

Ứng dụng kỹ thuật PCR tổ định loài giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus* ở người nhiễm bệnh

Luu Thanh Liêm¹, Lê Quốc Hùng², Lê Đức Vinh³, Nguyễn Kim Thạch^{3*}, Phan Văn Trọng⁴

¹Bệnh viện Bệnh nhiệt đới TP Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Chấn thương chỉnh hình TP Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

⁴Trường Đại học Tây Nguyên

Ngày nhận bài 3/5/2019; ngày chuyển phản biện 6/5/2019; ngày nhận phản biện 6/6/2019; ngày chấp nhận đăng 20/6/2019

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã ứng dụng kỹ thuật PCR tổ (nested PCR) để xác định giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus* trong phân người nhiễm bệnh ở cộng đồng dân cư xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An. 80 mẫu ADN tách chiết từ 80 mẫu ấu trùng giun từ phân người bệnh được phân lập bằng phương pháp Sasa đã cho kết quả dương tính. Kết quả PCR tổ đặc hiệu vùng gen 28S rRNA-ITS2 thu được tỷ lệ nhiễm *Necator americanus* có 66 mẫu (82,5%), *Ancylostoma* spp. có 5 mẫu (6,25%) và đồng nhiễm cả 2 loài có 9 mẫu (11,25%). Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, kỹ thuật này là một công cụ bổ sung có giá trị trong chẩn đoán và kiểm soát nhiễm bệnh ký sinh trùng ở các tỉnh/thành phố của Việt Nam.

Từ khóa: *Ancylostoma* spp., ấu trùng, *Necator americanus*, PCR tổ, phân người, phương pháp Sasa.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Hiện nay, tỷ lệ nhiễm giun móc và giun mỏ ở người vẫn ở mức cao, trong khi tỷ lệ nhiễm các loài giun khác có chiều hướng giảm. Tại Việt Nam, loài giun móc gây bệnh ở người có tên là *Ancylostoma duodenale* chiếm tỷ lệ thấp, còn loài giun mỏ *Necator americanus* gây bệnh chiếm tỷ lệ cao hơn. Do chu kỳ phát triển, cách thức gây bệnh và kỹ thuật chẩn đoán giống nhau nên 2 loài giun này thường được ghép chung với nhau bằng danh từ giun móc/mỏ [1-3].

Trong chẩn đoán thường dựa vào hình thể trứng và ấu trùng của 2 loài giun từ bệnh phẩm. Chúng chỉ có vài điểm khác biệt nhỏ nên rất khó định danh. Do vậy, việc chẩn đoán hiện nay mới chỉ dừng lại ở chẩn đoán chung chung và chưa có định loài. Với sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử, kỹ thuật PCR tổ đã giúp việc chẩn đoán định loài có cơ sở khoa học chính xác và toàn diện hơn. Điểm hạn chế của kỹ thuật này là giá thành còn cao. Ngoài ra, kỹ thuật này có nhiều triển vọng trong xác định tỷ lệ nhiễm các loài giun móc *Ancylostoma ceylanicum* và *Ancylostoma duodenale* gây bệnh ở người Việt Nam [3-5].

Với ý nghĩa đó, ở nghiên cứu này kỹ thuật PCR tổ được

sử dụng nhân lượng vùng gen 28S rRNA-ITS2 định loài *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* gây bệnh ở cộng đồng dân cư xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An, là địa phương có tỷ lệ nhiễm các loài giun nêu trên tương đối cao.

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và thời gian nghiên cứu

Ấu trùng giun móc/mỏ được thu thập từ 80 mẫu xét nghiệm phân từ tháng 12/2017 đến tháng 12/2018. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm, Bộ môn Ký sinh y học, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

Thiết kế nghiên cứu: thực nghiệm phòng thí nghiệm.

Mẫu bệnh phẩm: thu thập 80 mẫu phân của người dân đồng ý tham gia và cư ngụ tại xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An.

Các kỹ thuật xét nghiệm

Xác định hình thể ấu trùng và trứng của giun móc hoặc giun mỏ bằng soi trực tiếp dưới kính hiển vi: 80 mẫu phân được cấy bằng phương pháp Sasa thu thập được 80 mẫu

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

Application of nested PCR to detect *Ancylostoma* spp. and *Necator americanus* infections in human

Thanh Liem Luu¹, Quoc Hùng Le², Duc Vinh Le³,
Kim Thach Nguyen^{3*}, Van Trong Phan⁴

¹Hospital for Tropical Diseases, Ho Chi Minh city

²Hospital for Traumatology and Orthopaedics, Ho Chi Minh city

³Pham Ngoc Thach University of Medicine

⁴Tay Nguyen University

Received 3 May 2019; accepted 20 June 2019

Abstract:

In the present study, a nested PCR based approach was applied for the specific detection of *Necator americanus* and *Ancylostoma* spp. in human faeces in Duc Lap Thuong commune, Duc Hoa district, Long An province. A total of 80 DNA larva samples were extracted from 80 positive human faecal samples using the Sasa method. The results of the nested PCR based method amplifying a fragment of the 28S rRNA-ITS2 region exhibited that, the infection with *Necator americanus* was found in 66 (82.5%) samples, the infection with *Ancylostoma* spp. was found in 5 (6.25%) samples, and 9 (11.25%) samples represented the co-infection with both species. The results showed that the present PCR approach is a valuable complementary tool for the diagnosis of *Necator americanus* and *Ancylostoma* spp. infections in human and for monitoring the parasitic infection control programs in Vietnamese provinces and cities.

Keywords: *Ancylostoma* spp., human faeces, larva, *Necator americanus*, nested PCR, Sasa method.

Classification number: 3.3

ấu trùng giai đoạn I, II và soi trực tiếp dưới kính hiển vi để xác định mẫu dương tính khi tìm thấy trứng giun móc hoặc trứng giun mỏ [1]. Phương pháp Sasa (*Harada mori* cải tiến): 10 g phân cấy sau 3 ngày sẽ thu thập được ấu trùng giun. Ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy cặn lắng soi dưới kính hiển vi tìm ấu trùng giai đoạn I, II của giun móc hoặc giun mỏ. Cố định ấu trùng giun bằng dung dịch cồn 70°.

Tách chiết ADN khuôn mẫu: tách chiết ADN của 10 ấu trùng giun bằng kit tách chiết và kỹ thuật PCR của Hãng Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức. ADN thu được sau tách chiết được lưu trữ ở -20°C. ADN được sử dụng làm khuôn tổng hợp cho kỹ thuật PCR tổ gồm 2 bước [3]:

- Bước 1: PCR nhân lượng đoạn ADN đích có kích thước bằng mỗi NC1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR trong thể tích 20 µl chứa 4 µl đệm Taq (10X), 4,8 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), 4 µl ADN mẫu pha loãng (20 ng). Bổ sung nước khử ion tới thể tích 20 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Phản ứng được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (94°C, 3 phút); bước 2 (94°C, 30 giây); bước 3 (55°C, 30 giây); bước 4 (72°C, 30 giây); bước 5 (72°C, 7 phút). Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 30 chu kỳ và bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu [3, 6, 7]. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide. Chỉ dùng các sản phẩm PCR nhân lượng thành công ở bước 1 để thực hiện PCR nhân lượng bước 2.

- Bước 2: PCR nhân lượng đoạn ADN đích có kích thước bằng mỗi NA F, mỗi AD1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR trong thể tích 50 µl 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 nhân lượng bước 1. 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 (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 và bước 6 ở điều kiện 4°C, bảo quản mẫu [3, 6, 7]. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide.

Bảng 1. Các đoạn môi vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2.

Tên môi	Trình tự môi	PCR nhân lượng đoạn ADN	Tài liệu tham khảo
NC1 F	5'-ACG TCT GGT TCA GGG TTC TT-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 310 bp	Gasser và cs [8]; Ngui và cs [9]
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'	<i>Necator americanus</i> : 420 bp	
NA F	5'-ATG TGC ACG TTA TTC ACT-3'	<i>Necator americanus</i> : 250 bp	Verweij và cs [10]
AD1 F	5'-CGA CTT TAG AAC GTT TCG GC-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 130 bp	De Gruijter và cs [5]
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'		

Phân tích và xử lý số liệu: số liệu được nhập vào phần mềm Excel V16.0.

Kết quả nghiên cứu

Hình thể ấu trùng, trứng của loài giun móc và giun mỡ

Trong nghiên cứu xác định được 80 bệnh nhân nhiễm giun móc hoặc giun mỡ bằng cả 2 kỹ thuật nuôi cấy Sasa tìm ấu trùng giun và kỹ thuật soi trực tiếp tìm trứng giun. 80 mẫu ấu trùng dài 0,2-0,5 mm, màu trắng ánh vàng, có xoang miệng dài, mở và đuôi nhọn. Rất khó phân biệt ấu trùng giữa *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* (hình 1A và 1B).



Hình 1A. Ấu trùng giai đoạn I của giun móc hoặc giun mỡ. **Hình 1B.** Ấu trùng giai đoạn II của giun móc hoặc giun mỡ.

80 mẫu trứng của 2 loài *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* rất giống nhau. Có hình bầu dục, vỏ mỏng, màu xám đen. Kích thước 60x40 µm và có 4-8 phôi bào (hình 2).

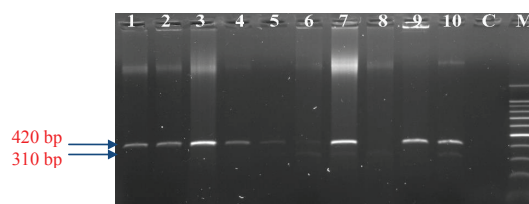


Hình 2. Trứng của giun móc hoặc giun mỡ.

Kết quả PCR tổ định loài *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* đặc hiệu vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2

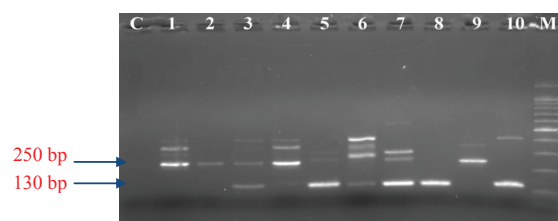
ADN tách chiết từ 80 mẫu ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp trong PCR tổ 2 bước đặc hiệu *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2.

Ở PCR bước 1, bộ môi NC1-NC2 được sử dụng nhân lượng các mảnh ADN kích thước 310 bp của loài *Ancylostoma* spp. và các mảnh ADN kích thước 420 bp của loài *Necator americanus*. Sản phẩm PCR được điện di trên bản thạch agarose 1,5% (hình 3).



Hình 3. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen vùng trình tự 28S rRNA-ITS2 của PCR tổ bước 1 với 10 mẫu ADN ấu trùng *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* bằng điện di agarose 1,5%. M: thang DNA 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng C: chứng H₂O.

Ở PCR bước 2, sử dụng kết hợp các môi AD1 với NC2 để nhân lượng các mảnh ADN kích thước 130 bp của loài *Ancylostoma* spp. và kết hợp các môi NA với NC2 để nhân lượng các mảnh ADN kích thước 250 bp của loài *Necator americanus*. Sản phẩm PCR được điện di trên bản thạch agarose 1,5% (hình 4). Ở bước này, do tiếp tục sử dụng môi ngược NC2 nên một số mẫu có xuất hiện các mảnh ADN mờ kích thước 310 bp hoặc 420 bp còn dư thừa từ sản phẩm PCR bước 1, như tại vị trí giếng thứ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 và 10 của hình 4.



Hình 4. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen vùng trình tự 28S rRNA-ITS2 của PCR tổ bước 2 với 10 mẫu ADN ấu trùng *Ancylostoma* spp. và *Necator americanus* bằng điện di agarose 1.5%. M: thang DNA 100 bp, giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng C: chứng H₂O.

Sau khi đối chiếu kết quả PCR tổ ở cả 2 bước, có 66 mẫu (82,5%) được xác định nhiễm *Necator americanus* như tại vị trí giếng thứ 1, 2, 4, 9 của hình 3 và hình 4; 5 mẫu (6,25%) nhiễm *Ancylostoma* spp. như tại vị trí giếng thứ 8 của hình 3 và 4; có 9 mẫu (11,25%) đồng nhiễm cả 2 loài như tại vị trí giếng thứ 3, 5, 6, 7, 10 của hình 3 và hình 4 (bảng 2).

Bảng 2. Tỷ lệ loài *Necator americanus* và *Ancylostoma* spp. được xác định bằng kỹ thuật PCR tổ.

Loài	Số lượng	Tỷ lệ%
<i>Necator americanus</i>	66	82,5
<i>Ancylostoma</i> spp.	5	6,25
<i>N. americanus</i> và <i>Ancylostoma</i> spp.	9	11,25
Tổng	80	100

Bàn luận

Nghiên cứu này đã thu được 80 mẫu phân dương tính của người dân cư ngụ tại xã Đức Lập Thượng, huyện Đức Hoà, tỉnh Long An. Khảo sát về hình thể cho thấy các ấu trùng khá đồng nhất. Tất cả ấu trùng, trứng được định danh là ấu trùng và trứng của giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus*. Như vậy, dù được chẩn đoán nhiễm giun móc hoặc giun mỏ nhưng về hình thể ấu trùng vẫn còn nhiều trường hợp không thể phân loài, bởi vì trong quá trình thực hiện cấy bằng phương pháp Sasa có nhiều yếu tố ảnh hưởng như thời gian cấy, nhiễm nấm, pH... làm biến đổi, mất đi hình dạng điển hình của ấu trùng. Đây là một trong các lý do mà phần lớn các nghiên cứu trên cộng đồng hoặc thực hiện tại bệnh viện chỉ kết luận chung là nhiễm giun móc hoặc giun mỏ.

Ở bảng 2 cho thấy, 80 mẫu ADN tách chiết từ nguồn ấu trùng làm khuôn tổng hợp cho kỹ thuật PCR tổ có khả năng phát hiện giun móc và giun mỏ là 100%, tương đồng với chẩn đoán hình thể ấu trùng và trứng. Với kết quả này cho thấy, bước đầu kỹ thuật PCR tổ có khả năng định loài khá tốt. Tỷ lệ nhiễm *Necator americanus* có 66/80 mẫu (82,5%), chiếm phần lớn các ca nhiễm dương tính ở cộng đồng dân cư khảo sát. Điều này cũng chứng minh khả năng phát hiện giun mỏ *Necator americanus* của kỹ thuật trong nghiên cứu tốt hơn so với kỹ thuật chẩn đoán hình thể truyền thống của các tác giả M. Papaïakovou tại Ghana [7] và Hoàng Thúy Hằng tại Việt Nam [11]. Tỷ lệ nhiễm loài giun móc *Ancylostoma* spp. có 5/80 mẫu (6,25%) và đồng nhiễm cả 2 loài có 9/80 mẫu (11,25%).

Kỹ thuật PCR tổ với các đoạn mồi được thiết lập giúp phân biệt được 2 loài giun móc *Ancylostoma* spp. và giun mỏ *Necator americanus*. Theo các báo cáo gần đây, đã ghi nhận có sự xuất hiện nhiễm giun móc *Ancylostoma ceylanicum* ở người song song với nhiễm giun móc *Ancylostoma duodenale*. Vì lý do đó, trong nghiên cứu này chỉ ghi nhận ở mức độ loài *Ancylostoma* spp. Những sản phẩm PCR tổ của *Ancylostoma* spp. thu được sẽ được giải trình tự phân biệt 2 loài trong những nghiên cứu sắp tới.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm giun mỏ *Necator americanus* cao (85%) tương đương tỷ lệ nhiễm ở châu Á trong các nghiên cứu đã công bố [3, 12]. Khi nghiên cứu nhiễm giun móc và giun mỏ ở người, thông thường đều nghĩ đến vai trò chính của *Necator americanus* mà bỏ qua vai trò gây bệnh của *Ancylostoma* spp. Tỷ lệ đồng nhiễm cả 2 loài cao (11,25%) càng cho thấy vai trò ưu việt của kỹ thuật PCR tổ [4, 7].

Kết luận

Nghiên cứu đã thực nghiệm thành công kỹ thuật chẩn đoán PCR tổ đặc hiệu vùng gen trình tự 28S rRNA-ITS2. Tỷ lệ nhiễm *Necator americanus* chiếm 82,5%, nhiễm *Ancylostoma* spp. chiếm 6,25% và đồng nhiễm cả 2 loài chiếm 11,25%. Kỹ thuật này có thể thực hiện với các ấu trùng đông lạnh -20°C hoặc lưu trữ trong ethanol.

Nghiên cứu cần mở rộng áp dụng quy trình chẩn đoán PCR tổ từ ADN tách chiết trực tiếp từ phân người, nhằm khắc phục nhược điểm về thời gian trong quá trình cấy của phương pháp Sasa. Đồng thời sử dụng các sản phẩm PCR tổ của *Ancylostoma* spp. trong nghiên cứu này để giải trình tự gen, định tỷ lệ thành phần của loài *Ancylostoma* spp. tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Norhidayu, A.L.L. Yvonne (2015), "Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*", *Acta Tropica*, **173**, pp.109-111.
- [2] Lê Đức Vinh và cs (2017), *Ký sinh trùng y học*, Giáo trình thực tập, Nhà xuất bản Y học, TP Hồ Chí Minh, tr.17-19, tr.55-57.
- [3] Trần Thị Hồng và cs (2017), "Bệnh do giun móc ở người", *Ký sinh trùng y học*, Nhà xuất bản Y học, TP Hồ Chí Minh, tr.141-145.
- [4] S. Brooker, J. Bethony, P.J. Hotez (2004), "Human hookworm infection in the 21st century", *Adv. Parasitol.*, **58**, pp.197-288.
- [5] J.M. De Grijter, L. van Lieshout, R.B. Gasser, J.J. Verweij, E.A. Brien, J.B. Ziem (2005), "Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* infections in human in northern Ghana", *Trop. Med. Int. Health*, **10**, pp.574-580.
- [6] R.A. Lawrence, C.O. Thomas (2007), *Atlas of human parasitology*, 5th ed., pp.217-231.
- [7] M. Papaïakovou, et al. (2017), "A novel, species-specific, real-time PCR assay for the detection of the emerging zoonotic parasite *Ancylostoma ceylanicum* in human stool", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005734>.
- [8] R.B. Gasser, N.B. Chilton, H. Hoste, I. Beveridge (1993), "Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths", *Nucleic Acids Research*, **21**, pp.2525-2526.
- [9] R. Ngui, L.S. Ching, T.T. Kai, M.A. Roslan, Y.A.L. Lim (2012), "Molecular identification of human hookworm infections in economically disadvantaged communities in Peninsular Malaysia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **86**(5), pp.837-842.
- [10] J.J. Verweij, D.S. Pit, L. van Lieshout (2001), "Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples", *Tropical Medicine and International Health*, **6**, pp.726-731.
- [11] Hoàng Thúy Hằng (2016), *Giá trị chẩn đoán của các kỹ thuật xét nghiệm phân trong việc xác định nhiễm giun móc ở học sinh cấp 1 huyện Củ Chi*, TP Hồ Chí Minh năm 2016, Luận văn thạc sĩ y học.
- [12] M. Papaïakovou (2018), "A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006130>.