

Định loài ấu trùng *Gnathostoma* spp. từ ký chủ trung gian thứ 2 bằng phương pháp sinh học phân tử

Nguyễn Thị Thanh Thảo¹, Lê Đức Vinh¹, Nguyễn Kim Thạch^{1*},
Trần Thị Huệ Vân², Huỳnh Hồng Quang³

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

³Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn

Ngày nhận bài 25/3/2019; ngày chuyển phản biện 28/3/2019; ngày nhận phản biện 22/4/2019; ngày chấp nhận đăng 26/4/2019

Tóm tắt:

Bệnh do *Gnathostoma* spp. là bệnh động vật ký sinh, lây nhiễm vào người qua đường thực phẩm do ăn các loài ký chủ trung gian 2 chứa ký sinh trùng này còn sống hoặc tái như ếch nhái, cá lóc, lươn, rắn. Trong cơ thể người, ấu trùng được phóng thích, di chuyển và gây tác hại tại nhiều cơ quan khác nhau, đôi khi có thể dẫn đến tử vong. Nghiên cứu này thu thập ấu trùng giai đoạn 3 (AdL3) của *Gnathostoma* spp. trong thịt lươn bằng kỹ thuật tiêu cơ với dịch dạ dày nhân tạo. Sử dụng kỹ thuật PCR trên ADN ty thể chẩn đoán giống *Gnathostoma* spp. với các đoạn mồi Gn_COI đặc hiệu vùng gen *cox-1* và loài *G. spinigerum* với các đoạn mồi JB đặc hiệu vùng gen COI. Nghiên cứu bước đầu thiết lập được quy trình định loài *G. spinigerum* và các loài *Gnathostoma* spp. khác.

Từ khóa: ấu trùng giai đoạn 3, giải trình tự, *Gnathostoma* spp., ký chủ trung gian 2.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Bệnh giun *Gnathostoma* spp. ở người là do lây nhiễm động vật ký sinh từ thực phẩm. Bệnh rất phổ biến ở vùng Đông Nam Á và châu Mỹ Latin. Sự phát triển du lịch sinh thái toàn cầu cộng với khả năng lây nhiễm *Gnathostoma* spp. trên nhiều loài động vật hoang dã đã dẫn đến bệnh xuất hiện rộng khắp toàn cầu [1-7].

Trong cơ thể người, giun chỉ phát triển đến giai đoạn ấu trùng hoặc giun non. Ấu trùng giun không khu trú mà có thể di chuyển từ đường tiêu hoá qua các nội tạng hoặc ra da. Khi ấu trùng hoặc giun non di chuyển vào các cơ quan trọng yếu như não, tủy sống thì bệnh cảnh sẽ nghiêm trọng và có thể đưa đến tử vong [1, 8, 9].

Nguyên nhân chính để nhiễm *Gnathostoma* spp. vào người là do ăn các loài ký chủ còn sống hoặc tái như lươn, rắn, ếch nhái, cá lóc, cá trê và ốc. Tại Thái Lan và Việt Nam đã có các nghiên cứu về tình hình nhiễm *Gnathostoma* spp. trên lươn từ trước năm 2000 đến nay để đánh giá tình hình lưu hành mầm bệnh trong tự nhiên [3, 8]. Việc xác định mầm bệnh từ các nguồn thủy sản trên chủ yếu là tìm thấy được giai đoạn ấu trùng của giống giun *Gnathostoma* spp. mà không thể xác định được chính xác loài cụ thể nào. Điểm hạn chế này đã được khắc phục bằng kỹ thuật sinh học phân tử và các nghiên cứu đã tìm thấy loài *G. spinigerum* là tác nhân chủ yếu [7, 9]. Tuy nhiên, trên thực hành lâm sàng, nhiều bệnh nhân có các triệu chứng lâm sàng không phù hợp với loài *G. spinigerum*, đặc

biệt là với những ca ấu trùng di chuyển dưới da thì y văn ghi nhận là do *G. hispidum* nhiều hơn [4]. Điều này đồng nghĩa với việc cần nghiên cứu rõ hơn về các loài *Gnathostoma* spp. cụ thể, không dừng lại ở việc quy kết chung cho loài *G. spinigerum* [3, 7].

Gần đây, các kỹ thuật sinh học phân tử đã được trang bị tại nhiều phòng xét nghiệm ở Việt Nam đã cho phép làm rõ phân bố loài ký sinh trùng nói chung và áp dụng để xác định chính xác loài *Gnathostoma* spp. nhằm bổ sung dữ liệu về loài *Gnathostoma* spp. tại Việt Nam, đây là vấn đề hết sức cần thiết trong giai đoạn hiện nay. Với ý nghĩa đó, ở nghiên cứu này kỹ thuật PCR được sử dụng nhằm khuếch đại vùng 5.8S gen cytochrome c oxidase subunit I (COI) ty thể ở vị trí vùng trình tự gen *cox-1* để xác định giống giun *Gnathostoma* spp. của ký chủ trung gian thứ 2 [8] và vị trí vùng trình tự gen JB để xác định loài giun *G. spinigerum* [5], đồng thời giải trình tự so sánh và kiểm tra giá trị của quy trình kỹ thuật. Kết quả này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu có quy mô lớn và sâu hơn trong việc định loài chính xác mầm bệnh [4, 6, 9].

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và thời gian nghiên cứu

Ấu trùng giai đoạn 3 giun *Gnathostoma* spp. thu thập từ thịt lươn được bán tại chợ từ tháng 12/2018 đến tháng 3/2019. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm, Bộ môn Ký sinh y học, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyengkimthach@pnt.edu.vn

Molecular biology identification of the *Gnathostoma* spp. larvae from 2nd intermediate host

Thi Thanh Thao Nguyen¹, Duc Vinh Le¹,
Kim Thach Nguyen^{1*}, Thi Hue Van Tran²,
Hong Quang Huynh³

¹Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh city

²University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh city

³Institute of Malariology Parasitology and Entomology, Quy Nhon

Received 25 March 2019; accepted 26 April 2019

Abstract:

Human gnathostomiasis is a serious food-borne parasitic zoonosis, caused mainly by eating raw or rare meat of 2nd intermediate hosts infected with *Gnathostoma* spp. parasites, including frogs, snakeheads, swamp eels, and snakes. Once getting into the human body, the advanced third-stage larvae (AdL3) can migrate and harm to many organs, or even lead to death. This study collected the AdL3 of *Gnathostoma* spp. from swamp eel muscle tissues by the artificial pepsin digestion technique. The mitochondrial DNA was amplified with the *cox-1* gene region of *Gnathostoma* spp. using Gn_COI primers and the COI gene region of *G. spinigerum* using JB primers by a PCR. This study has preliminarily established the identification process of *G. spinigerum* and other *Gnathostoma* species.

Keywords: advanced 3rd-stage larvae, *Gnathostoma* spp., sequencing, 2nd intermediate hosts.

Classification number: 3.5

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả.

Mẫu bệnh phẩm: mỗi ngày mua 1 cá thể lươn có trọng lượng từ 300-400 g/con x10 ngày. Rửa sạch, cắt lọc thịt lươn, sử dụng kỹ thuật tiêu cơ cải tiến bằng dung dịch acid dạ dày nhân tạo tìm ấu trùng giun [3].

Mầm bệnh thu được dưới dạng ấu trùng tự do hoặc trong nang. Nếu ấu trùng còn trong nang sẽ bóc tách nang, phóng thích ấu trùng tự do.

Mỗi cá thể lươn nhiễm ấu trùng chỉ thu 1 ấu trùng cho vào mẫu nghiên cứu, trường hợp cá thể lươn nhiễm nhiều ấu trùng, chọn một ấu trùng bằng cách trộn tất cả ấu trùng thu được trong một cốc dung dịch PBS bằng pipet nhựa cho ấu trùng di chuyển đều, hút ngẫu nhiên 1 ấu trùng. Rửa sạch ấu trùng bằng dung dịch PBS 3-6

lần để loại bỏ chất dư bám trên thân. Cho ấu trùng vào 1 tube và lưu giữ ở điều kiện -70°C.

Các kỹ thuật xét nghiệm

Tách chiết ADN khuôn mẫu: tách chiết ADN của 10 mẫu ấu trùng giun *Gnathostoma* spp. bằng kit tách chiết và kỹ thuật PCR của Hãng Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức. ADN được sử dụng làm khuôn tổng hợp cho kỹ thuật PCR.

Kỹ thuật PCR phát hiện gen COI định loài *G. spinigerum*: PCR nhân lượng đoạn ADN đích có kích thước bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu *Gnathostoma* spp. của vùng trình tự gen *cox-1* (bảng 1) [8]. Mặt khác, PCR nhân lượng đoạn ADN đích bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu *G. spinigerum* của vùng trình tự gen COI (bảng 1) [8].

Thành phần phản ứng nhân lượng PCR trong thể tích 50 µl chứa 5 µl đệm Taq (10X); 9 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), 5 µl ADN mẫu pha loãng (20 ng). Bổ sung nước khử ion tới thể tích 50 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Phản ứng được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (95°C, 3 phút); bước 2 (94°C, 1 phút); bước 3 (55°C, 1 phút); bước 4 (72°C, 1 phút); bước 5 (72°C, 5 phút). Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 39 chu kỳ và bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide.

Bảng 1. Các đoạn mỗi phát hiện gen COI và ITS2.

Tên mỗi	Trình tự mỗi	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
Gn_COI F	5'-GCC TGC TTT TCG AAT TTT TAG-3'	250	Jurairat và cs [1]
Gn_COI R	5'-ACG AAA ATC ATA CTA AGT AGC CAA-3'		
JB3 F	5'-TTT TTT GAG CAT CCT GAG GTT TAT-3'	450	Charinthon và cs [9]
JB4.5 R	5'-TAA AGT AAG AAC ATA CTG AAA ATG-3'		
NEWS2	F:5'-TGTGTAGATGAAGTACG CAG-3'	600	Almeyda-Artigas và cs [8]
RIXO	R:5'-TTCTATGATTAAATT CCG GGG-3'		

Xác định loài bằng giải trình tự gen vùng ITS2: PCR nhân lượng đoạn ADN đích bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp. của vùng trình tự gen 5.8S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR trong thể tích 50 µl, trong đó có chứa: 8 µl đệm Taq (10X), 5,6 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), 2 µl sản phẩm PCR bước 1. Bổ sung nước khử ion tới thể tích 50 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Các bước được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (94°C, 5 phút); bước 2 (94°C, 1 phút); bước 3 (55°C, 1 phút); bước

4 (72°C, 1 phút); bước 5 (72°C, 7 phút). Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 35 chu kỳ, bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide.

Sản phẩm PCR của *Gnathostoma* spp. 600 bp được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch Wizard® SV Gel theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ và được gửi đến First BASE Laboratories-Axil Scientific, Malaysia để tiến hành giải trình tự.

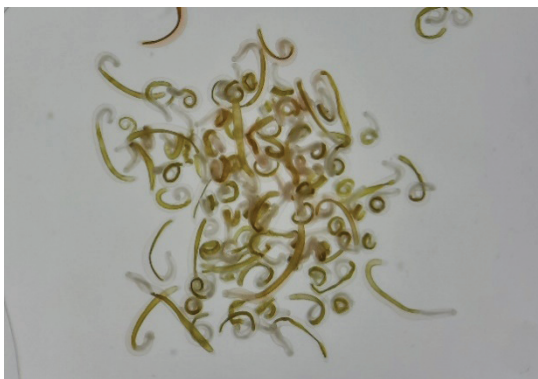
Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được nhập vào phần mềm Excel V16.0. Trình tự gen thu được sau giải trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit v.2.6 (Tom Hall, 2017) và MEGA 6 (Temura, 2013). So sánh trình tự các mẫu trong nghiên cứu với trình tự *Gnathostoma* spp. đã được công bố trên ngân hàng gen trên BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) và dựng cây phân loài mối quan hệ di truyền.

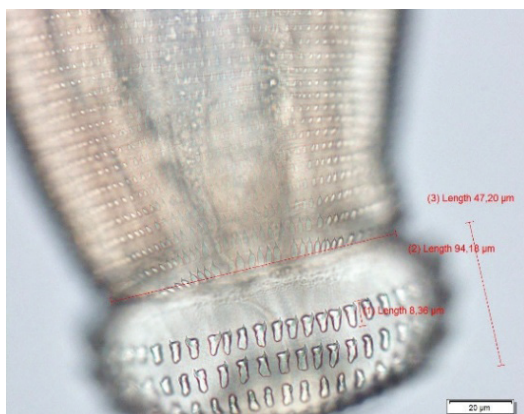
Kết quả nghiên cứu

Về hình thể ấu trùng

Ấu trùng dài 1-3 mm, màu trắng ánh vàng, đầu phình to thành vòm tròn, có 4 hàng gai nhỏ, bộ phận sinh dục còn nguyên sơ, toàn thân có nhiều gai mảnh (hình 1, 2).



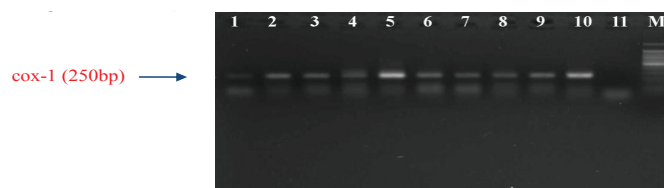
Hình 1. Ấu trùng tròn vện sau kỹ thuật tiêu cơ và gạn lọc.



Hình 2. Cấu trúc gai đầu và thân của 1 ấu trùng x100 lần.

Khảo sát mức độ biểu hiện gen *cox-1* đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp.

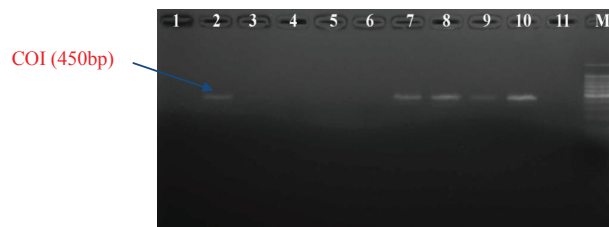
ADN tách chiết được từ 10 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp nhân lượng PCR kích thước 250 bp gen *cox-1*. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5% (hình 3).



Hình 3. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen *cox-1* ở 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. bằng điện di agarose 1,5%. M: thang ADN 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng 11: chứng H_2O .

Khảo sát mức độ biểu hiện gen *COI* đặc hiệu cho *G. spinigerum*

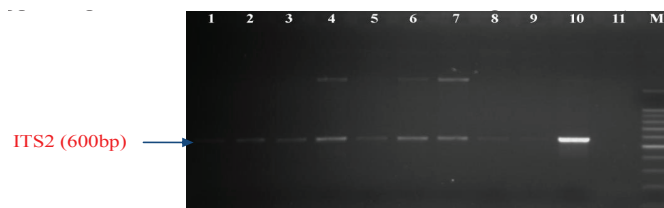
ADN tách chiết được từ 10 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp nhân lượng PCR kích thước 450 bp vùng gen *COI* đặc hiệu cho *G. spinigerum*. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5% (hình 4).



Hình 4. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện vùng gen *COI* ở 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. bằng điện di agarose 1,5%. M: thang ADN 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng 11: chứng H_2O .

Khảo sát mức độ biểu hiện gen *5.8S rRNA-ITS2* đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp.

ADN tách chiết được từ 10 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp nhân lượng PCR kích thước 600 bp vùng gen *5.8S rRNA-ITS2* đặc hiệu cho *Gnathostoma* spp. Sản phẩm PCR được điện di trên bản thạch agarose 1,5% (hình 5).



Hình 5. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện vùng gen *5.8S rRNA-ITS2* ở 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. bằng điện di agarose 1,5%. M: thang ADN 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng 11: chứng H_2O .

Kết quả giải trình tự gen 5.8S rRNA-ITS2

Sau khi thực hiện tổng hợp nhân lượng PCR, tiến hành giải trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 của 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. để xác định loài. Kết quả giải trình tự so sánh bằng phần mềm Bio-edit v.7.2.6 và MEGA6 cho thấy các trình tự nucleotide 5.8S rRNA-ITS2 giống nhau ở cả 6 ấu trùng *G. spinigerum* đặc hiệu vùng gen COI ở thí nghiệm trên.

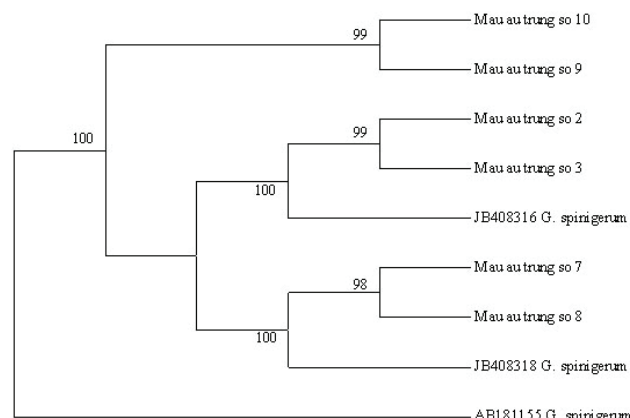
Mặt khác dùng chương trình BLAST truy cập ngân hàng gen tìm kiếm những chuỗi tương đồng đã được đăng ký. Kết quả cho thấy đoạn gen 5.8S rRNA-ITS2 của 6 mẫu ấu trùng *G. spinigerum* hoàn toàn tương đồng với ITS2 *G. spinigerum* trên thế giới (bảng 2 và hình 6A), 4 mẫu ấu trùng còn lại có 3 mẫu hoàn toàn tương đồng với ITS2 của *G. doloresi* trên thế giới và 1 mẫu hoàn toàn tương đồng với ITS2 *G. hispidum* thế giới (bảng 3 và hình 6B).

Bảng 2. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen 5.8S rRNA-ITS2 của 6 mẫu ấu trùng *G. spinigerum* và thế giới.

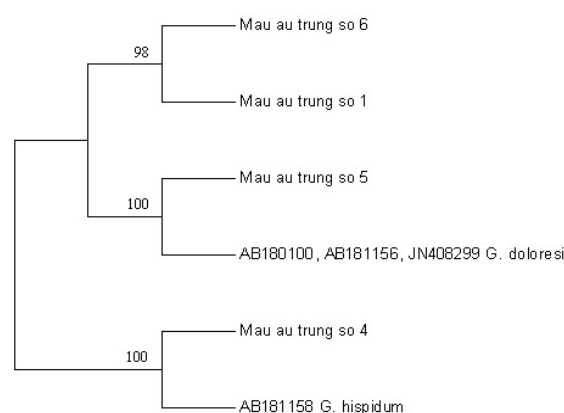
Hệ số tương đồng (%)							
Mẫu ấu trùng	2	3	7	8	9	10	Mã số gen của Ngân hàng gen thế giới
2	100	99,4	99,7	99,5	98,5	98,2	JN408316 <i>G. spinigerum</i>
3	0,6	100	98,4	98,5	99,0	98,1	JN408316 <i>G. spinigerum</i>
7	0,3	1,6	100	98,9	99,8	98,3	JN408318 <i>G. spinigerum</i>
8	0,5	1,5	1,1	100	98,3	99,7	JN408318 <i>G. spinigerum</i>
9	1,5	1,0	0,2	1,7	100	99,5	AB181155 <i>G. spinigerum</i>
10	1,8	1,9	1,7	0,3	0,5	100	AB181155 <i>G. spinigerum</i>
Mẫu ấu trùng	2	3	7	8	9	10	

Bảng 3. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen 5.8S rRNA-ITS2 của 3 mẫu ấu trùng *G. doloresi*, 1 mẫu ấu trùng *G. hispidum* và trên thế giới.

Hệ số tương đồng (%)					
Mẫu ấu trùng	1	5	6	4	Mã số gen của Ngân hàng gen thế giới
1	100	99,4	99,1	31,7	AB181156 <i>G. doloresi</i>
5	0,6	100	99,6	36,2	AB180100 <i>G. doloresi</i>
6	0,9	0,4	100	33,1	JN408299 <i>G. doloresi</i>
4	68,3	63,8	66,9	100	AB181158 <i>G. hispidum</i>
Mẫu ấu trùng	1	5	6	4	



(A)



(B)

Hình 6. Cây phát sinh loài xây dựng trên cơ sở so sánh trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 của 6 mẫu *G. spinigerum* (A), 3 mẫu *G. doloresi* và 1 mẫu *G. hispidum* (B).

Bàn luận

Nghiên cứu này đã thu được số lượng 10 mẫu theo yêu cầu đặt ra. Khảo sát về hình thể cho thấy các ấu trùng khá đồng nhất. Tất cả ấu trùng được định danh là ấu trùng giun tròn thuộc giống *Gnathostoma* spp. bởi cấu trúc hình ống với phần đầu nhô ra có 4 hàng gai vòng quanh. Cấu trúc miệng có 2 môi và gai chạy dọc theo thân. Với độ phóng đại lớn đã cho thấy rõ cấu trúc đầu của gai ở vùng thân trước, tận cùng chỉ đơn lẻ không phân chia nhánh (hình 1 và hình 2). Về phương diện hình thể, phân loài của giống *Gnathostoma* spp. sẽ dựa vào sự bố trí các hàng gai trên toàn bộ hay từng vùng của thân ấu trùng/giun và sự phân chia số lượng nhánh tại đầu tận của gai hay hình thể gai. Như vậy, việc thu thập ấu trùng và quan sát hình thể đã không thể xác định được các ấu trùng thu được trong nghiên cứu là loài *G. spinigerum* hay là loài nào khác dù rằng y văn đã ghi nhận hầu hết tác nhân gây bệnh là loài *G. spinigerum* [4].

Bước xác định giống *Gnathostoma* spp. kết quả từ hình 3 cho thấy, cặp mỗi gen cox-1 cả 10 cá thể ấu trùng *Gnathostoma* spp.

xuất hiện dải băng ADN kích thước khoảng 250 bp, đúng với kích thước theo thiết kế. Điều này một lần nữa khẳng định cả 10 ấu trùng thu được trong nghiên cứu này đều là ấu trùng *Gnathostoma* spp. vì đã được xác định bởi cả 2 phương diện hình thể học và sinh học phân tử. Đồng thời kết quả cũng cho thấy không có sự biến đổi chuyên biệt bên trong cấu trúc vùng trình tự gen *cox-1*. Như vậy, thiết kế về cặp mồi này có thể ứng dụng cho các nghiên cứu với quy mô cỡ mẫu lớn hơn, xác định có hoặc không nhiễm bệnh do giống *Gnathostoma* spp.

Tiếp sau bước định giống, nghiên cứu này tiến tới xác định loài *G. spinigerum* bởi gen COI đặc hiệu cho *G. spinigerum*. Kết quả hình 4 cho thấy, các cá thể ấu trùng *Gnathostoma* spp. tại vị trí giếng thứ 2, 3, 7, 8, 9 và 10 xuất hiện băng ADN kích thước khoảng 250 bp rõ ràng, đúng với kích thước theo lý thuyết thiết kế cho *G. spinigerum*. Như vậy, ấu trùng đã được xác định chính xác là loài *G. spinigerum* [1, 9]. Tuy nhiên, ở vị trí giếng thứ 3 dải băng ADN xuất hiện mờ hơn so với các giếng khác, có thể do hiệu suất phản ứng PCR thấp. Trường hợp này, chúng tôi nhận thấy nhiều khả năng là do kỹ thuật. Tuy nhiên, sự lặp lại thí nghiệm đã không cho kết quả khác hơn. Để lý giải điều này, bước giải trình tự gen tiếp theo sẽ chứng minh được chính xác mẫu 3 là *G. spinigerum* hay là loài khác và mức độ tương đồng của nó với ngân hàng gen như thế nào.

Kết quả giải trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 được biểu thị ở bảng 2, 3 và hình 6A, 6B khẳng định 10 mẫu ấu trùng *Gnathostoma* spp. thu thập được có 6/10 mẫu ấu trùng thuộc loài *G. spinigerum* tương tự kết quả thí nghiệm biểu hiện đặc hiệu gen COI ở trên. Phân tích phá hệ cho thấy, loài *G. spinigerum* của mẫu phân lập trong nghiên cứu ít có sự biến đổi về mặt di truyền, có mức độ tương đồng cao (98-100%) với loài *G. spinigerum* trên thế giới. Điểm mới trong nghiên cứu này là giải trình tự gen khẳng định có 3/10 mẫu ấu trùng thuộc loài *G. doloresi* và 1 mẫu ấu trùng thuộc loài *G. hispidum* cũng có mức độ tương đồng cao vùng trình tự gen 5.8S rRNA-ITS2 (99-100%) với thế giới đã công bố.

Chuỗi thí nghiệm trên cũng đồng thời cho thấy không có sự biến đổi chuyên biệt bên trong cấu trúc vùng trình tự gen JB. Như vậy, kỹ thuật này cho kết quả xác định loài *G. spinigerum* tốt và ổn định. Hơn nữa, khi kết chuỗi các thí nghiệm thành quy trình định loài để ứng dụng thực tế, nghiên cứu đã cho thấy có thể loại bỏ bước chẩn đoán giống *Gnathostoma* bằng sinh học phân tử bởi có sự đồng bộ cao với chẩn đoán hình thể. Vì vậy, chẩn đoán loài sẽ bao gồm các bước: định loại giống bằng hình thể, xác định loài *G. spinigerum* bằng vùng gen COI đặc hiệu bằng đoạn mồi như thiết kế trên và cuối cùng, giải trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 để xác định loài khác không phải loài *G. spinigerum*.

Trong kết quả nghiên cứu, loài *G. spinigerum*, *G. doloresi*, và *G. hispidum* chiếm tỷ lệ lần lượt là 6/10, 3/10 và 1/10 là cơ sở tham khảo bước đầu do số mẫu thực nghiệm còn nhỏ. Trong tương lai, lặp lại chuỗi thí nghiệm đã thiết lập với các mẫu thực nghiệm khác và quần thể lớn hơn, nhiều vùng địa lý hơn để xác định tỷ lệ chính xác của từng thành phần loài tương ứng nhằm bổ sung dữ liệu về phân bố loài trên các vùng khác nhau.

Kết luận

Nghiên cứu đã thực nghiệm thành công kỹ thuật chẩn đoán sinh học phân tử trên ADN ty thể giống *Gnathostoma* spp. với các đoạn mồi Gn_COI đặc hiệu vùng trình tự gen *cox-1* và *G. spinigerum* với các đoạn mồi JB đặc hiệu vùng trình tự gen COI. Hiệu quả của kỹ thuật này hoàn toàn chính xác với kết quả giải trình tự gen. Bên cạnh đó, hình thể học vẫn có giá trị tốt trong xác định giống *Gnathostoma*.

Thành phần *G. spinigerum* chiếm 6/10, *G. doloresi* chiếm 3/10 và *G. hispidum* chiếm 1/10 trong nghiên cứu thí điểm này và có sự tương đồng cao trình tự vùng gen 5.8S rRNA-ITS2 với các loài trên thế giới.

Nghiên cứu cần mở rộng áp dụng quy trình đối với các mầm bệnh ký sinh trùng gây bệnh khác ở người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Jurairat, I.M. Pewpan, S. Oranuch, S. Lakkhana (2015), "Three human gnathostomiasis cases in Thailand with molecular identification of causative parasite species", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **93**(3), pp.615-618.
- [2] Lê Đức Vinh và cs (2013), "Khảo sát tình hình nhiễm *Gnathostoma* spp. trên gan lươn (*Monopterus albus*) tại chợ N. quận 10, TP Hồ Chí Minh từ tháng 3/2010- 2/2011", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **3**, tr.121-126.
- [3] Lê Đức Vinh và cs (2017), "Bước đầu thực nghiệm xây dựng quy trình tiêu cơ cải tiến trong chẩn đoán nhiễm *Gnathostoma* spp. ở lươn (*Monopterus albus*)", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **3**, tr.23-29.
- [4] Nguyễn Văn Thoại và cs (2014), "Định danh ấu trùng giai đoạn 3 *Gnathostoma* spp. thu thập trên cá lóc bông, ếch, lươn tại một số tỉnh phía nam bằng phương pháp sinh học phân tử", *Tạp chí Khoa học Công nghệ*, **1**, tr.48-54.
- [5] W. Saksirisampant, B. Wongsatayanon, Thanomsub (2012), "Positivity and intensity of *Gnathostoma spinigerum* infective larvae in farmed and wild-caught swamp eels in Thailand", *Korean J. Parasitol.*, **50**(2), pp.113-118.
- [6] Trần Thị Hồng và cs (2017), "*Gnathostoma* spp.", *Ký sinh trùng y học*, Nhà xuất bản Y học TP Hồ Chí Minh, tr.156-161.
- [7] Trần Thị Huệ Vân và cs (2018), "Chẩn đoán *Gnathostoma* spp. từ ký chủ trung gian 2 bằng kỹ thuật sinh học phân tử trên ADN ty thể", *Tạp chí Phòng chống Bệnh sốt rét và các Bệnh ký sinh trùng*, **5**, tr.40-45.
- [8] Almeyda-Artigas, R.J. Bargues, S. Mas-Coma (2000), "ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas", *Journal of Parasitology*, **86**, pp.537-544.
- [9] N. Charinthon, W.T. Jitra (2005), "Analysis of sequence variation in *Gnathostoma spinigerum* mitochondrial DNA by single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequence", *Parasitology International*, **54**, pp.65-68.