

XÁC ĐỊNH LOÀI GIUN THỰC QUẢN GÂY BỆNH TRÊN CHÓ Ở VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

Nguyễn Văn Tuyên

Trường Cao đẳng Kinh tế - kỹ thuật Điện Biên

Email: tuyen43ty@gmail.com

TÓM TẮT

Nhằm xác định chính xác loài giun ký sinh thực quản ở chó nuôi tại Việt Nam, một nghiên cứu về chủ đề này đã được thực hiện trong năm 2020 - 2022. Kết quả nghiên cứu cho thấy loài giun ký sinh thực quản ở chó tại tỉnh Điện Biên đều thuộc giống *Spirocerca*, loài *Spirocerca lupi* Rudolphi, 1809. Trong bài báo này, lần đầu tiên loài giun ký sinh thực quản *Spirocerca lupi* ở chó ở Việt Nam được định loài bằng phương pháp sinh học phân tử, thông qua phân tích trình tự gen ty thể mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO1) và so sánh với kết quả giải trình tự gen này đã công bố trên Ngân hàng Gen (GenBank). Kết quả là đã xác định được trình tự DNA vùng gen ty thể mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO1) của loài giun ký sinh thực quản *Spirocerca lupi* với độ dài khoảng 500 bp (base pairs). Trình tự gen CO1 của *Spirocerca lupi* thu ở Điện Biên hoàn toàn tương đồng (100%) về di truyền và có quan hệ tiến hóa giống với các trình tự gen CO1 của *Spirocerca lupi* ở Trung Quốc và ở Israel.

Từ khóa: Ký sinh trùng, chó, giun thực quản, sinh học phân tử, *Spirocerca lupi* (*S. lupi*), Việt Nam.

Determining esophageal worm species caused disease in dogs in Viet Nam by molecular biology method

Nguyen Van Tuyen

SUMMARY

In order to identify accurately the esophageal parasite worm species in the farmed dogs in Viet Nam, a study on this topic was conducted in 2020 - 2022. The studied results showed that the esophageal parasite worm species in dogs in Dien Bien province belonged to the genus *Spirocerca*, species *Spirocerca lupi* Rudolphi, 1809. In this paper, for the first time, *Spirocerca lupi* parasitic worms in Viet Nam was identified by molecular biology methods, through sequence analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO1) and comparison with sequencing results of this gene published on GenBank. As a result, the mitochondrial genomic DNA sequence of cytochrome c oxidase subunit I (CO1) of *Spirocerca lupi* esophageal worms was identified with the length was about 500 bp. The similarity level of sequences of *Spirocerca* CO1 gene collected in Dien Bien was 100% on genetics and having evolutionary relations was similar to the CO1 gene sequences of *Spirocerca lupi* in China and Israel.

Keywords: Parasitology, dog, esophageal worms, molecular biology method, *Spirocerca lupi* (*S. lupi*), Viet Nam.

I. MỞ ĐẦU

Bệnh giun thực quản (spirocercosis) là bệnh do một loài giun tròn gây ra trên chó nhà, chó sói và cáo, có tên *Spirocerca lupi*. Bệnh phân bố chủ yếu ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới. Vòng đời của *Spirocerca lupi* có liên quan rất lớn đến loài côn trùng cánh cứng ăn phân súc vật, thuộc các giống *Scarabeus*, *Geotrupes* và *Copris*. Giun trưởng thành thường ký sinh ở dạ dày, thực quản,

thành động mạch chủ, tổ chức lâm ba, xoang ngực và phổi của các loài chó nhà, chó sói và cáo.

Các khảo sát gần đây cho thấy ngày càng có nhiều chó bị nhiễm giun tròn *Spirocerca* ở châu Phi, châu Mỹ, Tây Á và châu Âu [1-5].

Chó nhiễm *Spirocerca lupi* có biểu hiện nôn mửa, không ăn, gầy, khó nuốt, ợ hơi. Nếu ký sinh ở động mạch chủ, chó có biểu hiện khó thở, ngạt hơi, hôn mê và xuất huyết nội tạng. Nếu ký sinh

ở phổi, chó ho, khó thở, nôn mửa, đôi khi có triệu chứng thần kinh.

Phạm Sỹ Lăng, Phan Dịch Lân (2001) [6] cho biết: khi mắc bệnh do *Spirocerca lupi*, chó có triệu chứng rất khác nhau, phụ thuộc vào nơi khu trú của khối u. Đôi khi chó mắc bệnh có triệu chứng giả dại do độc tố *Spirocerca lupi* thấm vào máu con vật, vật chảy nhiều nước dãi, nôn mửa, rối loạn nuốt thức ăn, ho mạnh. Nếu khối u to có mũ có thể vỡ vào xoang ngực hoặc xoang bụng dẫn đến viêm màng phổi hoặc xoang bụng cấp. Khối u trong động mạch làm vỡ động mạch và con vật chết ngay tức khắc.

Thực tế cho thấy, thói quen nuôi chó thả tự do là một trong những yếu tố nguy cơ quan trọng làm cho bệnh ký sinh trùng nói chung và bệnh giun thực quản nói riêng rất dễ lây lan và phát tán nên khó kiểm soát [7, 8]. Do đó, xác định loài giun thực quản gây tác hại trên chó là công tác hết sức quan trọng trong việc phòng chống bệnh giun thực quản trên chó và bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu xác định loài *Spirocerca lupi* thu thập tại Việt Nam bằng phương pháp sinh học phân tử từ mẫu giun trưởng thành.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là giun thực quản trưởng thành được thu thập từ chó ở một số huyện, thành phố thuộc tỉnh Điện Biên qua phương pháp giết mổ. Chọn các mẫu giun còn nguyên vẹn, không bị đứt. Tất cả các mẫu giun trưởng thành phải được rửa sạch bằng nước muối sinh lý và bảo quản trong cồn 70% và lưu giữ lạnh ở - 20°C cho đến khi sử dụng.

Các cặp môi sử dụng trong kỹ thuật phân tử định danh giun tròn *Spirocerca lupi* được cung cấp bởi hãng Invitrogen.

2.2. Phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự gen

Mẫu giun tròn được rửa sạch bằng nước muối sinh lý, sau đó cố định trong cồn 100%. Nghiên cứu đã khuếch đại DNA của 4 mẫu giun tròn được

xác định là *Spirocerca lupi* bằng phương pháp định danh hình thái học.

Quy trình ly trích DNA và khuếch đại gen môi bằng phương pháp PCR của giun thực quản dựa theo quy trình Alicia Rojas và cs. (2017) [9].

Phân tích trình tự gen ty thể mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO1) của 4 mẫu giun tròn thu từ Điện Biên (ĐB1- ĐB4). Mẫu giun tròn được bảo quản trong cồn ethanol 100%. Tách chiết DNA tổng số bằng DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Nhân bản trình tự đích bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp môi Fw (5'-TCTTTGTTGGTGGAGGTGCT- 3') và Rv (5'-GACCCACACAGAAGTACCC-3'). Chu trình nhiệt bao gồm: biến tính ở 95°C trong 1 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ: 95°C/30 giây, 50°C/1 phút, 72°C/1 phút; chu kỳ cuối ở 72°C trong 5 phút. Điện di kiểm tra kết quả PCR trên gel agarose 1%, nhuộm ethidium bromide và soi đèn UV. Tinh khiết sản phẩm PCR bằng kit QIAquick PCR (Qiagen Inc., Hoa Kỳ). Giải trình tự trực tiếp bằng máy tự động ABI Prism 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem), sử dụng BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem). Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kích thước của sản phẩm. Sản phẩm PCR được ủ với enzyme cắt giới hạn đặc trưng, sản phẩm thu được sẽ được điện di trên agarose 1% có bổ sung ethidium bromide ở điện thế 80V trong 30 phút. Sản phẩm điện di được ghi lại bằng máy chụp hình gel.

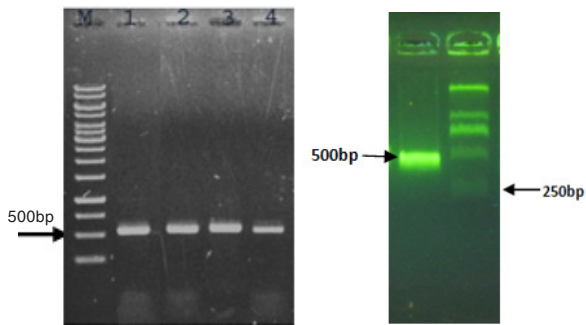
So sánh các trình tự mới phân tích và trình tự sẵn có trên GenBank bằng chương trình MEGA 6 [10], phân tích và vẽ cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Neighbor - Joining.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định danh giun thực quản trên chó bằng phương pháp sinh học phân tử

3.1.1. Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose

Sau khi thu thập được các mẫu giun tròn ký sinh ở thực quản chó nuôi tại tỉnh Điện Biên, chúng tôi đã tiến hành định danh các chủng giun thực quản bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả được trình bày ở hình 1.



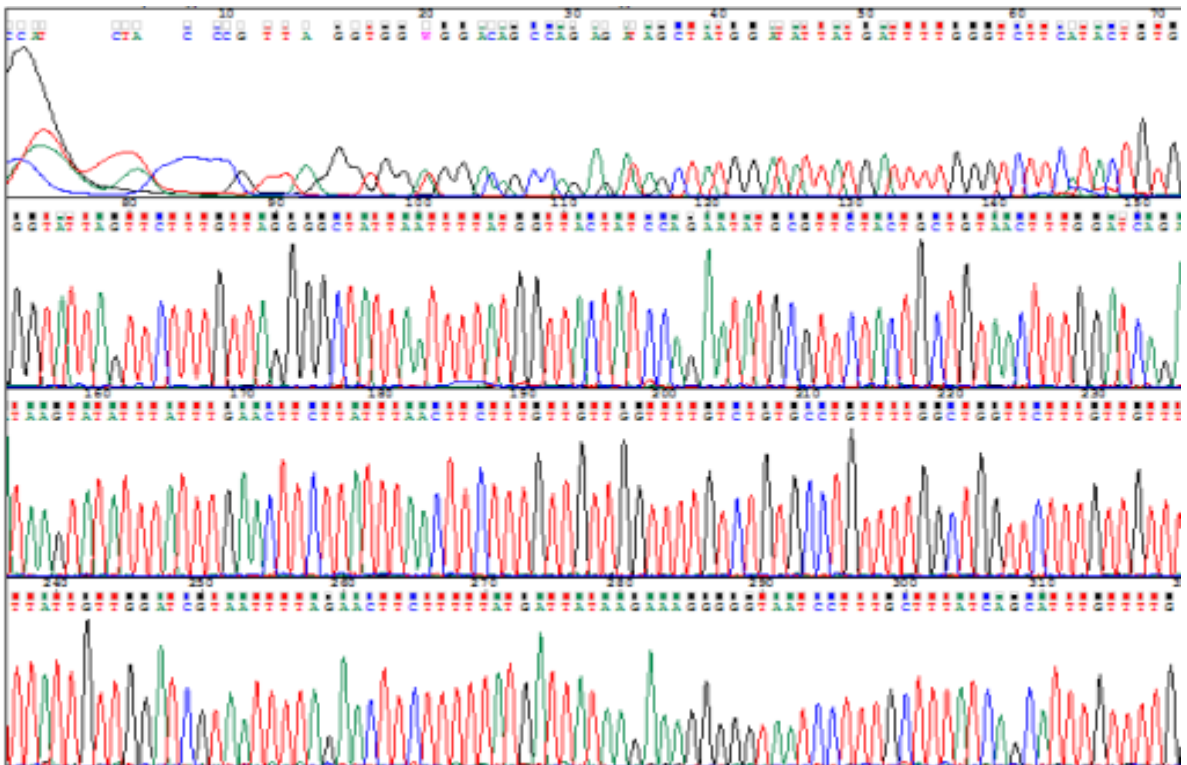
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR của loài giun thực quản trên gel agarose 1%

Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, chúng tôi đã giám định 4 mẫu giun thực quản đại diện cho các mẫu thu thập ở Điện Biên. DNA tổng số của các chủng trên sau khi tách được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR, thu nhận gen 18S ribosome với cặp mồi TEVF - TEVR, kích thước của đoạn gen 18S có độ dài khoảng 500 bp. Toàn bộ phân đoạn DNA nói trên đã được thu nhận bằng PCR tiêu chuẩn với bộ hoá chất PCR Master Mix Kit (Promega).

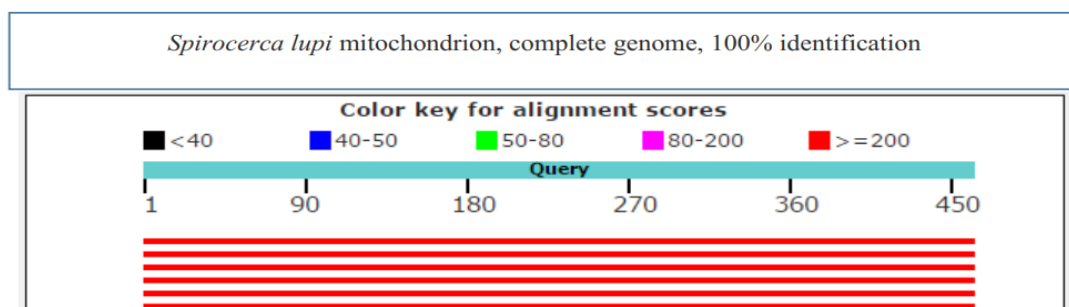
Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và soi phát hiện dưới ánh sáng tử ngoại. Kết quả ở hình 1 cho thấy, từ nguồn khuôn DNA của các mẫu *Spirocerca lupi* đã được tách chiết, thực hiện PCR thu nhận được sản phẩm gen nhân có độ dài khoảng 500 bp. Các sản phẩm PCR đều cho một băng DNA sáng rõ rệt, trên bản gel không có vạch phụ và độ dài khoảng 500 bp so với thang chuẩn, chứng tỏ các thành phần sử dụng trong phản ứng PCR, cặp mồi thiết kế đặc hiệu và chu trình nhiệt tối ưu, các mẫu đem phân tích đều đã được khuếch đại nhờ phản ứng PCR, chiếm 100% tổng số mẫu được giám định.

3.1.2. Giải mã trình tự nucleotide của giun thực quản và kết quả blast kiểm tra định danh trình tự nucleotide được giải mã trên Ngân hàng Gen

Nghiên cứu đã khuếch đại được đoạn gen CO1 và giải trình tự giun thực quản đã thu được các chuỗi nucleotide (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di Bazoni của mẫu DNA giám định



Hình 3. Kết quả blast trình tự nucleotide trên NCBI

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Perc. ident	Accession
Spirocerca lupi mitochondrion, complete genome	852	852	100%	0.0	100.00%	KC305876.1
Spirocerca lupi isolate P cytochrome oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	846	846	100%	0.0	99.78%	MH634009.1
Spirocerca lupi isolate N cytochrome oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	846	846	100%	0.0	99.78%	MH634007.1
Spirocerca lupi isolate Q cytochrome oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	841	841	100%	0.0	99.57%	MH634010.1

Hình 4. Danh sách các mã gen tương đồng với mẫu DNA phân tích đã đăng ký trên NCBI

Kết quả ở hình 3 và 4 cũng khẳng định, DNA của loài được giải trình tự là DNA của loài *Spirocerca lupi*. Sự tương đồng về trình tự DNA lên tới 100% so với DNA của loài này trên GenBank.

Kết luận: Loài giun tròn ký sinh ở thực quản và

gây bệnh trên chó tại Việt Nam là loài *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809), giống *Spirocerca* (Railliet et Henry, 1911), họ *Spiruridae* (Oerley, 1885), bộ *Spirurida* (Chitwood, 1933), lớp giun tròn *Nematoda* (Rudolphi, 1808).

Spirocerca lupi mitochondrion, complete genome
Sequence ID: [KC305876.1](#) Length: 13780 Number of Matches: 1

Range 1: 442 to 902 GenBank Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
852 bits(461)	0.0	461/461(100%)	0/461(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGACAGCCAGAGATAGCTATGGATATTATGATTTGGGCTTCATACTGTGGGTATTAGT	60		
Sbjct 442	GGACAGCCAGAGATAGCTATGGATATTATGATTTGGGCTTCATACTGTGGGTATTAGT	501		
Query 61	TCTTTGTTAGGGGCTATTAATTTTATGGTTACTATCCAGAAATATGCGTTCTACTGCTGTA	120		
Sbjct 502	TCTTTGTTAGGGGCTATTAATTTTATGGTTACTATCCAGAAATATGCGTTCTACTGCTGTA	561		
Query 121	ACTTTGGATCAGATAAGTATATTTTGAACCTCTTATTTAACTTCTttgttgggtt	180		
Sbjct 562	ACTTTGGATCAGATAAGTATATTTTGAACCTCTTATTTAACTTCTTTGTTGTTGGTT	621		
Query 181	ttgtctgtcctgttttggctggttctttgttgtttttattgttggATCGTAATTTTAGA	240		
Sbjct 622	TTGCTGTGCGCTGTTTGGCTGGTCTTTGTTGTTTTATTGTTGGATCGTAATTTTAGA	681		
Query 241	ACTTCTTTTTATGATTATAAGAAAGGGGGTAATCCTTTGCTTTATCAGCATTTGTTTTGG	300		
Sbjct 682	ACTTCTTTTTATGATTATAAGAAAGGGGGTAATCCTTTGCTTTATCAGCATTTGTTTTGG	741		
Query 301	TTTTTCGGGCATCCTGAGGTTTATATTATTTTGCCTGCTTTTGGTATTATTAGCGAG	360		
Sbjct 742	TTTTTCGGGCATCCTGAGGTTTATATTATTTTGCCTGCTTTTGGTATTATTAGCGAG	801		
Query 361	TGTGTTTTATTTTTAACTGATAAAGAGCGTTTGTGGTTCAGACTAGGATGATTTTGCT	420		
Sbjct 802	TGTGTTTTATTTTTAACTGATAAAGAGCGTTTGTGGTTCAGACTAGGATGATTTTGCT	861		
Query 421	TCAATTTGGATTGCTATTTTGGGTACTTCTGTGTGGGGTCA	461		
Sbjct 862	TCAATTTGGATTGCTATTTTGGGTACTTCTGTGTGGGGTCA	902		

Hình 5. Kết quả so sánh với dữ liệu gen của các loài sinh vật trên Ngân hàng Gen

Hiện nay, nhiều loài ký sinh trùng đã lần lượt được giải mã gen và đăng ký trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tạo cơ sở dữ liệu để có thể truy cập ứng dụng trong chẩn đoán, giám định và phân loại. Để làm sáng tỏ hơn về sự tương đồng của các trình tự, nghiên cứu tiến hành đối chiếu trình tự của nucleotide của đoạn gen CO1 thu được

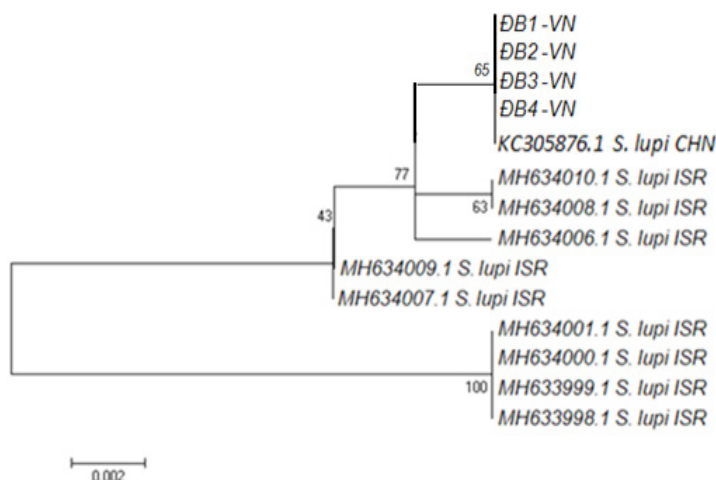
từ mẫu cùng đoạn gen này trong NCBI do Liu G. H và cs. công bố năm 2013 [11]. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, có 100% sự tương đồng trong kiểu gen của mẫu giun trong nghiên cứu so với mẫu giun đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen.

3.2. Mối quan hệ về loài *Spirocerca lupi* trên chó của Việt Nam và thế giới

Bảng 1. Khoảng cách di truyền giữa các quần thể khác nhau của loài *Spirocerca lupi* và các loài khác (dựa trên phân tích trình tự gen CO1)

1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	KC305876.1_ <i>S. lupi</i> CHN	0.000									
3	MH634010.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.004	0.004								
4	MH634009.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.004	0.004	0.004							
5	MH634008.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.004	0.004	0.000	0.004						
6	MH634007.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.004	0.004	0.004	0.000	0.004					
7	MH634006.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004				
8	MH634001.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.026	0.026	0.026	0.022	0.026	0.022	0.026			
9	MH634000.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.026	0.026	0.026	0.022	0.026	0.022	0.026	0.000		
10	MH633999.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.026	0.026	0.026	0.022	0.026	0.022	0.026	0.000	0.000	
11	MH633998.1_ <i>S. lupi</i> ISR	0.026	0.026	0.026	0.022	0.026	0.022	0.026	0.000	0.000	0.000

Ghi chú: 1. KC305876.1_ *S. lupi* CHN -Trung Quốc, 2. MH634010.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 3. MH634009.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 4. MH634008.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 5. MH634007.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 6. MH634006.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 7. MH634001.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 8. MH634000.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 9. MH633999.1_ *S. lupi* ISR-Israel, 10. MH633998.1_ *S. lupi* ISR-Israel



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại của loài *Spirocerca lupi* được xây dựng từ bộ số liệu trình tự gen CO1 theo phương pháp Neighbor - Joining

Kết quả giải trình tự gen CO1 của 4 mẫu thu từ Điện Biên (ĐB1 - ĐB4), đã thu được 4 trình tự gen CO1. Kết quả so sánh cho thấy tất cả các trình tự này hoàn toàn tương đồng với nhau (100%). Đối chiếu với các trình tự trên GenBank bằng chương trình BLAST đã xác định các trình tự này 100% tương đồng với loài *Spirocerca lupi*. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ bộ dữ liệu trình tự gen CO1 bằng phương pháp Neighbour - Joining cho thấy các trình tự gen CO1 của *Spirocerca lupi* thu ở Việt Nam hoàn toàn tương đồng (100%) với các trình tự của loài này ở Trung Quốc và nhóm thành một nhóm, rất gần với các trình tự của Israel. Điều đó phù hợp với khoảng cách địa lý gần của các quần thể này. Vì vậy, các trình tự này có ý nghĩa trong việc định loại các loài giun thực quản chó. Kỹ thuật phân tử cần được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo về dịch tễ học bệnh lý phân tử và xác định xem loài *Spirocerca lupi* có ký sinh ở chó tại các khu vực khác ở Việt Nam hay không.

IV. KẾT LUẬN

Lần đầu tiên loài giun thực quản *Spirocerca lupi* ở Việt Nam được xác định bằng phương pháp sinh học phân tử, thông qua phân tích trình tự gen ty thể mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO1) và so sánh kết quả giải trình tự với dữ liệu đã công bố trên Ngân hàng Gen, chúng tôi đã xác định được trình tự nucleotide cho 4 mẫu giun thực quản *Spirocerca lupi* ký sinh ở chó. Kết quả xác định được trình tự DNA vùng gen ty thể mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO1) của loài giun thực quản *Spirocerca lupi* là 500 bp. Trình tự gen CO1 của *Spirocerca lupi* thu ở Điện Biên hoàn toàn tương đồng (100%) về di truyền và có quan hệ tiến hóa giống với các trình tự của loài này ở Trung Quốc và rất gần với các trình tự của Israel.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dhandapani K., Sumathi K., Ponnuswamy K. K., Chellapandian M., Palanisammi T. A. A., 2021. A survey on the gastrointestinal parasitic infection in Chippiparai dogs in Tamil Nadu, India. *Indian J. Vet. Med.*, 41(1), pp. 58 - 60.
2. Enriquez G. F., Macchiaverna N. P., Argibay H. D., Arias L. L., Farber M., Gürtler R. E., Garbossa G., 2019. Polyparasitism and zoonotic parasites in dogs from a rural area of the Argentine Chaco. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 16, 100287.
3. Ferrantelli V., Riili S., Vicari D., Percipalle M., Chetta M., Monteverde V., Poglayen G., 2010. *Spirocerca lupi* isolated from gastric lesions in foxes (*Vulpes vulpes*) in Sicily (Italy). *Polish journal of veterinary sciences*, 13(3), pp. 465 - 471.
4. Nonaka N., Nakamura S., Inoue T., Oku Y., Katakura K., Matsumoto J., Phiri I., 2011. Coprological survey of alimentary tract parasites in dogs from Zambia and evaluation of a coproantigen assay for canine echinococcosis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 105(7), pp. 521 - 531.
5. Porras-Silesky C., Mejias-Alpizar M. J., Mora J., Baneth G. & Rojas A., 2021. *Spirocerca lupi* Proteomics and Its Role in Cancer Development: An Overview of Spirocercosis-Induced Sarcomas and Revision of Helminth-Induced Carcinomas. *Pathogens*, 10(2), 124.
6. Phạm Sỹ Lăng, Phan Dịch Lân, 2001. *Bệnh ký sinh trùng ở gia súc và biện pháp phòng trị*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 2001.
7. Tylkowska A., Pilarczyk B., Gregorczyk A., Templin E., 2010. Gastrointestinal helminths of dogs in Western Pomerania, Poland. *Wiadomości Parazytologiczne*, 56 (3), pp. 269-276.
8. Abdi J., Asadolahi K., Maleki M. H., Ashrafi Hafez A., 2013. Prevalence of Helminthes Infection of Stray Dogs in Ilam Province. *J. Paramed Sci.*, 4, pp. 47 - 50.
9. Alicia Rojas, Gilad Segev, Alex Markovics, Itamar Aroch, Gad Baneth, 2017. Detection and quantification of *Spirocerca lupi* by HRM qPCR in fecal samples from dogs with spirocercosis. *Parasites & Vectors*, 10, pp. 435.
10. Tamura K., Stecher., Peterson D., Filipowski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, pp. 2725 - 2729.
11. Liu G. H., Wang Y., Song H. Q., Li M. W., Ai L., Yu X. L., Zhu X. Q., 2013. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Spirocerca lupi*: sequence, gene organization and phylogenetic implications. *Parasites & Vectors*, 6, pp. 45.

Ngày nhận: 18-4-2024

Ngày phản biện: 20-6-2024

Ngày đăng: 1-12-2024