)-VN   | 0.002 | 0.002 | 0.007 | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 6. Tspcat-Tctt12(adu)-VN   | 0.007 | 0.007 | 0.005 | 0.007 | 0.012 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 7. Tspcat-Tctt13(adu)-VN   | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 8. Tspcat-Tctt14(adu)-VN   | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 9. Tspcat-Tctt202(adu)-VN  | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 10. Tspcat-Tctt289(adu)-VN | 0.005 | 0.005 | 0.002 | 0.005 | 0.012 | 0.008 | 0.005 | 0.005 | 0.005 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 11. Tspcat-Tcto25(adu)-VN  | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 12. Tspcat-Tcto27(adu)-VN  | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 13. Tspcat-Tcto100(adu)-VN | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 14. Tspcat-Tcto115(adu)-VN | 0.007 | 0.007 | 0.005 | 0.007 | 0.012 | 0.000 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.008 | 0.007 | 0.007 | 0.007 |       |       |       |       |       |       |    |
| 15. Tspcat-ND(adu)-VN      | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.007 |       |       |       |       |       |    |
| 16. Tmal-CN-AM412316       | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.007 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.007 | 0.000 |       |       |       |       |    |
| 17. Tcat-CN-AM411622       | 0.126 | 0.126 | 0.153 | 0.126 | 0.102 | 0.133 | 0.126 | 0.126 | 0.126 | 0.173 | 0.126 | 0.126 | 0.126 | 0.133 | 0.126 | 0.126 |       |       |       |    |
| 18. Tcat-IN-KJ777175       | 0.126 | 0.126 | 0.153 | 0.126 | 0.102 | 0.133 | 0.126 | 0.126 | 0.126 | 0.173 | 0.126 | 0.126 | 0.126 | 0.133 | 0.126 | 0.126 | 0.000 |       |       |    |
| 19. Tcan-CN-AM411108       | 0.042 | 0.042 | 0.045 | 0.042 | 0.042 | 0.025 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.047 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.025 | 0.042 | 0.042 | 0.092 | 0.092 |       |    |
| 20. Tvit-IN-KJ777176       | 0.163 | 0.163 | 0.134 | 0.163 | 0.195 | 0.126 | 0.163 | 0.163 | 0.163 | 0.116 | 0.163 | 0.163 | 0.163 | 0.126 | 0.163 | 0.163 | 0.482 | 0.482 | 0.159 |    |

Ghi chú: 1-15: mẫu *Toxocara* (Việt Nam) thu thập trên mèo (xem Bảng 1); 16: Chuỗi tham chiếu của loài *T. malaysiensis*; 17-20: các chuỗi tham chiếu của *T. cati*; *T. canis* và *T. vitulorum* (xem Bảng 2). Phần đóng khung biểu thị tỷ lệ đồng nhất rất gần của các mẫu *Toxocara* trên mèo (Hà Nội, Việt Nam), đối chiếu với chủng tham chiếu *T. malaysiensis* của Trung Quốc (Tmal-CN-AM412316).

lần đầu tiên được xác định tại Việt Nam cùng với Malaysia và Trung Quốc mà không phải là *T. cati* thường gặp, ít nhất là trong số mẫu của nghiên cứu này.

### 3.3. Mối quan hệ về loài giữa các chủng *Toxocara* trên mèo của Việt Nam và thế giới

Cây phả hệ dựa trên chuỗi gen *atp6*, thể hiện mối quan hệ về loài của 30 chủng, bao gồm 15 chủng giun đũa *Toxocara* trên mèo của Hà Nội, Việt Nam trong nghiên cứu này và 15 chủng đại diện cho các loài *Toxocara* bao gồm một chủng thuộc loài *T. malaysiensis* (Trung Quốc (CN): AM412316), 2 chủng thuộc loài *T. cati* (Trung Quốc (CN): AM411622; Ấn Độ (IN): KJ777175), 6 chủng thuộc loài *T. canis* (Australia (AU): EU730761; Trung Quốc (CN): AM411108; Ấn Độ (IN): KJ777173, KJ777174; Sri Lanka (LK): FJ418787, JN593098), 5 chủng thuộc loài *T. vitulorum* (Sri Lanka (LK): FJ664617, FJ418793; Ấn Độ (IN): KJ777176, KJ777177, KJ777178) và một chủng thuộc loài *Toxascaris leonina* (Trung Quốc (CN): KC902750) được trình bày ở hình 2.

Tương tự, dựa trên chuỗi gen ITS2, cây phả hệ của 22 chủng, gồm 4 chủng đại diện *Toxocara* trên mèo của Hà Nội, Việt Nam và 18 chủng

tham chiếu đại diện các loài *T. malaysiensis*, *T. cati*, *T. canis*, *T. vitulorum* và *Toxascaris leonina* cũng được xây dựng để đánh giá quan hệ về loài (Hình 3).

Cây phả hệ ở hình 2 dựa trên chuỗi gen *atp6* cho thấy các chủng phân thành 5 nhóm chính và riêng biệt:

- Nhóm thứ nhất gồm 15 chủng *Toxocara* trên mèo của Hà Nội, Việt Nam, tập hợp cùng với *T. malaysiensis* của Malaysia (số đăng kí: 412316; Zhu et al., 1998). Rõ ràng, 15 chủng phân lập chính xác là thuộc loài *T. malaysiensis*.

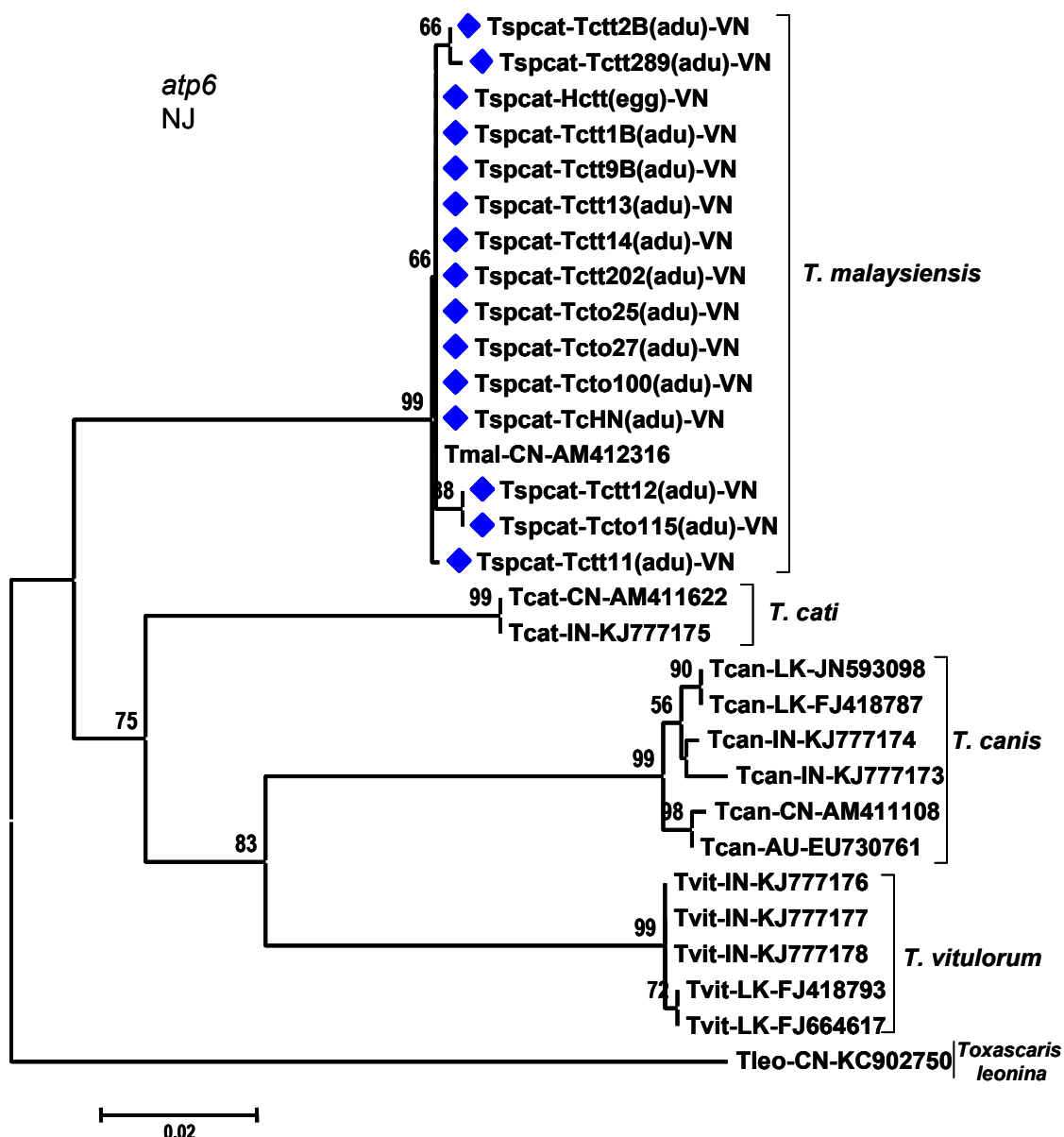
- Nhóm thứ hai gồm 2 chủng tham chiếu của Trung Quốc (AM411622) và Ấn Độ (KJ777175) thuộc loài *T. cati* đã được xác định (Li et al., 2006); không có chủng nào của Việt Nam.

- Nhóm thứ ba chỉ chứa 6 chủng tham chiếu của loài *T. canis* có nguồn gốc Sri Lanka, Ấn Độ, Trung Quốc và Australia.

- Nhóm thứ tư bao gồm 3 chủng tham chiếu của Ấn Độ và 2 chủng của Sri Lanka, tất cả đều thuộc loài *T. vitulorum*.

- Nhóm thứ năm chỉ có một chủng thuộc loài *Toxascaris leonina*, đóng vai trò là nhóm ngoại hợp (outgroup) trong cây phả hệ.

Xác định bệnh giun đũa ở mèo (Toxocariasis) tại Việt Nam do loài mới *Toxocara malaysiensis* gây ra bằng phương pháp so sánh chuỗi gen và phân tích phả hệ

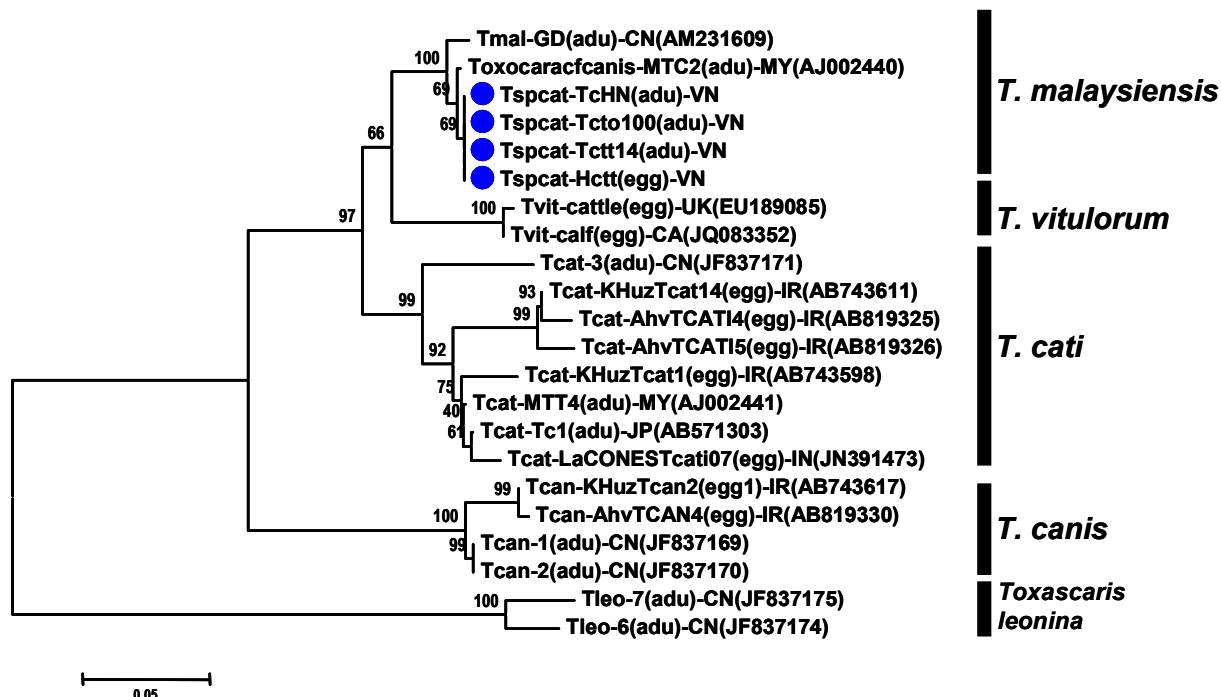


**Hình 2. Cây phả hệ xác định mối quan hệ về loài giữa các chủng *Toxocara* spp. dựa trên trình tự nucleotide gen *atp6* (598 bp), xây dựng bằng chương trình MEGA6.06, sử dụng phương pháp kết nối liên kề NJ (Neighbor-joining) với hệ số tin cậy bootstrap là 1.000 lần lặp lại (Tamura et al., 2013)**

Ghi chú: Ký hiệu mẫu/chủng tham khảo tại bảng 1. Các chủng của Hà Nội, Việt Nam đánh dấu hình chéo ở đầu chuỗi; số đăng kí Ngân hàng gen của các chủng tham chiếu ở cuối chuỗi. Viết tắt tên quốc gia theo qui định tại <https://countrycode.org/>. Vạch ngang ở cuối hình (0,02) biểu thị sai khác nucleotide (2/100 nucleotide) theo khoảng cách di truyền ở mỗi nhánh.

Tương tự như hình 2, cây phả hệ ở hình 3 dựa trên chuỗi gen ITS2 cũng tạo thành 5 nhóm, trong đó nhóm thứ nhất gồm 4 chủng đại diện của *Toxocara* trên mèo của Hà Nội, Việt Nam tập hợp cùng 2 chủng của loài *T. malaysiensis* đã được xác

định (Malaysia (MY): AJ002440; Trung Quốc (CN): AM231609)). Các nhóm còn lại gồm các chủng tham chiếu (Bảng 2) phân định tách biệt hoàn toàn với nhau, tương ứng với các loài: *T. cati*; *T. canis*; *T. vitulorum* và loài *Toxascaris leonina* (Hình 2).



**Hình 3. Cây phả hệ xác định mối quan hệ về loài giữa các chủng *Toxocara* spp. dựa trên trình tự nucleotide gen ITS2 (333 bp), xây dựng bằng chương trình MEGA6.06 (Tamura et al., 2013)**

Ghi chú: Ký hiệu mẫu/chủng tham khảo tại bảng 1. Các chủng đại diện của Việt Nam đánh dấu hình tròn ở đầu chuỗi; số đăng kí Ngân hàng gen của các chủng tham chiếu ở cuối chuỗi. Viết tắt tên quốc gia theo qui định tại <https://countrycode.org/>. Vạch ngang ở cuối hình (0,05) biểu thị sai khác nucleotide (5/100 nucleotide) theo khoảng cách di truyền ở mỗi nhánh.

Qua phân tích phả hệ xem xét mối quan hệ về loài của các chủng *Toxocara* trên mèo của Hà Nội, Việt Nam và các chủng khác của thế giới, kết quả cho thấy tất cả các chủng *Toxocara* này chỉ thuộc về một loài mới *T. malaysiensis* duy nhất; không chủng nào thuộc loài *T. cati* như thường gặp. Như vậy, trong nghiên cứu này xác định duy nhất chỉ có *T. malaysiensis*. Phát hiện *T. malaysiensis* ở mèo Việt Nam (không có *T. cati*) cho thấy sự phổ biến và phân bố của các loài giun đũa mèo ở châu Á và thế giới cũng như về tiềm năng lây nhiễm trên người của *T. malaysiensis*. Ở Việt Nam, tại các địa phương khác, mèo có nhiễm thêm *T. cati* hay không, hay chỉ duy nhất *T. malaysiensis* và trên người có những loài *Toxocara* nào nữa gây bệnh không, là những vấn đề cần có khảo sát sâu rộng hơn về dịch tễ học. Nghiên cứu này chỉ khẳng định chính xác có loài *Toxocara malaysiensis* lần đầu tiên phát hiện ở mèo tại Hà Nội, Việt Nam, đặt

ra giới hạn rộng hơn về phạm vi không gian và thời gian của *T. malaysiensis* ở Việt Nam và có thể ở các quốc gia lân cận Việt Nam, Trung Quốc và Malaysia.

#### 4. KẾT LUẬN

Mười lăm chủng *Toxocara* sp. trên mèo của Hà Nội, Việt Nam có trình tự nucleotide gen *atp6* đồng nhất rất tuyệt đối (99,3-100%) với chủng tham chiếu thuộc loài *T. malaysiensis* của Malaysia và Trung Quốc, không phát hiện *T. cati* ở bất kỳ chủng nào tại Hà Nội, Việt Nam. Phân tích phả hệ dựa trên gen *atp6* và ITS2 đều cho thấy các chủng *T. malaysiensis* của Việt Nam đều cùng nhóm với *T. malaysiensis* của Malaysia và Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu này là công bố đầu tiên về loài mới *T. malaysiensis* có nguồn gốc tại Việt Nam.

## LỜI CẢM ƠN

Cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ kinh phí cho đề tài mã số 106-YS.06-2013.02 (NTLA). Cảm ơn sự hỗ trợ cơ sở vật chất, trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anh NTL, Thuy DT, Hoan DH, Dung DT (2015). Levels of *Toxocara* infections in dogs and cats from urban Viet Nam together with associated risk factors for transmission. *J Helminthol* 2015 Jul 30: 1-3 [Epub ahead of print].
- De NV, Trung NV, Duyet LV, Chai JY (2013). Molecular diagnosis of an ocular toxocariasis patient in Viet Nam. *Korean J Parasitol.* 51(5): 563-567.
- Fan CK, Holland CV, Loxton K, Barghouth U (2015). Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders? *Clin Microbiol Rev.*, 28(3): 663-686. Review.
- Fisher M (2003). *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol.*, 19(4): 167-70. Review.
- Gibbons LM, Jacobs DE, Sani RA (2001). *Toxocara malaysiensis* n. sp. (Nematoda: Ascaridoidea) from the domestic cat (*Felis catus* Linnaeus, 1758). *J Parasitol.*, 87: 660-665.
- Li MW, Zhu XQ, Gasser RB, Lin RQ, Sani RA, Lun ZR, et al (2006). The occurrence of *Toxocara malaysiensis* in cats in China, confirmed by sequence based analyses of ribosomal DNA. *Parasitol Res.*, 99: 554-557.
- Macpherson CN (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *Int J Parasitol.*, 43: 999-1008.
- McGuinness SL, Leder K (2014). Global Burden of Toxocariasis: A Common Neglected Infection of Poverty. *Curr Trop Med Rep.*, 1: 52-61.
- Moreira GM, Telmo Pde L, Mendonça M, Moreira AN, McBride AJ, Scaini CJ, Conceição FR (2014). Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol.*, 30(9): 456-64.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.*, 30: 2725-2729.
- Woodhall DM, Eberhard ML, Parise ME (2014). Neglected parasitic infections in the United States: toxocariasis. *Am J Trop Med Hyg.*, 90(5): 810-813.
- Zhu XQ, Jacobs DE, Chilton NB, Sani RA, Cheng NA, Gasser RB (1998). Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia. *Parasitol.*, 117(2): 155-164.