

# Xác định thành phần loài giun móc (*Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*) và giun mỏ *Necator americanus* gây bệnh cho người tại tỉnh Tây Ninh bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Lê Đức Vinh, Trần Trinh Vương, Nguyễn Kim Thạch\*

Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/3/2023; ngày chuyển phản biện 24/3/2023; ngày nhận phản biện 18/4/2023; ngày chấp nhận đăng 21/4/2023

## Tóm tắt:

Nhiễm giun móc/mỏ ở người Việt Nam là bệnh khá phổ biến. Tác nhân gây bệnh là *Necator americanus* và *Ancylostoma duodenale*. Một số nghiên cứu gần đây đã xác định thêm một tác nhân mới gây bệnh trên người - giun móc *Ancylostoma ceylanicum*, vốn thường ký sinh ở chó. Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật PCR lồng (nested PCR) và giải trình tự gen nhằm xác định sự hiện diện và thành phần của các loài giun móc *A. duodenale*, *A. ceylanicum* và giun mỏ *N. americanus*. Các mẫu phân người dân nghi nhiễm sống tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh được tiến hành nuôi cấy, thu thập ấu trùng và xác định sơ bộ bằng hình thái học. 65 mẫu DNA được tách chiết từ các mẫu ấu trùng dùng cho các kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả cho thấy, 44 mẫu đơn nhiễm *N. americanus* (67,7%), 11 mẫu *A. ceylanicum* (16,9%) và 1 mẫu *A. duodenale* (1,6%). Các trường hợp đồng nhiễm (13,8%) là *A. ceylanicum* và *N. americanus*. *N. americanus* có nguồn gốc gần với loài được công bố tại Malaysia, *A. ceylanicum* có nguồn gốc gần với loài đã công bố tại Thái Lan. Kết luận, tại xã Thạnh Bình, loài mới *A. ceylanicum* phổ biến hơn loài truyền thống *A. duodenale*, chiếm 95,2 so với 4,8%.

**Từ khóa:** *Ancylostoma ceylanicum*, giải trình tự gen, *Necator americanus*, PCR lồng, phân người, phương pháp Sasa.

**Chỉ số phân loại:** 3.3

## 1. Mở đầu

Nhiều nghiên cứu chỉ ra nhiễm giun móc/mỏ ở người tại các tỉnh miền Đông Nam Bộ của Việt Nam chiếm tỷ lệ còn cao, dù rằng cả tỷ lệ và cường độ nhiễm đang giảm dần do áp lực của thuốc điều trị và các yếu tố xã hội khác tác động. Ở người Việt Nam, giun móc gây bệnh là *A. duodenale*, chiếm tỷ lệ thấp hơn so với loài giun mỏ *N. americanus*. Gần đây, một báo cáo đã tìm thấy dấu vết của loài giun móc *A. ceylanicum* bằng kỹ thuật phân tử và kết luận loài này có tỷ lệ nhiễm thấp.

*A. ceylanicum* và *A. duodenale* được gọi chung là giun móc và do vòng đời phát triển khá giống với loài giun mỏ *N. americanus* nên 3 loài giun này thường được ghép chung với nhau bằng danh từ giun móc/mỏ [1-3]. Chẩn đoán nhiễm bệnh thường dựa vào hình thể trứng và ấu trùng của 3 loài giun từ bệnh phẩm phân. Điểm khác biệt về hình thể học giữa các loài là rất nhỏ, nên việc định danh còn nhiều điểm chưa rõ ràng. Vì vậy, hạn chế của chẩn đoán hình thể học khi áp dụng thực tế là chỉ dừng lại ở mức độ chẩn đoán chung chung, đó là có hay không nhiễm giun móc/mỏ.

Với sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử, chẩn đoán định loài đã chính xác và toàn diện. Kỹ thuật phân tử, đặc biệt là giải trình tự gen đã khắc phục được những nhược điểm tồn tại của các kỹ thuật chẩn đoán truyền thống. Ngoài ra, kỹ thuật này có khả năng xác định loài giun móc *A. ceylanicum* gây bệnh ở người Việt Nam có nguồn gốc từ động vật [4, 5]. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định chính xác thành phần từng loài giun móc, giun mỏ gây bệnh ở người dân bị nhiễm cư ngụ tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh. Từ đó nghiên cứu góp phần làm sáng tỏ hiện trạng nhiễm loài giun mỏ hay giun móc nào là phổ biến ở người Việt Nam.

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

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng

Từ tháng 2/2022 đến 8/2022 tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh, 65 người dân sống tại đây được xác định nhiễm giun thông qua phương pháp nuôi cấy mẫu phân phối hợp với kỹ thuật soi trực tiếp. Ấu trùng giun móc/mỏ được thu thập từ các mẫu phân trên được sử dụng cho nghiên cứu.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và môi trường cấy phân bằng phương pháp Sasa sử dụng trong nghiên cứu này được sản xuất từ Hãng Merck (Đức). Kít tách chiết DNA của Hãng ABT Biological Solution Company Limited, Việt Nam (Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam). Các hoá chất thực hiện kỹ thuật PCR của Hãng Promega, Mỹ. Trình tự các đoạn môi của các gen được tổng hợp bởi Công ty IDT, Singapore.

Địa điểm nghiên cứu là Phòng Thí nghiệm của Bộ môn Ký sinh Y học, Khoa Khoa học Cơ bản - Y học Cơ sở, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch và giải trình tự gen tại Công ty First BASE Laboratories-Axil Scientific, Singapore.

*Xác định hình thể ấu trùng và trứng của giun móc/mỏ bằng soi trực tiếp dưới kính hiển vi:* Xét nghiệm tầm soát nhiễm giun cho người dân tình nguyện bằng phương pháp nuôi cấy Sasa và soi trực tiếp dưới kính hiển vi xác định được các trường hợp dương tính người dân nhiễm bệnh giun móc/mỏ. Tiến hành thu thập tất cả ấu trùng giun trong từng mẫu cấy bằng kỹ thuật ly tâm lắng cạn với tốc độ 3.000 vòng trong 5 phút. Phần cặn lắng sau ly tâm được soi dưới kính hiển vi kiểm tra sự hiện diện ấu trùng giai đoạn I, II

# Determination of the composition of hookworm species (*Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*) and *Necator americanus* in humans at community in Tay Ninh province by biomolecular technique

Duc Vinh Le, Trinh Vuong Tran, Kim Thach Nguyen\*

Pham Ngoc Thach University of Medicine,  
2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City,  
Vietnam

Received 22 March 2023; revised 18 April 2023; accepted 21 April 2023

## Abstract:

Hookworm infections are common in Vietnam and are caused by two known pathogens: *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. Recent studies have identified a new hookworm species - *Ancylostoma ceylanicum*, which typically parasitises in dogs. To determine the prevalence of these three hookworm species: *A. duodenale*, *A. ceylanicum*, and *N. americanus*, nested PCR and gene sequencing were employed in fecal samples from suspected individuals residing in Thanh Binh commune, Tan Bien district, Tay Ninh province. Larvae were collected and identified by morphology before 65 DNA samples were extracted and analysed using molecular biology techniques. Results showed that 67.7% (44/65) of the samples were infected with *N. americanus*, while 16.9% (11/65) and 1.6% (1/65) were infected with *A. ceylanicum* and *A. duodenale*, respectively. Co-infection was present in 13.8% of cases, with *A. ceylanicum* and *N. americanus* being the most common combination. The origin of the *N. americanus* species identified was found to be closely related to that reported in Malaysia, while *A. ceylanicum* was more closely related to the species reported in Thailand. In conclusion, the study found that the new hookworm species *A. ceylanicum* was more prevalent than the traditional species *A. duodenale* in Thanh Binh commune (95.2 vs 4.8% of hookworm infections).

**Keywords:** *Ancylostoma ceylanicum*, DNA sequencing, human faeces, *Necator americanus*, nested PCR, Sasa method.

**Classification number:** 3.3

của giun. Cố định ấu trùng giun bằng dung dịch cồn 70°. Với mỗi trường hợp bệnh nhân bị nhiễm, chọn ngẫu nhiên 5 ấu trùng giun bằng micropipette dưới kính hiển vi soi nổi SZ51, cho vào 1 ống nghiệm trữ tạo thành mẫu nguồn cho kỹ thuật phân tử.

**Tách chiết DNA:** Mỗi mẫu cấy chứa 5-10 ấu trùng giun được tiến hành tách chiết DNA bằng kit tách chiết Top Pure genomic DNA extraction kit (Hãng ABT, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam). Sau khi tách chiết, DNA mẫu nghiên cứu này được lưu trữ ở -70°C. DNA được áp dụng làm khuôn tổng hợp cho 2 bước của kỹ thuật PCR lồng gồm [6]:

Bước 1: Nhân lượng đoạn DNA đích có kích thước đã xác định bằng mỗi NC1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho giống *Ancylostoma* spp. và loài *N. americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2. Trong thể tích 20 µl phản ứng có thành phần gồm: 4 µl đệm Taq (10X), 4,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 4 µl DNA mẫu pha loãng (20 ng), 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM) và 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), nước khử ion bổ sung cho đủ thể tích 20 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Chu kỳ nhiệt của phản ứng như sau: bước 1 (94°C, 3 phút); bước 2 (94°C, 30 giây), (55°C, 30 giây) và (72°C, 30 giây), lặp lại 30 chu kỳ; bước 3 (72°C, 7 phút). Bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Sản phẩm sau PCR được thực hiện điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide để xác định sự hiện diện của NDA đích. Mẫu PCR nhân lượng thành công ở bước 1 sẽ áp dụng để thực hiện PCR nhân lượng bước 2.

Bước 2: Nhân lượng đoạn DNA đích bằng mỗi NAF, mỗi AD1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho giống *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng trong thể tích 50 µl gồm: 8 µl đệm Taq (10X), 5,6 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 2 µl sản phẩm PCR nhân lượng bước 1, 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), nước khử ion bổ sung đủ thể tích 50 µl.

**Bảng 1. Các đoạn mỗi vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 và *cox1*.**

Tên mỗi	Trình tự mỗi	PCR nhân lượng đoạn DNA	Tài liệu tham khảo
NC1 F	5'-ACG TCT GGT TCA GGG TTC TT-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 310 bp	[7, 8]
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'	<i>N. americanus</i> : 420 bp	
NAF	5'-ATG TGC ACG TTA TTC ACT-3'	<i>N. americanus</i> : 250 bp	[9]
AD1 F	5'-CGA CTT TAG AAC GTT TCG GC-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 130 bp	[5]
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'		
AceyCOXI F	5'-GCT TTT GGT ATT GTA AGA CA-3'	<i>A. duodenale</i> và <i>A. ceylanicum</i> : 377 bp	[10]
AceyCOXI R	5'-CTAACA ACA TAA TAA GTA TCA TG-3'		

Chu kỳ nhiệt của phản ứng như sau: bước 1 (94°C, 5 phút); bước 2 (94°C, 1 phút), (55°C, 1 phút) và (72°C, 1 phút) lặp lại 35 chu kỳ; bước 3 (72°C, 7 phút). Bảo quản mẫu ở điều kiện 4°C. Sản phẩm sau PCR bước 2 được điện di trên thạch agarose 1,5%; nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide để xác định kết quả.

**Xác định loài giun móc *A. duodenale*, *A. ceylanicum* bằng giải trình tự gen ty thể vùng *cox1*:** Nhân lượng đoạn DNA đích bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu cho giống *Ancylostoma* spp. thuộc gen ty thể vùng *cox1* (bảng 1). Trong thể tích 50 µl phản ứng có thành phần gồm: 8 µl đệm Taq (10X), 5,6 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl sản phẩm PCR bước 1, 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). Bổ sung nước khử ion đủ thể tích 50 µl.

Các bước được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (94°C, 5 phút); bước 2 (94°C, 30 giây), (58°C, 30 giây), (72°C, 30 giây) và lặp lại 50 chu kỳ; bước 3 (72°C, 7 phút). Bước cuối là bảo quản mẫu ở điều kiện 4°C. Sản phẩm sau PCR được điện di trên

thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide nhằm xác định sự hiện diện của đoạn gen cần giải trình tự.

Tinh sạch sản phẩm PCR của *Ancylostoma* spp. 600 bp bằng bộ kit Wizard® SV Gel theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ và được tiến hành giải trình tự.

**Xác định loài *N. americanus* bằng giải trình tự gen ty thể vùng *cox1*:** Sản phẩm PCR của *N. americanus* 420 bp được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch Wizard® SV Gel theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ và được tiến hành giải trình tự tại First BASE Laboratories-Axil Scientific.

**2.3. Phân tích và xử lý số liệu**

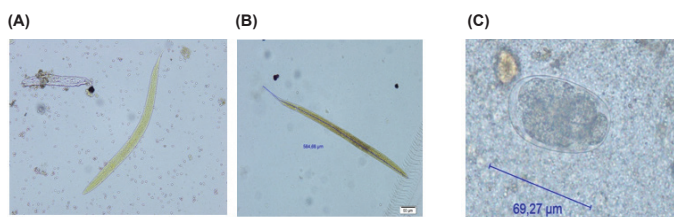
Trình tự gen thu được sau giải trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit 7.2.6 (Tom Hall, 2017) và MEGA X (Temura, 2013). So sánh trình tự các mẫu trong nghiên cứu với trình tự *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* đã được công bố trên Ngân hàng gen NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) để dựng cây phân loài mối quan hệ di truyền.

Kết quả giải trình tự được đối chiếu với kết quả PCR lồng. Số liệu được nhập vào phần mềm Excel V16.0 và xử lý.

**3. Kết quả**

**3.1. Chẩn đoán hình thể ấu trùng, trứng của loài giun móc/mỏ**

Trong quần thể mẫu thu thập tại thực địa, nghiên cứu xác định được 85 trường hợp nhiễm giun móc/mỏ khi phối 2 kỹ thuật chẩn đoán dựa trên hình thể. Trong đó, 69 mẫu đều tìm thấy ấu trùng giai đoạn I, II của giun dài 200-650 µm và rất khó phân biệt loài giữa giun móc *Ancylostoma* spp. với giun mỏ *N. americanus* (hình 1A và 1B). 48 mẫu dương tính tìm thấy trứng giun có hình bầu dục, vỏ mỏng, kích thước khoảng 60-70x30-40 µm và có 4-16 phôi bào (hình 1C). Sự phối hợp giữa 2 kỹ thuật giúp chẩn đoán chính xác số ca nhiễm giun móc/mỏ và chẩn đoán phân biệt được với loài giun lươn gây bệnh ở người



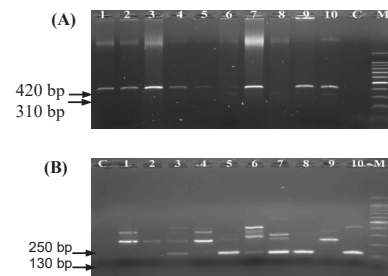
**Hình 1. Ấu trùng và trứng của giun móc/mỏ. (A)** Ấu trùng giai đoạn I; **(B)** Ấu trùng giai đoạn II; **(C)** Trứng.

Khi nuôi cấy chỉ có 69 trường hợp dương tính và thu được ấu trùng, nhưng khi đưa vào quy trình gạn lọc và tách chiết DNA thì chỉ có 65 mẫu đạt được nồng độ DNA theo quy định của nhà sản xuất, tỷ lệ là 94,2% (65/69). Như vậy, mục tiêu xác định thành phần loài được xác định trên mẫu nghiên cứu gồm n=65 mẫu.

**3.2. Kết quả PCR lồng định loài *Ancylostoma* spp. và *N. americanus***

65 mẫu DNA đã tách chiết từ ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp trong phản ứng PCR lồng 2 bước xác định giống

*Ancylostoma* spp. và *N. americanus* đặc hiệu trên vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2.



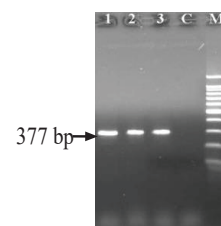
**Hình 2. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen vùng trình tự 28S rRNA-ITS2 với 10 mẫu DNA *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* bằng điện di agarose 1,5%. (A): PCR bước 1; (B): PCR bước 2; M: thang DNA 100 bp; giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng C: chứng H<sub>2</sub>O.**

Đối chiếu kết quả PCR lồng ở cả 2 bước, có 44 mẫu (67,7%) được xác định nhiễm *N. americanus* như tại vị trí giếng thứ 1, 2, 4, 9 của hình 2A và 2B; 12 mẫu (18,5%) nhiễm *Ancylostoma* spp. như tại vị trí giếng thứ 8 của hình 2A và 2B; 9 mẫu (13,8%) đồng nhiễm cả 2 loài như tại vị trí giếng thứ 3, 5, 6, 7, 10 của hình 2A và 2B (bảng 2).

**Bảng 2. Thành phần loài *N. americanus* và giống *Ancylostoma* spp. xác định bằng kỹ thuật PCR tổ hợp.**

Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>N. americanus</i>	44	67,7
<i>Ancylostoma</i> spp.	12	18,5
Đồng nhiễm <i>N. americanus</i> và <i>Ancylostoma</i> spp.	9	13,8
Tổng	65	100

Sau khi thực hiện tổng hợp nhân lượng PCR, tiến hành giải trình tự gen ty thể vùng *cox1* của 12 mẫu ấu trùng nhóm *Ancylostoma* spp. và nhóm đồng nhiễm cả 2 loài (9 mẫu) để xác định từng thành phần loài. Kết quả giải trình tự so sánh bằng phần mềm Bio-edit v.7.2.6 và MEGA X cho thấy, các trình tự nucleotide *cox1* giống nhau ở cả 21 ấu trùng đặc hiệu vùng gen *cox1* ở thí nghiệm trên (hình 3).



**Hình 3. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện trình tự gen ty thể vùng *cox1* ở 3 mẫu DNA ấu trùng nhóm *Ancylostoma* spp. và nhóm đồng nhiễm cả 2 loài bằng điện di agarose 1.5%. M: thang DNA 100 bp; giếng 1: mẫu ấu trùng *Ancylostoma* spp.; giếng 2-3: mẫu ấu trùng đồng nhiễm cả 2 loài; giếng C: chứng H<sub>2</sub>O.**

**3.3. Kết quả giải trình tự gen ty thể vùng *cox1***

Tiến hành truy cập Ngân hàng gen NCBI tìm kiếm những chuỗi tương đồng giữa mẫu nghiên cứu và các trình tự đã được

đăng ký trước đó. Kết quả cho thấy, nhóm 12 mẫu ấu trùng *Ancylostoma* spp. đơn nhiễm có 11 mẫu là *A. ceylanicum* và 1 mẫu là *A. duodenale* (bảng 3). Nhóm 9 mẫu ấu trùng đồng nhiễm cả 2 loài tất cả là *A. ceylanicum* (bảng 4).

**Bảng 3.** Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen *cox1* của nhóm 12 mẫu *Ancylostoma* spp. và thế giới.

Mã số gen của NCBI	Số mẫu (n=12)	Tỷ lệ (%)	Hệ số tương đồng (%)
F896602.1 <i>A. ceylanicum</i> (Thái Lan)	6/11	54,5	87,5-98,28
MW549613.1 <i>A. ceylanicum</i> (Việt Nam)	2/11	18,2	97,76; 99,13
KC 274470.1 <i>A. ceylanicum</i> (Malaysia)	2/11	18,2	84,90; 85,38
Q 452515.1 <i>A. ceylanicum</i> (Malaysia)	1/11	9,1	87,46
AJ407954.1 <i>A. duodenale</i> (Úc)	1		80,83

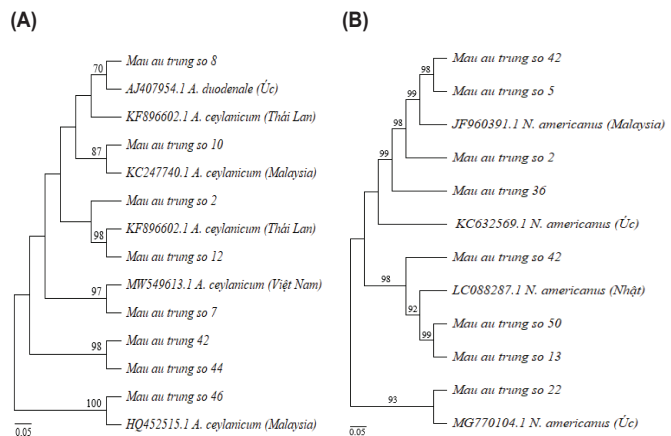
**Bảng 4.** Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen *cox1* của nhóm 9 mẫu đồng nhiễm cả 2 loài và trên thế giới.

Mã số gen của NCBI	Số mẫu (n=9)	Tỷ lệ (%)	Hệ số tương đồng (%)
HQ 452515.1 <i>A. ceylanicum</i> (Malaysia)	6	66,7	95,1-100
KF896602.1 <i>A. ceylanicum</i> (Thái Lan)	2	22,2	87,5, 98,28
MW549613.1 <i>A. ceylanicum</i> (Việt Nam)	1	11,1	97,76

**Bảng 5.** Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen *cox1* của nhóm 44 mẫu *N. americanus* và trên thế giới.

Mã số gen của Ngân hàng gen thế giới	Số mẫu (n=44)	Tỷ lệ (%)	Hệ số tương đồng (%)
JF960391.1 <i>N. americanus</i> (Malaysia)	38	86,4	92,18-100
MG770104.1 <i>N. americanus</i> (Úc)	3	6,8	92,7-98
KC632569.1 <i>N. americanus</i> (Úc)	2	4,5	99,69, 100
LC088287.1 <i>N. americanus</i> (Nhật)	1	2,3	97,87

Kết quả bảng 5 cho thấy, 86,4% mẫu ấu trùng *N. americanus* thu được tại huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh có quan hệ gần với loài *N. americanus* được công bố tại Malaysia với mức tương đồng cao từ 92,18 đến 100%, tỷ lệ tương đồng với các mã gen từ loài công bố ở Úc và Nhật Bản thấp (11,3 và 2,3%). Giun mỏ *N. americanus* có mức tương đồng rất lớn với thế giới (92,18-100%).



**Hình 4.** Cây phát sinh loài xây dựng trên cơ sở so sánh trình tự gen ty thể vùng *cox1* 377 bp của các mẫu ấu trùng *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* với Ngân hàng gen trên BLAST. (A) Nhóm mẫu ấu trùng *A. ceylanicum*; (B) Nhóm mẫu ấu trùng *N. americanus*.

Các mẫu ấu trùng *A. ceylanicum* thu được tại huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh (hình 4A), có quan hệ gần với loài *A. ceylanicum* được công bố tại Malaysia và Thái Lan. *N. americanus* có quan hệ gần với loài của Malaysia (hình 4B).

**Bảng 6.** Thành phần loài giun móc/mỏ được xác định bằng phối hợp kỹ thuật PCR lồng và giải trình tự.

Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>N. americanus</i>	44	67,7
<i>A. duodenale</i>	1	1,6
<i>A. ceylanicum</i>	11	16,9
<i>N. americanus</i> và <i>A. duodenale</i>	0	0
<i>N. americanus</i> và <i>A. ceylanicum</i>	9	13,8
Tổng	65	100

Kết quả bảng 6 cho thấy, giun mỏ *N. americanus* chiếm tỷ lệ cao nhất (67,7%), kế đến là giun móc *A. ceylanicum* (16,9%).

#### 4. Bàn luận

Nghiên cứu đã thu thập được 85 mẫu phân của người dân tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh có kết quả dương tính. Chẩn đoán về hình thể cho thấy tất cả ấu trùng, trứng được định danh là của giun móc *Ancylostoma* spp. hoặc giun mỏ *N. americanus*. Dù vậy, số mẫu nghiên cứu cho kỹ thuật phân tử có nguồn gốc từ ấu trùng là 69 và tổng thể mẫu DNA là 65, đủ lớn để đáp ứng yêu cầu của nghiên cứu thực nghiệm.

Kết quả bảng 2 cho thấy, 65 mẫu DNA tách chiết từ nguồn ấu trùng áp dụng với kỹ thuật PCR lồng có kết quả dương tính là 100%, tương đồng với chẩn đoán hình thể học. Với kết quả này cho thấy, bước đầu kỹ thuật PCR lồng áp dụng có độ nhạy tốt khi áp dụng đúng quy trình. Tỷ lệ nhiễm *N. americanus* có 44/65 mẫu (67,7%), chiếm phần lớn các ca nhiễm dương tính của mẫu nghiên cứu. Kết quả chứng minh khả năng phát hiện giun mỏ *N. americanus* của kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu này tốt hơn so với kỹ thuật chẩn đoán hình thể truyền thống của các M. Papaiakovou và cs (2017) [11] nghiên cứu tại Ghana và T.H. Hoang và cs (2019) [12] nghiên cứu tại huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh.

Nhiễm giống giun móc *Ancylostoma* spp. có 12/65 mẫu (18,5%) và đồng nhiễm có 9/65 mẫu (13,8%). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của thế giới trước đây, nhấn mạnh *N. americanus* là loài giun mỏ nhiễm bệnh chủ yếu ở người [6, 8]. Khi nghiên cứu nhiễm giun móc và giun mỏ, tác nhân chính thường được nghĩ đến là *N. americanus* mà bỏ qua tác nhân *Ancylostoma* spp., nhất là ở các quốc gia thuộc vùng dịch tễ của giun là Đông Nam Á. Nghiên cứu này ghi nhận tỷ lệ đồng nhiễm cả 2 loài giun móc và mỏ cao (13,8%) càng cho thấy ưu điểm của kỹ thuật PCR lồng [4, 11].

Bảng 3 và 4 phân tích phá hệ trình tự gen ty thể vùng *cox1* 377 bp trong Ngân hàng gen BLAST của 12 mẫu ấu trùng trong nhóm *Ancylostoma* spp. và nhóm 9 mẫu có đồng nhiễm với *N. americanus*, kết quả chỉ xác định có 1 mẫu là *A. duodenale* (1,6%). Tất cả 20 mẫu là *A. ceylanicum* (16,9 và 13,8%), có mức độ tương đồng cao với vùng trình tự gen *cox1* (80,83-99,13%) đã được thế

giới công bố. Do đó, nghiên cứu này báo cáo được sự hiện diện của *A. ceylanicum* ở Việt Nam hiện nay, phổ biến hơn loài *A. duodenale*, trái ngược với kết quả của T.L. Luu và cs (2019) [13]. Trong nhiều năm trước đây, loài giun móc được ghi nhận trong y văn Việt Nam là *A. duodenale*, vốn dĩ mô tả từ hình thái học đơn thuần. Sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử đã giúp cho các nghiên cứu viên có điều kiện xác định chính xác loài và nguồn gốc phân bố của giun móc. Kết quả phát hiện trái ngược với y văn của nghiên cứu này là điểm mới, chứng tỏ sự phân bố của *A. duodenale* tại Việt Nam đã thay đổi theo hướng không còn phổ biến như trước [1, 3]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu tại Campuchia và Thái Lan cho thấy, *A. ceylanicum* hiện nay chính là loài phổ biến, hoàn toàn tương đồng với kết quả trong nghiên cứu này. Với sự tiếp giáp về biên giới địa lý giữa 3 nước Việt Nam, Thái Lan và Campuchia đã cho thấy sự di cư của mầm bệnh là xu thế tất yếu [10, 11].

Kết quả tại bảng 3 và 4 cũng đồng cho thấy, sự hiện diện của *A. ceylanicum* có mức tương đồng cao với các chủng đã được đăng ký tại Thái Lan và Malaysia và sự hiện diện của loài *A. duodenale* có mức độ tương đồng thấp hơn với chủng giun móc do Úc đăng ký. Điều này đặt ra hướng phát triển cho nghiên cứu là việc đăng ký mã gen trên Ngân hàng gen.

Loài giun móc tại xã Thạnh Bình phù hợp cao với loài giun *N. americanus* của Malaysia (mã gen JF960391.1) và chiếm tỷ lệ 86,4%, tiếp tới là Úc với 2 mã gen (mã gen MG770104.1 và KC632569.1) với tỷ lệ 6,8 và 4,5% (bảng 5); 1 trường hợp có nguồn gốc từ Nhật Bản (mã gen LC088287.1). Kết quả này tương đồng với báo cáo của B.K. Hung và cs (2016) [14] với tỷ lệ lớn giun móc nghiên cứu tại Việt Nam có nguồn gốc từ Malaysia. Bên cạnh sự tương đồng về nguồn gốc, kết quả nghiên cứu còn tương đồng với các nghiên cứu gần đây tại Việt Nam về sự giảm dần tỷ lệ thành phần giun móc *N. americanus*, bởi có sự hiện diện và gia tăng dần tỷ lệ loài giun móc *A. ceylanicum* [12-14].

Khi phối hợp kỹ thuật PCR lồng và giải trình tự, bên cạnh loài phổ biến *N. americanus* là 67,7%, thành phần loài giun móc *A. duodenale* và *A. ceylanicum* lần lượt là 1,6 và 16,9% đối với trường hợp đơn nhiễm. Tất cả trường hợp đồng nhiễm: *N. americanus* và *A. ceylanicum* là 13,8% (bảng 6). Kết quả tỷ lệ hiện diện giun móc *A. ceylanicum* trong cả các trường hợp đơn nhiễm hoặc đồng nhiễm với *N. americanus* là cao hơn so với giun móc *A. duodenale*, đánh dấu một mốc quan trọng về việc lây nhiễm giun móc có nguồn gốc động vật cho người. Đây chính là điểm phát hiện mới của nghiên cứu này, mở ra hướng phát triển nghiên cứu về sự phân bố của loài giun móc *A. ceylanicum* tại Việt Nam.

## 5. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định thành phần loài giun móc và giun móc gây bệnh ở người tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh. Tỷ lệ nhiễm giun móc *N. americanus* vẫn chiếm ưu thế (67,7%). Có sự hiện diện loài mới giun móc *A. ceylanicum* chiếm 16,9 và 13,8% trong các trường hợp đơn và đồng nhiễm. Kỹ thuật PCR lồng vẫn chưa định danh được loài giun móc *A. ceylanicum*.

Giải trình tự gen ty thể vùng *cox1* là tiêu chuẩn vàng để định danh loài. Kết quả của nghiên cứu cho thấy khả năng lây nhiễm *A. ceylanicum* ở người trở nên phổ biến. Sự tương tác giữa người và động vật trong quá trình sống đã dẫn đến lây nhiễm giun móc có nguồn gốc động vật cho người ở Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Sahimin, Y.A.L. Lim, B. Douadi, et al. (2015), "Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: Molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*", *Acta Tropica*, **173**, pp.109-111, DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.06.011.
- [2] D.V. Le (2017), *Medical Parasitology*, Practice textbook, Medical Publishing House, Ho Chi Minh City, 96pp (in Vietnamese).
- [3] T.H. Tran (2017), "Disease caused by hookworm in humans", *Medical Parasitology*, Medical Publishing House, Ho Chi Minh City, pp.141-145 (in Vietnamese).
- [4] S. Brooker, J. Bethony, P.J. Hotez (2004), "Human hookworm infection in the 21<sup>st</sup> century", *Adv. Parasitol.*, **58**, pp.197-288, DOI: 10.1016/S0065-308X(04)58004-1.
- [5] J.M. Gruijter, L. Lieshout, R.B. Gasser, et al. (2005), "Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* infections in human in northern Ghana", *Trop. Med. Int. Health*, **10**(6), pp.574-580, DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01440.x
- [6] M. Papaikovou (2018), "A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **12**(1), DOI: 10.1371/journal.pntd.0006130.
- [7] R.B. Gasser, N.B. Chilton, H. Hoste, et al. (1993), "Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths", *Nucleic Acids Research*, **21**(10), pp.2525-2526, DOI: 10.1093/nar/21.10.2525.
- [8] R. Ngui, L.S. Ching, T.T. Kai, et al. (2012), "Molecular identification of human hookworm infections in economically disadvantaged communities in Peninsular Malaysia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **86**(5), pp.837-842, DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0446.
- [9] J.J. Verweij, D.S. Pit, L.V. Lieshout, et al. (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**(9), pp.726-731, DOI: 10.1046/j.1365-3156.2001.00770.x.
- [10] T. Inpankaew, F. Schar, A. Dalsgaard, et al. (2014), "High prevalence of *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections in humans, Cambodia, 2012", *Emerg. Infect. Dis.*, **20**(6), pp.976-982, DOI: 10.3201/eid2006.131770.
- [11] M. Papaikovou, N. Pilotte, J.R. Grant, 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.*, **11**(7), DOI: 10.1371/journal.pntd.0005734.
- [12] T.H. Hoang, H.N.T. Nguyen, T.H. Nhu (2019), "Diagnostic value of stool testing techniques in determining hookworm infection in primary school students in Cu Chi district, Ho Chi Minh City in 2016", *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, **23**(3), pp.400-409 (in Vietnamese).
- [13] T.L. Luu, Q.H. Le, D.V. Le, et al. (2019), "Application of nested PCR to detect *Ancylostoma* spp. and *Necator americanus* infections in human", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **61**(7), pp.10-13 (in Vietnamese).
- [14] B.K. Hung, N.V. De, V.D. Le, et al. (2016), "Prevalence of soil-transmitted helminths and molecular clarification of hookworm species in ethnic Ede primary schoolchildren in Dak Lak province, Southern Vietnam", *Korean J. Parasitol.*, **54**(4), pp.471-476, DOI: 10.3347/kjp.2016.54.4.471.