PHÁT HIỆN GENOTYPE NHÓM E CỦA *GIARDIA DUODENALIS* TRÊN BÒ TẠI TỈNH ĐẮC LẮC VÀ KHÁNH HÒA BẰNG KỸ THUẬT PCR VÀ GIẢI TRÌNH TỰ

Nguyễn Thị Sâm[1], *Nguyễn Đức Tân*[1], *Yasuhiro Fukuda*[3], *Lê Đức Quyết*[1], *Nguyễn Văn Thoại*[1], *Lê Hứa Ngọc Lực*[1], *Huỳnh Vũ Vỹ*[1], *Nguyễn Quốc Hiếu*[2]

TÓM TẮT

Bệnh do đơn bào *Giardia duodenalis* trên bò là khá phổ biến tại Việt Nam, nhưng các nghiên cứu dịch tễ học và định danh geneotype của trùng đơn bào này hầu như chưa có công bố. Trong nghiên cứu này, 412 mẫu phân bò dưới 6 tháng tuổi, thu thập tại Đắc Lắc và Khánh Hòa, đã được kiểm tra tìm kén (cyst) của *G. duodenalis* bằng phương pháp phù nổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ lưu hành của ký sinh trùng theo trại chăn nuôi và trên quần thể gia súc điều tra lần lượt là 42,2% (42/99) và 13,8% (57/412). Phân tích trình tự các gene β-giardin và triosephosphate isomerase của các chủng thu thập bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự, đã phát hiện geneotype nhóm E với các subtype E3 và E11 có mức tương đồng là 99-100% so với các chủng tham khảo từ GenBank. Đây là lần đầu tiên, geneotype nhóm E của đơn bào *G. duodenalis* được tìm thấy trên bò thịt ở Việt Nam.

Từ khóa: Giardia duodenalis, Bò, PCR, Giải trình tự , Tỉnh Đắc Lắc và Khánh Hòa

Detection of *Giardia duodenalis* geneotype/assemblage E in calves from Dac Lac and Khanh Hoa provinces by using PCR and sequencing techniques

Nguyen Thi Sam, Nguyen Duc Tan, Yasuhiro Fukuda, Le Duc Quyet, Nguyen Van Thoai, Le Hua Ngoc Luc, Huynh Vu Vy, Nguyen Quoc Hieu

SUMMARY

There are very few information available on epidemiology of *Giardia duodenalis* in cattle in Viet Nam. The objective of this study aimed at determining the prevalence and geneotype of *G. duodenalis* in the local calves, which was younger than 6 months old. A total of 412 calf fecal samples, were randomly collected from 99 small-scale farms in Dac Lac and Khanh Hoa provinces for screening *G. duodenalis* cysts by the zinc-sulphate flotation method. The studied result showed that the prevalence of this parasite in the investigated farms and herds were 13.8% (57/412) and 42.4% (42/99), respectively. Molecular analysis result of the β-giardin and triosephosphate isomerase genees of the isolated parasite strains by PCR technique showed that geneotype group E and subtype E3 and E11 of *Giardia duodenalis* were identified with similarity level of 99-100% in comparison with those from GenBank. This is the first detection of *Giardia duodenalis* geneotype in cattle in Viet Nam.

Keywords: Giardia duodenalis, Calves, PCR, Sequencing, Dac Lac and Khanh Hoa provinces

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giardiosis là bệnh do đơn bào đường ruột *Giardia* gây nên. Động vật nhiễm bệnh thường có những biểu hiện như: tiêu chảy ở các mức độ khác nhau, rối loạn tiêu hóa, suy nhược kéo dài, thể trạng sút kém, giảm tăng trọng so với những con bình thường. Triệu chứng lâm sàng ở con non biểu hiện nặng và kéo dài hơn ở những con

1. Phân viện Thú y miền Trung
2. Trường Đại học Tây Nguyên
3. Trường Đại học Tohoku, Nhật Bản

trưởng thành (Geurden và cs, 2008). *Giardia* ký sinh ở người và nhiều loài vật nuôi, không chỉ gây thiệt hại về kinh tế mà còn ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Ước tính có khoảng 200 triệu người trên thế giới nhiễm *Giardia*, nhất là ở các nước châu Á, châu Phi và châu Mỹ La tinh (Savioli và cs, 2006). *G. duodenalis* được cho là ký sinh trùng bị quên lãng, nhất là ở các nước đang phát triển (Savioli và cs, 2006).

Về phân loại, cho đến nay, có sáu loài *Giardia* đã được mô tả, chủ yếu dựa trên tính đặc hiệu vật chủ và mô tả hình thái học của ký sinh trùng. Trong số đó, chỉ có loài *G. duodenalis* (tên gọi khác: *G. intestinalis*, *G. lamblia*) có khả năng lây nhiễm từ động vật sang người và được nghiên cứu rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Nghiên cứu gần đây cho thấy, *G. duodenalis* là một phức hợp loài, bao gồm nhiều nhóm khác nhau về cấu trúc phân tử, nhưng giống nhau về hình thái học. Hiện nay, có 8 nhóm nội loài của *G. duodenalis* (A đến H) đã được xác định, dựa trên đặc điểm hệ gene và tính đặc hiệu vật chủ. Trong đó, nhóm A và B có khả năng gây bệnh cho nhiều loài động vật như bò, dê, cừu, lợn, chó, mèo. Ngoài ra chúng cũng được tìm thấy trên người, vì vậy chúng được xếp vào nhóm ký sinh trùng truyền lây từ động vật sang người (Savioli và cs, 2006). Nhóm E chủ yếu được phát hiện ở động vật móng guốc như bò, dê, cừu, lợn, hươu và tương đối thích nghi với vật chủ.

Trong lĩnh vực thú y, cho đến nay, chỉ có một khảo sát duy nhất được thực hiện bởi Geurden và cs (2008) thông báo tỷ lệ nhiễm *Giardia* lên tới 50% ở bê sữa nuôi tại vùng lân cận Hà Nội, miền Bắc Việt Nam, và xác định geneotype nhóm A và E là tác nhân gây bệnh trên đàn bò điều tra. Ở miền Trung Việt Nam, chăn nuôi bò là nghề nông nghiệp có tính truyền thống, với tổng đàn bò hiện nay lên tới 2,62 triệu con, chiếm gần một nửa tổng đàn cả nước. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu nào về *Giardia* ký sinh ở bò nuôi tại khu vực này, mặc dù ngành chăn nuôi bò ở đây đang được xúc tiến ngày càng tăng.

Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm điều tra tình hình nhiễm *G. duodenalis* trên bò thịt ở các tỉnh Đắc Lắc và Khánh Hòa, và xác định geneotype gây bệnh bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gene β-giardin (*bg)* và triosephosphate isomerase (*tpi*) của ký sinh trùng. Những thông tin này sẽ góp phần xây dựng chương trình kiểm soát và phòng chống bệnh ở vật nuôi hiệu quả hơn.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Điều tra tình hình nhiễm *G. duodenalis* trên bò thịt ở các tỉnh Đắc Lắc và Khánh Hòa

- Xác định geneotype gây bệnh bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gene *bg* và *tpi.*

2.2. Nguyên vật liệu

- Bê thịt < 6 tháng tuổi nuôi tại Khánh Hòa và Đắc Lắc

- Mẫu đơn bào *G. duodenalis* phân lập từ bê.

- Trang thiết bị phòng thí nghiệm như máy chạy PCR, bộ điện di kiểm tra sản phẩm PCR, máy đọc Gel, Waterbath,Vortex, máy li tâm, cân phân tích, lò vi sóng...

- Các loại hóa chất và sinh phẩm cần thiết dùng trong sinh học phân tử: Kit chiết tách DNA (Favorgene Biotech Corporation, Taiwan), Kít tinh sạch sản phẩm PCR (QIAquick PCR Purification Kit), Taq PCR Master Mix Kit, Agarose, DNA ladder, Primers, TBE buffer, Ethidium bromide...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Xét nghiệm phân tìm đơn bào *G. duodenalis* bằng phương pháp phù nổi sử dụng dung dịch zinc-sulphate ($ZnSO_4$) bão hòa. (Tỷ trọng dung dịch là 1,18).

- Chiết tách DNA từ các mẫu bằng Kit chiết tách Qiagene (The QIAamp DNA Stool mini Kit, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Phản ứng PCR khuếch đại các gene *bg* và *tpi* được thực hiện theo quy trình đã công bố trước đây (Lalle et al., 2005, Sulaiman et al., 2003).

- Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ Kit tinh sạch sản phẩm PCR (QIAquick PCR Purification Kit) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Trình tự nucleotide của các gene *bg* và *tpi* được giải mã tại Phòng thí nghiệm Sinh học môi trường bền vững, Đại học Tohoku, Nhật Bản, trên máy ABI PRISM Model 3100. Chuỗi nuleotide được sắp xếp, chỉnh lề bằng phần mềm BioEdit và so sánh với các chủng khác trong ngân hàng gene bằng chương trình Blast *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)*. Cây phả hệ được tạo ra bằng phần mềm Mega 5.2.

- Xử lý số liệu nghiên cứu bằng phương pháp thống kê sinh vật học (Chi-test và Fisher's Exact test).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1.Tình hình nhiễm đơn bào *G. duodenalis* trên bê nuôi tại Khánh Hòa và Đắc Lắc

Bảng 1. Tỷ lệ nhiễm đơn bào *G. duodenalis* trên bê nuôi tại Khánh Hòa và Đắc Lắc

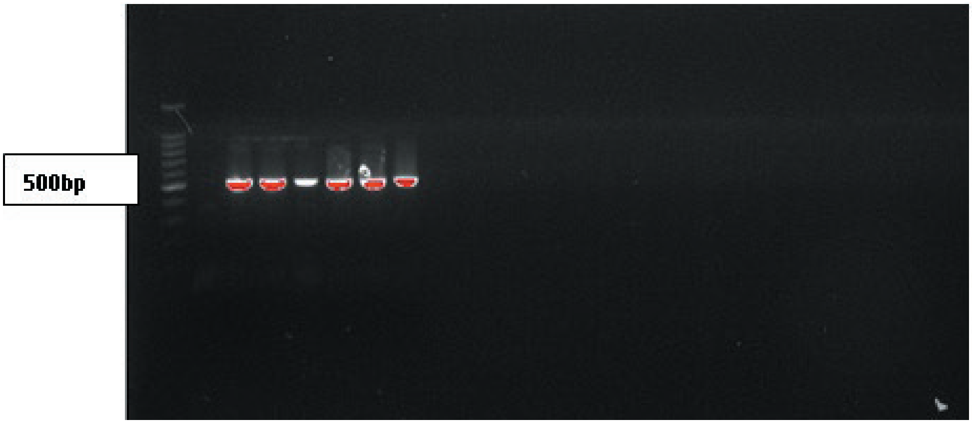
Tỉnh	Số đàn dương tính	Số đàn kiểm tra (%)	Số con dương tính	Số con kiểm tra (%)
Khánh Hòa	15	40 (37,5)	16	95 (16,8)
Đắc Lắc	27	59 (45,7)	41	317 (12,9)
Tổng cộng	**42**	**99 (42,4)**	**57**	**412 (13,8)**

Kết quả bảng 1 cho thấy, qua kiểm tra 412 bê thịt dưới 6 tháng tuổi thuộc 99 đàn khác nhau tại Khánh Hòa và Đắc Lắc, đã xác định 57 bê thuộc 42 đàn nhiễm đơn bào *G. duodenalis*. Tỷ lệ lưu hành của ký sinh trùng ở các trại chăn nuôi và trên quần thể gia súc điều tra lần lượt là 42,4% (95% CI=33,2-52,3%) (42/99) và 13,8% (95% CI=10,8-17,5%) (57/412). Như vậy tỷ lệ nhiễm đơn bào *G. duodenalis* trên bò khá cao, và không khác nhau giữa các địa phương nghiên cứu ($p > 0,05$). Theo Feng và cs (2008), đơn bào *G. duodenalis* thải cyst ra môi trường không liên tục, nhưng việc thu mẫu chỉ tiến hành một lần, do vậy tỷ lệ nhiễm ở các điều tra cắt ngang thường thấp hơn tỷ lệ nhiễm thực tế. Tuy nhiên, tỷ lệ 13,8% cao hơn 2,9% và 6% phát hiện trên bò thịt ở Trung Quốc (Liu và cs, 2015; Qi và cs, 2015) sử dụng phương pháp phù nổi, nhưng thấp hơn nhiều so với tỷ lệ nhiễm ghi nhận ở những quốc gia khác: Mỹ (33,5%, Santin và cs, 2012), Canada (72%, Dixon và cs, 2011) sử dụng phương pháp PCR. Theo nhiều tác giả, phương pháp PCR có độ nhạy cao nhất trong số các phương pháp phát hiện *Giardia*, dẫn đến sự khác nhau về tỷ lệ nhiễm giữa các nghiên cứu.

3.2. Kết quả xác định sự hiện diện của đơn bào *G. duodenalis* bằng phản ứng PCR

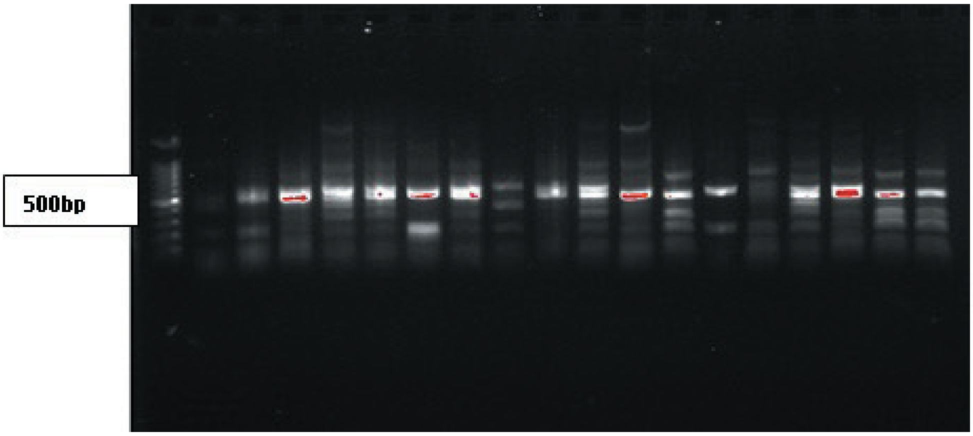
Mẫu ADN được chiết tách từ các chủng đơn bào *G. duodenalis*, các đoạn gene *bg* và *tpi* được khuếch đại dựa trên trình tự mồi và chu kỳ nhiệt tham khảo từ các công bố trước đây (Lalle và cs, 2005; Sulaiman và cs, 2003). Với chu trình này, 25 trong số 57 mẫu DNA đã được khuếch đại thành công với gene *bg*. Kết quả điện di trên gel agarose 1.2% xuất hiện một band duy nhất và ổn định, không có sản phẩm không đặc hiệu, chứng tỏ cặp mồi sử dụng có tính chính xác cao. Nồng độ sản phẩm khá đồng nhất (Hình 1). Các mẫu DNA còn lại không thể khuếch đại, có lẽ là do lượng DNA trong mẫu chưa đủ, hoặc do lỗi trong quá trình chiết tách DNA không thu được DNA.

Trong số 57 mẫu DNA có 15 mẫu khuếch đại thành công với gene *tpi*, với sản phẩm PCR tương đối riêng biệt (Hình 2). Các mẫu còn lại không thể khuếch đại, có lẽ do nồng độ DNA trong mẫu ít, do đó lượng DNA thấp hơn giới hạn phát hiện của quy trình PCR. Kết quả này chứng tỏ quy trình phản ứng, tuy đã khuếch đại được đoạn gene *tpi*, tuy nhiên tỷ lệ thành công thấp hơn so với gene *bg*. Mặc dù vậy, do tính đa dạng di truyền, gene *tpi* là một chỉ thị di truyền có giá trị trong giám định và phân loại subtype của ký sinh trùng (Sulaiman và cs, 2003).



Hình 1. Sản phẩm PCR sau quá trình điện di của gene β-giardin

Ghi chú: M: 100 bp marker . Giếng (N): đối chứng âm. Các giếng 1 đến 6: mẫu DNA chiết tách từ đơn bào G. duodenalis



Hình 2. Sản phẩm PCR sau quá trình điện di của gene triosephosphate isomerase

Ghi chú: M: 100 bp marker . Giếng (N): đối chứng âm. Các giếng 1 đến 17: mẫu DNA chiết tách từ đơn bào G. duodenalis.

3.3. Kết quả phân tích trình tự gene

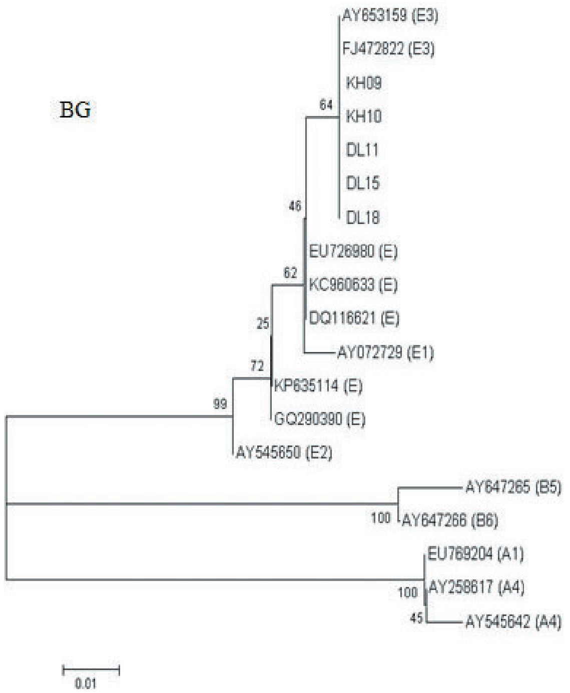
Chuỗi nucleotide của gene *bg* và *tpi* thu được có độ dài xấp xỉ 500 và 510 *bp* (tương ứng). Kết quả phân tích bằng chương trình Blast cho thấy, đối với gene *bg*, các chủng đơn bào từ bê thịt nuôi tại Khánh Hòa và Đắc Lắc là

G. duodenalis assemblage E, thuộc subtype E3 với độ tương đồng 100% về trình tự nucleotide, so với các chủng *G. duodenalis* assemblage E subtype E3 truy cập từ GenBank có nguồn gốc từ bê sữa ở Ý (Lalle và cs, 2005, mã số truy cập AY653159), Ấn Độ (Khan và cs, 2011, mã số truy cập GQ29039). Mười trình tự nucleotide của gene *tpi* bộc lộ 100% độ tương đồng với *G. duodenalis* assemblage E, subtype E11 có nguồn gốc từ bò sữa ở Mỹ (Feng và cs, 2008, mã số truy cập EF654692), 5 chủng còn lại biểu thị sự sai khác một nucleotide ở vị trí 131 (G thay thế cho A) so với chủng EF654692. Đây là lần đầu tiên *G. duodenalis* assemblage E được phát hiện trên bò thịt ở Việt Nam. Cho đến nay, ký sinh trùng này đã được phát hiện ở bò, dê, cừu, lợn ở nhiều nước trên thế giới. Mặc dù chúng có mối quan hệ di truyền gần gũi với assemblage A, một geneotype có khả năng gây bệnh cho người, assemblage E được xem là tương đối thích nghi với vật chủ và ít có khả năng truyền bệnh từ động vật sang người. Nghiên cứu về *G. duodenalis* ở nhiều nước trên thế giới cho thấy, assemblage E là loài phổ biến nhất, chiếm 80-100% trong số các chủng nghiên cứu (Santin và cs, 2012; Dixon và cs, 2011), trong khi assemblage A và/hoặc B lưu hành ít phổ biến hơn. Một số tác giả chỉ tìm thấy assemblage E trong quần thể bò điều tra (Dixon và cs, 2011; Qi và cs, 2015). Tương tự, trong nghiên cứu này, chỉ có geneotype nhóm E được phát hiện trong khi geneotype nhóm A và B chưa được tìm thấy. Điều này không gây ngạc nhiên, vì các nghiên cứu trước đây đã chứng tỏ rằng geneotype nhóm A và B (có khả năng gây bệnh cho người) lưu hành ở bò sữa phổ biến hơn so với bò thịt, do bò sữa có cơ hội tiếp xúc với con người nhiều hơn. Việc phát hiện duy nhất geneotype nhóm E trên bò thịt ở Khánh Hòa và Đắc Lắc chứng tỏ rằng, có thể chỉ có một con đường truyền bệnh duy nhất ở vùng nghiên cứu là từ gia súc này sang gia súc khác.

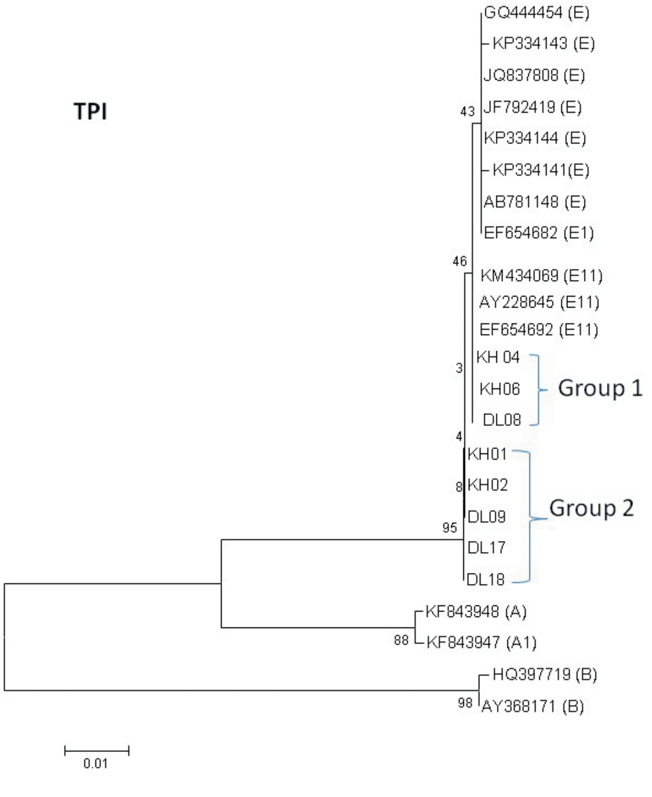
Trong nghiên cứu này, kết quả định danh subtype của *G. duodenalis* ở gene *bg* là E3, trong khi ở gene *tpi* là E11. Sự không thống nhất trong định danh subtype bởi các gene khác nhau đã được miêu tả bởi một số tác giả (Santin và cs, 2012). Theo các tác giả này, nguyên nhân của hiện tượng có thể là kết quả của quá trình tái tổ hợp, hoặc do nhiễm ghép của các subtype khác nhau trên cùng một cá thể.

3.4. Vị trí phân loại đơn bào *G. duodenalis* ký sinh trên bò ở tỉnh Khánh Hòa và Đắc Lắc

Phân tích di truyền qua cây phả hệ của gene *bg* và gene *tpi* (hình 3 và hình 4) cho thấy, các chủng đơn bào phân lập từ bê nuôi tại Khánh Hòa và Đắc Lắc được xếp cùng vị trí phân loại của các geneotype nhóm E. Đối với gene *bg*, các chủng này có độ tương đồng 100% so với E3, một subtype chiếm tỷ lệ lớn trong geneotype E. Đối với gene *tpi*, một số chủng có độ tương đồng 100% so với E11, các chủng còn lại có sự sai khác 1 nucleotide ở vị trí 131 so với chủng chuẩn (EF654692).



Hình 3. Cây phả hệ của các chủng đơn bào G. duodenalis ở hai tỉnh Khánh Hòa, Đắc Lắc và các chủng G. duodenalis trên thế giới dựa trên chỉ thị bg



Hình 4. Cây phả hệ của các chủng đơn bào G. duodenalis ở hai tỉnh Khánh Hòa, Đắc Lắc, và các chủng G. duodenalis trên thế giới dựa trên chỉ thị tpi

IV. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ lưu hành của đơn bào *G. duodenalis* trên bê ở hai tỉnh Khánh Hòa, Đắc Lắc theo trại chăn nuôi là 42,2% và theo số lượng gia súc là 13.8%.

- Phân tích trình tự gene *bg* và *tpi* bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự, phát hiện duy nhất geneotype nhóm E trên đàn bò điều tra, với các subtype E3 và E11 tương đồng 99-100% so với các chủng tham khảo từ GenBank.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.05-2014.10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar K, Pollari F, Kelton D, Farber J, 2011. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol 175: 20-26*
2. Feng Y, Ortega Y, Cama V, Terrel J, Xiao L, 2008. High intrageneotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol Res 103: 87-92*
3. Geurden T, Somers R, Thanh NT, Vien LV, Nga VT, Giang HH, Dorny P, Giao HK, Vercruysse J, 2008. Parasitic infections in dairy cattle around Hanoi, Northern Vietnam. *Vet Parasitol 153: 384-388*
4. Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S, 2011. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol 178: 342-345*
5. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM, 2005. Genetic heterogeneeity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic su*bg*eneotypes. *Int J Parasitol 35: 207-213*
6. Liu G, Su Y, Zhou M, Zhao J, Zhang T, Ahmad W, Lu H, Jiang N, Chen Q, Xiang M, Yin J, 2015. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* isolates from dairy cattle in Northeast China. *Exp Parasitol 154: 20-24*
7. Qi M, Cai J, Wang R, Li J, Jian F, Huang J, Zhou H, Zhang L, 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from yaks in the central western region of China. *BMC Microbiol 15: 108*
8. Santin M, Dargatz D, Fayer R, 2012. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Vet Parasitol* 183: 231-236.
9. Savioli L, Smith H, Thompson A, 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Disease Initiative". *Trends in Parasitology 22: 203-208.*
10. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L, 2003. Triosephosphate isomerase genee characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis 9: 1444-1452*

Nhận ngày 13-3-2016
Phản biện ngày 30-5-2016