

# GIÁM ĐỊNH LOÀI GIUN ĐŨA CHÓ *TOXOCARA CANIS* Ở VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

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

## TÓM TẮT

Bệnh giun đũa ở chó do *Toxocara canis* gây ra là bệnh truyền lây từ động vật sang người. Đoạn gen ty thể *atp6* (598 bp) và gen nhân ITS2 (333 bp) của 14 chủng *Toxocara* sp đã thu thập được từ chó nuôi ở huyện Thường Tín và Thanh Oai, Hà Nội. Kết quả phân tích giải trình tự, mức tương đồng về nucleotide của 2 đoạn gen *atp6* và ITS2 của 14 chủng *Toxocara* sp. nêu trên so với trình tự nucleotide của các đoạn gen tương ứng của các loài giun đũa khác đã được xác định. Cụ thể là: đối chiếu với loài *Toxocara canis* thì tỷ lệ tương đồng giữa 2 đoạn gen *atp6*, ITS2 và các đoạn gen tương ứng là (98,2-99,7% và 95,6 -100%); với loài *T. cati*, thì tỷ lệ này là 88,5-89,1% và 76,7-79,7%); với loài *T. malaysiensis* thì tỷ lệ này là 86,8-87,5% và 79,3-81,9%) và với loài *T. vitulorum*, thì tỷ lệ này là 83,2-88,1% và 80,2-80,6%.

Phân tích phả hệ dựa trên chỉ thị gen *atp6* và ITS2 cho thấy có 5 nhóm giun đũa riêng biệt, trong đó nhóm *T. canis* gồm có các chủng *Toxocara* sp trên chó của Việt Nam và các chủng tham chiếu thuộc loài *T. canis*; 4 nhóm còn lại là các nhóm của các loài *T. cati*, *T. malaysiensis*, *T. vitulorum* và *Toxascaris leonina* (nhóm ngoại hợp), tách biệt hoàn toàn với nhóm *T. canis*. Như vậy, 14 chủng *Toxocara* trên chó của Việt Nam được xác định thuộc loài *T. canis*. Kết quả nghiên cứu này đã cung cấp thêm hiểu biết về loài giun đũa gây bệnh trên chó ở Việt Nam, giúp cho việc giám sát dịch tễ học trong cộng đồng đối với bệnh của động vật truyền lây sang người này tại Việt Nam.

Từ khóa: Chó, *Toxocara canis*, Phân loại, PCR, Gen ty thể *atp6*, Gen nhân ITS2, Phả hệ.

## Clarification of *Toxocara canis* in dog in Viet Nam by molecular biology method

Nguyen Thi Lan Anh, Do Thi Thu Thuy,  
Nguyen Thi Khue, Nguyen Thi Bích Nga, Le Thanh Hoa

## SUMMARY

*Toxocara canis* species causing toxocarasis in dog is a zoonosis. Mitochondrial gene segment-*atp6* (598 bp) and nuclear gene segment-ITS2 (333 bp) of 14 *Toxocara* sp strains were obtained from the raising dogs in Thuong Tin and Thanh Oai districts, Ha Noi city. The result of comparison on similarity level between the above *atp6* and ITS2 nucleotide sequences of *Toxocara* sp in dogs of Viet Nam and those of other *Toxocara* species was determined. The details were as follows: when comparing with *T. cati* species, the similarity rate between the 2 above gene segments (*atp6*, ITS2) and the respective gene segments of this species was 98.2-99.7% and 95.6%-100%; similarly, this rate was 88.5%-89.1% and 76.7%-79.7% when comparing with *T. malaysiensis* species; and 83.2-88.1% and 80.2%-80.6% when comparing with *T.vitulorum* species.

Phylogenetic analysis basing on the genetic markers of *atp6* and ITS2 genes indicated that there were 5 distinct *Toxocara* groups. Of which, the *T. canis* group included the *Toxocara* sp group in dogs of Viet Nam and the reference *T. canis* strains; The 4 other remaining groups including *T. cati*, *T. malaysiensis*, *T. vitulorum*, and *Toxascaris leonina* (outside groups) were completely different from the *T. canis* group. Thus, 14 *Toxocara* strains in dogs in Viet Nam in this study were identified to belong to *T. canis* species. The result of this study provided further understandings for the *Toxocara* species in dogs. It is a basis for epidemiological surveillance of this zoonotic toxocarasis in the community in Viet Nam.

Keywords: Dog, *Toxocara canis*, Classification, PCR, Mitochondrial gene-*atp6*, Nuclear gene-ITS2, Phylogeny.

<sup>1</sup> Viện Thú y

<sup>2</sup> Viện Công nghệ sinh học

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Toxocara canis* là loài chính gây bệnh giun đũa chó (Toxocariasis). Đây là bệnh truyền lây từ động vật sang người và được báo cáo xuất hiện ở mọi quốc gia trên thế giới (Macpherson, 2013).

Tỷ lệ nhiễm giun đũa trên chó có thể lên tới trên 40% (Habluetzel và ctv, 2003). Trứng giun được thải ra ngoài gây nhiễm môi trường và nguy cơ lây nhiễm sang người (Dado và ctv, 2012), nhất là khi số lượng chó nuôi trong cộng đồng ngày càng nhiều như hiện nay.

Việc chẩn đoán giun đũa ở chó chủ yếu dựa vào việc nhận dạng trứng và giun trưởng thành. Mặc dù vậy, chó có thể nhiễm cùng một lúc 2 loài giun đũa *T. canis* và *T. cati* (Antolova và ctv, 2004), hoặc *T. canis* và *Toxascaris leonina* (Nguyễn và ctv, 2012) mà việc định loại trứng của các loài giun đũa này bằng hình thái học là rất khó khăn (Uga và ctv, 2000). Chính vì vậy, phương pháp sinh học phân tử dựa vào PCR đã được áp dụng giúp định loại chính xác loài

giun đũa nhiễm với các chi thị phân tử có thể là rDNA của hệ gen nhân hoặc có nguồn gốc từ hệ gen ty thể (Li và ctv, 2007; Gasser, 2013).

Ở người, một trường hợp bị nhiễm ấu trùng giun đũa chó và ký sinh ở mắt được xác định là do *T. canis* gây ra bằng chi thị phân tử (De và ctv, 2014). Tuy nhiên, quần thể *Toxocara* spp trên chó hoàn toàn chưa được giám định phân tử và liệu có đúng là do loài *T. canis* gây ra hay không? Một nghiên cứu gần đây tại 2 huyện ngoại thành Hà Nội cho thấy, tỷ lệ nhiễm giun đũa ở chó là 37,7% và nguy cơ người bị nhiễm giun đũa chó là rất cao (Lan Anh và ctv, 2015). Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện để xác định chính xác loài giun đũa gây bệnh ở chó trên các mẫu thu thập tại địa điểm trên ở Hà Nội bằng phương pháp sinh học phân tử.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nguyên liệu

**Bảng 1. Nguồn gốc địa lý thu thập mẫu *Toxocara* ở chó và các chi thị di truyền được sử dụng trong xác định phân loại ở nghiên cứu này**

STT	Kí hiệu mẫu	Vị trí thu thập (huyện/TP)	Trạng thái mẫu	Chi thị		Loài được xác định
				ITS2	atp6	
1	Tspdog-Hdtt(egg)-VN	Thường Tín/Hà Nội	Trứng*	√	√	<i>T. canis</i>
2	Tspdog-Tdtt11(adu)-VN	Thường Tín/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
3	Tspdog-Tdtt202(adu)-VN	Thường Tín/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
4	Tspdog-Tdtt208(adu)-VN	Thường Tín/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
5	Tspdog-Tdtt273(adu)-VN	Thường Tín/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
6	Tspdog-Tdto14(adu)-VN	Thanh Oai/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
7	Tspdog-Tdto15(adu)-VN	Thanh Oai/Hà Nội	TT	√	√	<i>T. canis</i>
8	Tspdog-Tdto102(adu)-VN	Thanh Oai/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
9	Tspdog-Tdto106(adu)-VN	Thanh Oai/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
10	Tspdog-Tdto114(adu)-VN	Thanh Oai/Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
11	Tspdog-Tdto202(adu)-VN	Thanh Oai/Hà Nội	TT	√	√	<i>T. canis</i>
12	Tspdog-TdHN1(adu)-VN	Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
13	Tspdog-TdHN2(adu)-VN	Hà Nội	TT		√	<i>T. canis</i>
14	Tspdog-TdHN3(adu)-VN	Hà Nội	TT	√	√	<i>T. canis</i>

Ghi chú: trứng\* và (egg): trứng thu thập từ lông chó; (adu) và TT: giun trưởng thành thu thập từ chó ở các địa phương; Tspdog: Nhóm mẫu *Toxocara* thu thập từ chó; VN: Việt Nam. Kí hiệu địa lý của mẫu được ghi ở giữa (ví dụ: Tcto202(adu): giun trưởng thành thu từ chó ở huyện Thanh Oai, Hà Nội).

Mẫu nghiên cứu: Giun đũa *Toxocara sp* trưởng thành và trứng được thu thập từ chó ở huyện Thường Tín, Thanh Oai, TP. Hà Nội. 14 mẫu được rửa sạch bằng nước muối sinh lý, bảo quản trong cồn 70% và lưu giữ lạnh ở  $-20^{\circ}\text{C}$ , cho đến khi sử dụng.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Tách chiết DNA tổng số

Tất cả 14 mẫu 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. Tóm tắt như sau: Mẫu được nghiền kỹ, cho 180  $\mu\text{l}$  dung dịch Tissue Lysis buffer (ATL); tiếp tục bổ sung 20  $\mu\text{l}$  Proteinase-K (100mg/ml) và ủ  $56^{\circ}\text{C}/2$  giờ. Tiếp tục bổ sung 200  $\mu\text{l}$  dung dịch AL, lắc đều, ủ tiếp  $56^{\circ}\text{C}/30$  phút. Thêm 200  $\mu\text{l}$  Ethanol (100%), trộn đều; 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

### 2.2.2 Phản ứng PCR thu chuỗi gen *atp6* và *ITS2*

Với cặp mồi, bao gồm mồi xuôi TON2F (5'GCTTACCCCKCGTTTTTCGTTATGA 3') và mồi ngược TOSER (5' CCCAWAAYAGATT-TAGAAGACCT 3') sản phẩm gen ty thể *atp6* (giữa *nad2* và *tRNA-Ser*, của tất cả các loài *Toxocara spp*), khoảng 0,8 kb đã được thu nhận bằng phản ứng PCR. Tương tự, với cặp mồi U3SF (5' GGTACCGGTGGATCACTCG-GCTCGTG 3') và U28S2R (5 'ACAACC-CGACTCCAAGGTC 3') thu sản phẩm PCR

vùng gen *ITS2* hệ gen nhân (giữa 5,8S và 28S), khoảng 0,4 kb.

Phản ứng PCR trên máy PTC MJ-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA), theo chu trình nhiệt: 1 chu kỳ ở  $94^{\circ}\text{C}/5$  phút, 35 chu kỳ [ $94^{\circ}\text{C}/30$  giây,  $52^{\circ}\text{C}/30$  giây,  $72^{\circ}\text{C}/2$  phút], chu kỳ cuối ở  $72^{\circ}\text{C}/10$  phút. 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. Sử dụng bộ sinh phẩm Accuprep Gel Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc), sản phẩm được tách ra khỏi agarose ("thời gel") và được giải trình tự trực tiếp để thu nhận chuỗi nucleotide, 598 bp (*atp6*) và 322-323 bp (*ITS2*) để phân tích đa chuỗi. Sử dụng chương trình Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), truy cập Ngân hàng gen 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 (bảng 2).

### 2.2.3 Phân tích chuỗi gen và xử lý số liệu

Trình tự chuỗi nucleotide được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng ChromasLITE 2.1.1, GenDOC 2.7, thu nhận 14 chuỗi *atp6* và 4 chuỗi *ITS2* của mẫu nghiên cứu của Việt Nam. Trình tự nucleotide của các chuỗi *atp6* và *ITS2* của các mẫu *Toxocara* trên chó của Việt Nam thu được trong nghiên cứu này và của các loài *Toxocara spp* tham chiếu bao gồm: *T. canis* (6 chuỗi *atp6* và 10 chuỗi *ITS2*); *T. cati* (2 chuỗi *atp6* và 20 chuỗi *ITS2*); *T. malaysiensis* (1 chuỗi *atp6*; 2 chuỗi *ITS2*); *T. vitulorum* (5 chuỗi *atp6*; 2 chuỗi *ITS2*) và *Toxascaris leonina* (1 chuỗi *atp6* và 5 chuỗi *ITS2*) trong cơ sở dữ liệu GenBank, đã được sử dụng phân tích so sánh để xác định phân loại và phả hệ (liệt kê ở bảng 2).

Các chuỗi nucleotide của gen *atp6* và của *ITS2*, được sắp xếp theo chương trình GenDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/gendoc/>). Tỷ lệ đồng nhất được 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 ký và nguồn gốc quốc gia phân lập của các chuỗi gen tham chiếu của atp6 và ITS2 sử dụng để phân loại các mẫu Toxocara trên chó tại Việt Nam.**

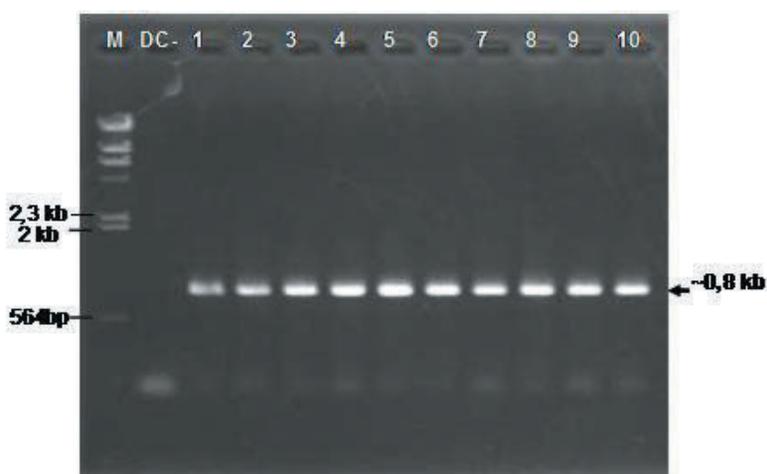
	Số đăng ký ở Ngân hàng gen của các chỉ thị đã sử dụng	
	atp6	ITS2
<i>Toxocara canis</i>	Australia (AU): EU730761; Trung Quốc (CN): AM411108; Ấn Độ (IN): KJ777173, KJ777174; Sri Lanka (LK): FJ418787, JN593098;	Loài
<i>Toxocara cati</i>	Trung Quốc (CN): AM411622; Ấn Độ (IN): KJ777175	Trung Quốc (CN): JF837172, JF837173, JF837171; Iran: AB819326, AB819323, AB819325, AB743611, AB743599, AB743600, AB743601, AB743598, AB743607, AB743602; Ấn Độ (IN): JN391473, JN391472, HQ389350, HQ389349, HQ389348, HQ389347, HQ389346; Nhật Bản (JP): AB571303; Malaysia (MY): AJ002441;
<i>Toxocara malaysiensis</i>	Trung Quốc (CN): AM412316;	Malaysia (MY): AJ002440; Trung Quốc (CN): AM231609;
<i>Toxocara vitulorum</i>	Sri Lanka (LK): FJ664617, FJ418793; Ấn Độ (IN): KJ777176, KJ777177, KJ777178;	Canada (CA): JQ083352 Vương Quốc Anh (UK): EU189085;
<i>Toxascaris leonina</i>	Trung Quốc (CN): KC902750;	Trung Quốc (CN): JF837174; JF837175, JF837177, JF837178, JF837179,

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

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả thực hiện phản ứng PCR

Từ DNA tổng số tách chiết từ các mẫu *Toxocara* sp thu trên chó trong nghiên cứu này, với thành phần và chu trình nhiệt PCR đã mô



**Hình 1. Sản phẩm PCR vùng DNA chứa gen atp6 kiểm tra điện di trên agarose 1%**

M: chỉ thị DNA (*Lamda* cắt bằng *HindIII*); DC-: đối chứng âm (khuôn là nước); 1-10: Sản phẩm PCR vùng gen atp6 của một số mẫu nghiên cứu (mẫu 1: từ trứng thu từ lông chó; 2-10: từ giun trưởng thành).

tả, sản phẩm PCR vùng gen *atp6* với kích thước vào khoảng 0,8 kb đã được thu nhận với hàm lượng cao và chất lượng tốt; trong đó đặc biệt mẫu tách DNA từ trứng lấy từ lông chó vẫn cho sản phẩm PCR tốt (hình 1). Sau khi giải trình tự và xử lý chuỗi gen, toàn bộ trình tự nucleotide của gen *atp6* và ITS2 đã được thu nhận và đưa vào phân tích so sánh đôi chiều. Tổng số có 14 chuỗi *atp6* (598 bp) của tất cả mẫu nghiên cứu và 4 chuỗi ITS2 (độ dài 333 bp) của một số mẫu đại diện, đã được thu nhận và liệt kê ở hình 1.

**Bảng 3. Tỷ lệ đồng nhất (%) của chuỗi gen *atp6* và ITS2 giữa các loài tham chiếu (*Toxocara canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis*, *T. vitulorum*) với nhóm mẫu *Toxocara* trên chó của Việt Nam (Tspdog-VN)**

Loài so sánh (tham chiếu)	Nhóm mẫu <i>Toxocara</i> trên chó của Việt Nam (Tspdog-VN)	
	<i>atp6</i> (n=14)	ITS2 (n = 4)
<i>T. canis</i>	98,2% - 99,7%	95,6% - 100%
<i>T. cati</i>	88,5% - 89,1%	76,7% - 79,7%
<i>T. malaysiensis</i>	86,8% - 87,5%	79,3% - 81,9%
<i>T. vitulorum</i>	83,2% - 88,1%	80,2% - 80,6%

Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy 14 chủng *Toxocara* sp trên chó của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất của gen *atp6* và ITS2 lần lượt là: với loài *Toxocara canis* (98,2-99,7%/atp6 và 95,6%- 100%/ITS2); với *T. cati* (88,5%-89,1% và 76,7%-79,7%); với *T. malaysiensis* (86,8%-87,5% và 79,3%-81,9%), một loài *Toxocara* mới gây bệnh trên mèo; và với *T. vitulorum* (83,2-88,1% và 80,2%-80,6%).

Như vậy, các chủng *Toxocara* trên chó của Việt Nam trong nghiên cứu này được xác định thuộc loài *T. canis*, do có tỷ lệ đồng nhất rất cao (98,2-99,7% của gen *atp6* và 95,6%- 100% của gen ITS2) với các chủng của loài *Toxocara canis* trên thế giới.

### 3.3. Phân tích phả hệ xác định quan hệ về loài giữa các chủng *Toxocara* trên chó của Việt Nam và thế giới

Cây phả hệ xây dựng dựa trên phân tích 29 chuỗi gen *atp6*, bao gồm 14 chủng của *Toxocara* trên chó của Việt Nam trong nghiên cứu này và

### 3.2. Tỷ lệ đồng nhất thành phần nucleotide gen *atp6* và ITS2 các mẫu *Toxocara* sp trên chó của Việt Nam với *T. canis* các loài tham chiếu khác

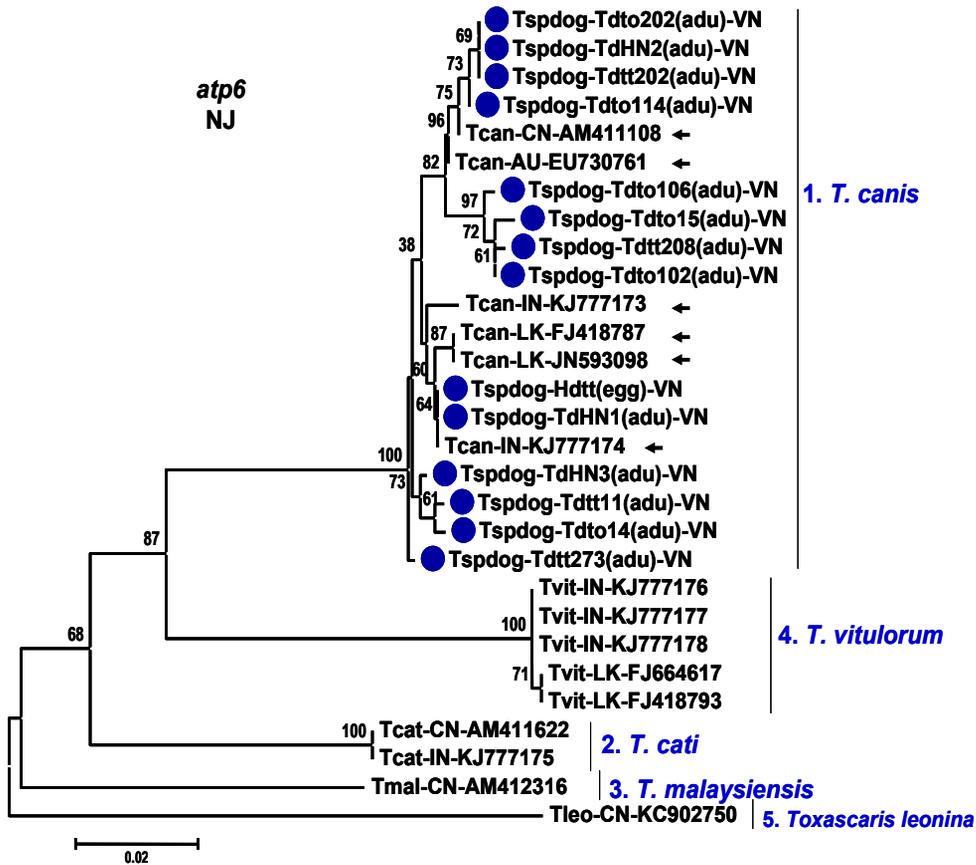
Trình tự gen *atp6* của 14 chủng và ITS2 của 4 chủng đại diện của *Toxocara* sp trên chó của Việt Nam thu thập ở Hà Nội được đưa vào so sánh đôi chiều tính toán tỷ lệ đồng nhất với các loài tham chiếu (Bảng 2), gồm một số chủng thuộc loài *T. canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* và *T. vitulorum*, bằng chương trình GenDOC2.7.

15 chủng đại diện cho các loài *Toxocara* bao gồm *Toxocara canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* (một loài *Toxocara* mới gây bệnh trên mèo); và *T. vitulorum* (liệt kê ở bảng 2), cùng với *Toxascaris leonina* (nhóm ngoại hợp), được trình bày ở hình 2.

Tương tự, dựa trên chuỗi gen ITS2, cây phả hệ của 45 chủng, gồm 4 chủng đại diện *Toxocara* trên chó của Việt Nam và 41 chủng tham chiếu đại diện các loài *Toxocara canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* và *Toxascaris leonina* (nhóm ngoại hợp), cũng được xây dựng để đánh giá quan hệ về loài (hình 3).

Cây phả hệ dựa trên chuỗi gen *atp6* (hình 2) và chuỗi gen ITS2 (hình 3) cho thấy các chủng phân thành 5 nhóm chính và riêng biệt:

- Nhóm thứ nhất gồm các chủng *Toxocara* trên chó của Việt Nam, tập hợp cùng với các chủng tham chiếu của loài *T. canis* (đã xác định chính xác là loài *T. canis*): i) *atp6* của Australia, Trung Quốc, Ấn Độ và Sri Lanka; ii) ITS2 của Trung Quốc và Iran.



**Hình 2.** Cây phả hệ xác định mối quan hệ về loài giữa các chủng *Toxocara spp* của Việt Nam và thế giới 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 1000 lần lặp lại (Tamura et al., 2013).

Ghi chú: Ký hiệu mẫu/chủng tham khảo tại Bảng 1 và Bảng 2; Các chủng của Việt Nam đánh dấu hình tròn ở đầu chuỗi; số đăng kí Ngân hàng gen của các chủng tham chiếu ở cuối chuỗi. Các chủng tham chiếu của *T. canis*, chỉ dẫn bằng mũi tên. 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.

- Nhóm thứ hai gồm các chủng tham chiếu của loài *T. cati*: i) *atp6* của Trung Quốc và Ấn Độ; ii) ITS2 của Trung Quốc, Ấn Độ, Iran, Nhật Bản và Malaysia.

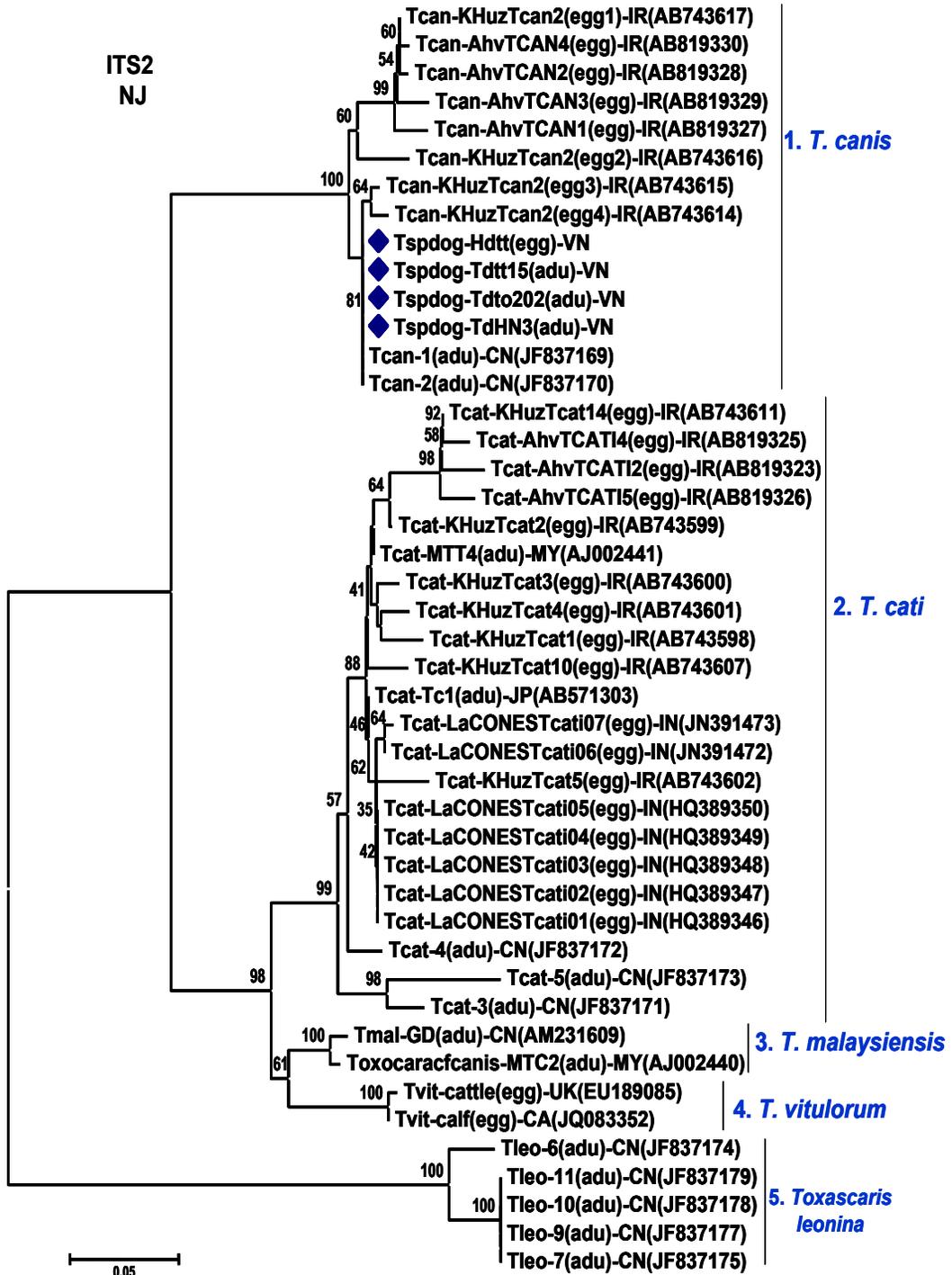
- Nhóm thứ ba gồm các chủng tham chiếu của loài *T. malaysiensis*: i) *atp6* của chủng có nguồn gốc Trung Quốc; ii) ITS2 của Malaysia và Trung Quốc.

- Nhóm thứ tư bao gồm các chủng tham chiếu của loài *T. vitulorum*: i) *atp6* của Sri Lanka và

Ấn Độ; ii) ITS2 của Canada và Vương quốc Anh.

- Nhóm thứ năm của các chủng thuộc loài *Toxascaris leonina*, đóng vai trò làm nhóm ngoại hợp (outgroup) trong cây phả hệ.

Như vậy, phân tích phả hệ dựa trên chỉ thị gen *atp6* và ITS2 đều cho thấy có 5 nhóm riêng biệt, trong đó nhóm *T. canis* gồm các chủng *Toxocara sp* trên chó của Việt Nam cùng với các chủng tham chiếu thuộc loài *T canis*; 4 nhóm còn



**Hình 3. Cây phả hệ xác định mối quan hệ về loài giữa các chủng *Toxocara* spp của Việt Nam và thế giới 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 và bảng 2; Các chủng của Việt Nam đánh dấu hình bình hành ở đầu chuỗi; số đăng ký 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.

lại là nhóm của các loài *T. cati*, *T. malaysiensis*, *T. vitulorum* và *Toxascaris leonina* (nhóm ngoại họ), tách biệt hoàn toàn với nhóm *T. canis*.

Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp sinh học phân tử, so sánh các chuỗi gen atp6 (gen ty thể) và gen ITS2 (gen nhân tế bào) khẳng định chó ở ngoại thành Hà Nội chỉ nhiễm loài *T. canis*. Tuy nhiên, một vấn đề đặt ra là: tại Việt Nam, người bị nhiễm *Toxocara* thuộc loài nào, *T. canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis*, hay tất cả các loài *Toxocara*, chúng ta cần có khảo sát sâu rộng hơn trên chó, mèo và người để có kết luận thẩm định nguyên nhân gây bệnh toxocariasis tại nước ta.

#### IV. KẾT LUẬN

14 chủng *Toxocara* spp. trên chó tại Hà Nội trong nghiên cứu này được xác định chính xác thuộc loài *T. canis* do có trình tự nucleotide đồng nhất gần như tuyệt đối của atp6 (98,2-99,7%) và rất cao của ITS2 (95,6%-100%) với các chủng tham chiếu của loài *T. canis*. Phân tích hệ dựa trên gen atp6 và ITS2 đều cho thấy các chủng *Toxocara* sp trên chó tại Hà Nội đều cùng nhóm với *T. canis* của các quốc gia trên thế giới. Kết quả trong nghiên cứu này là công bố đầu tiên về đặc điểm gen học và phân loại của *T. canis* ở Việt Nam, cung cấp thêm hiểu biết về sinh học phân tử giun đũa gây bệnh trên chó, tạo cơ sở cho giám sát dịch tễ học trong cộng đồng.

#### Lời cảm ơn

Cảm ơn tài trợ kinh phí của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) cho đề tài mã số 106-YS.06-2013.02 (NTLA) để thực hiện công trình này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Quốc Doanh và cộng tác viên, 2012. Tình hình nhiễm giun ở đàn chó nuôi tại Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 19(4), 30-34.
- Antolová, D., Reiterová, K., Miterpakova, M., Stanko, M.U.P. 2004. Circulation of *Toxocara* spp. in suburban and rural ecosystems in the Slovak Republic. *Veterinary Parasitology*, 126, 317-324.
- Dado, D., Izquierdo, F., Vera, O., Montoya, A., Mateo, M., Fenoy, S., Galv, A.L., Garc, S., Garc, A., Arguez, E., Lez, L., Del guila, C., Mi, G. (2012). Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses Public Health* 59: 23-28.
- De NV, Trung NV, Duyet LV, Chai JY (2013). Molecular diagnosis of an ocular toxocariasis patient in Vietnam. *Korean Journal of Parasitology*, 51(5): 563-567.
- Gasser, R.B. (2013). A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. *Veterinary Parasitology*, 193(4): 353-64.
- Habluetzel, A., Traldi, G., Ruggieri, S., Attili, A.R., Scuppa, P., Marchetti, R., Menghini, G., Esposito, F. (2003). An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs' environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche.
- Lan Anh NT, Thuy DT, Hoan DH, Dung DT (2015). Levels of *Toxocara* infections in dogs and cats from urban Vietnam together with associated risk factors for transmission. *Journal of Helminthology*, 30:1-3
- Li MW, Zhu XQ, Gasser RB, Lin RQ, Sani RA, Lun ZR, et al (2007). The occurrence of *Toxocara malaysiensis* in cats in China, confirmed by sequence based analyses of ribosomal DNA. *Parasitology Research*, 99: 554-557.
- Macpherson CN (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *International Journal of Parasitology*, 43: 999-1008.
- Uga, S., Matsuo, J., Kimura, D., Rai, S.K., Koshino, Y., Igarashi, K. (2000) Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Veterinary Parasitology*, 92: 287-294.