

## NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA SÁN DÂY *ECHINOCOCCUS*

### A Study on Molecular Characteristics of *Echinococcus*

Nguyễn Thị Lan, Phạm Thanh An

Khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội  
Địa chỉ email tác giả liên lạc: lanjp2000@yahoo.com

#### TÓM TẮT

Hai phân đoạn gen ty thể CO1 và ND1 của 10 mẫu sán dây *Echinococcus* thu từ cừu, chó và người đã được thu nhận bằng phương pháp PCR (Polymerase chain reaction), ông hóa, giải trình tự, so sánh thành phần gen và phân tích quan hệ phả hệ. Kết quả phân tích và so sánh cho thấy, các mẫu sán thu được có tỷ lệ tương đồng cao với chủng Eg1 loài *Echinococcus granulosus*. Thành phần nucleotide của các gen thu nhận được có từ 2-4 vị trí sai khác so với trình tự tham khảo phổ biến. Sự sai khác này cho thấy tính đa hình của kiểu gen Eg1 tại các khu vực địa lý khác nhau, điều này có thể là vấn đề nên quan tâm để có phương hướng về phòng chống bệnh cho người và động vật nuôi.

Từ khóa: Chủng, *Echinococcus granulosus*, gen ty thể, nucleotide, PCR, phả hệ.

#### SUMMARY

Two partial mitochondrial genes (CO1 and ND1) of 10 *Echinococcus* isolates from sheep, dogs and humans were obtained by PCR, cloning, sequencing and then analyzed for genetic variation and phylogenetic relationship. Results showed that the nucleotide sequence of these samples had a high identity compared with that of Eg1 genotype (common sheep strain), *Echinococcus granulosus* species. There were 2-4 nucleotide sites which differed from the reference sequences. The difference in the obtained nucleotide sequences indicates the genetic polymorphism of Eg1 genotype, species of *E. granulosus* in different geographical regions over the world. This issue should be of concern in respect of disease control for humans and animals.

Key words: *Echinococcus granulosus*, strain, mitochondrial gene, nucleotide, PCR, phylogeny.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sán trưởng thành và ấu trùng thuộc giống *Echinococcus*, lớp sán dây, bộ Cyclophyllidea là tác nhân gây bệnh *Echinococcosis*. Đây là bệnh ký sinh trùng truyền lây nguy hiểm giữa người và động vật lưu hành rất rộng rãi, gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người và động vật và gây thiệt hại kinh tế cho người

chăn nuôi. Do vậy đã có rất nhiều nghiên cứu được tiến hành trên nhiều khía cạnh: phân loại, hình thái học, sinh thái học, bệnh học chẩn đoán, biện pháp phòng và trị bệnh (Kumaratilake và Thompson, 1982; Thompson và McManus, 2002; McManus và cs., 2003; Torgerson, 2003).

Việc phân loại giống *Echinococcus* trước đây chủ yếu dựa trên phương pháp truyền

thống là kiểm tra các đặc tính hình thái học bên ngoài và bên trong sinh vật đó. Tuy nhiên, phương pháp này còn gặp rất nhiều hạn chế như các mẫu sinh vật được thu có thể đang ở giai đoạn phát triển khác nhau, không thể xác định chính xác những sinh vật có hình thái bên ngoài tương đối giống nhau nhưng lại có những đặc điểm về di truyền và sinh học khác nhau, nhất là đối với những loài có vai trò quan trọng về y học. Hơn nữa không có nghiên cứu nào đánh giá được mức độ biến đổi đặc điểm hình thái của cùng một loài nhưng ở vùng địa lý hay các vật chủ khác nhau. Những hạn chế đó đã dẫn đến nhiều nhầm lẫn trong việc phân loại loài sinh vật này (Thompson và Lymbery, 1988). Sự phát triển mạnh mẽ của kỹ thuật sinh học phân tử đã mở ra những triển vọng nghiên cứu vô cùng to lớn. Áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để kiểm tra trực tiếp hệ gen của loài sinh vật cụ thể, cho phép phân loại lập phả hệ sinh vật đã đem lại nhiều hiệu quả do ADN có tính ổn định tương đối cao trong suốt đời sống của sinh vật, ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường, do đó có thể phân tích mẫu vật ở bất kỳ giai đoạn nào trong chu kỳ sống của sinh vật từ trứng đến trưởng thành.

Trong mỗi loài sinh vật nhân chuẩn (nhân có màng nhân bao bọc), đều tồn tại đồng thời hai hệ gen, hệ gen nhân và hệ gen ty thể, chúng quy định nên tất cả các đặc tính đặc trưng cho loài. Hệ gen ty thể giống *Echinococcus* ở dạng trần, mạch vòng, tốc độ tiến hóa nhanh hơn nhiều so với bất kỳ một gen nhân nào và chứa một số đoạn gen có tính bảo thủ cao (Bowles và cs., 2002; Bowles và McManus, 1993a,b). Trình tự nucleotide của các đoạn gen có tính bảo thủ cao là một công cụ rất hữu hiệu giúp phân loại và xác định mối quan hệ họ hàng trong và giữa các loài.

Nghiên cứu này chủ yếu tập trung nghiên cứu đặc tính sinh học phân tử của sán *Echinococcus* dựa trên hai đoạn gen có

tính bảo thủ cao trong hệ gen ty thể là CO1 (cytochrome C oxydase subunit 1) và ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1) nhằm mục đích nhận diện loài và xác định được các đặc tính của sán ở mức độ phân tử. Từ đó có thể phân loại các loại sán đang lưu hành và là cơ sở cho việc phòng bệnh cho động vật và người.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Mẫu và nguồn gốc mẫu

Mẫu sán sử dụng trong nghiên cứu này được Viện nghiên cứu Thú y và Động vật nuôi, Trường Đại học Qinghai (Trung Quốc) cung cấp.

Các mẫu sán (Bảng 1) thu từ các loại vật chủ chó, cừu và người, được lưu giữ trong ethanol 70% và bảo quản lạnh đến khi sử dụng.

### 2.2. Tách chiết ADN tổng số

Tách chiết ADN tổng số sử dụng bộ kit cột hấp phụ QIAamp ADN Mini Kit (QIAGEN K.K. Nhật Bản). Qui trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất cung cấp.

### 2.3. Thiết kế môi, thực hiện phản ứng PCR và thu nhận sản phẩm PCR

Cặp môi nhân gen CO1 (mũi xuôi: 5' T T T T T G G T C A T C C T G A G G T T T A T G 3'; mũi ngược: 5' C T A A C G A C A T A A C A T A A T G A A A A T G 3') và gen ND1 (mũi xuôi: 5' T T A T G G T A G A T A T T A T A G A G 3'; mũi ngược: 5' T C A A A T G G A G T A C G A T T A G T 3') được thiết kế dựa trên phân tích trình tự gen tương ứng của tất cả các loài, chủng của giống *Echinococcus* có trong ngân hàng gen, dùng cho phản ứng PCR thu nhận một phần gen CO1 có độ dài 444 bp và gen ND1 có độ dài 327 bp.

**Bảng 1. Danh sách mẫu sản sử dụng trong phân tích sinh học phân tử**

TT	Loài vật	Nơi ký sinh	Loại bệnh phẩm	Mã hiệu	
				Gen CO1	Gen ND1
1	Chó	Ruột non	Sán trưởng thành	EQC1	EQN1
2	Chó	Ruột non	Sán trưởng thành	EQC2	EQN2
3	Chó	Ruột non	Sán trưởng thành	EQC3	EQN3
4	Chó	Ruột non	Sán trưởng thành	EQC4	EQN4
5	Cừu	Gan	Dịch nang	EQC5	EQN5
6	Cừu	Gan	Dịch nang	EQC6	EQN6
7	Cừu	Gan	Vỏ nang	EQC7	EQN7
8	Cừu	Gan	Vỏ nang	EQC8	EQN8
9	Người	Gan	Dịch nang	EQC9	EQN9
10	Người	Gan	Vỏ nang	EQC10	EQN10

Sau khi thu được ADN tổng số, tiến hành phản ứng PCR với thành phần hỗn hợp cho 1 mẫu có thể tích là 25l (2,5l PCR buffer 10X, 0,5l dNTP 10mM, 1l MgSO<sub>4</sub> 50mM, 1l Primer Mix (10pmol/l), 0,2l Platinum Taq ADN Polymerase, 18,8l nước, 1l khuôn) và chu trình nhiệt như sau: nhiệt độ để đun chảy ban đầu là 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [94°C/1 phút, 58°C/30 giây, 72°C/1 phút], 72°C/10 phút và giữ sản phẩm ở 4°C đến khi sử dụng. Kiểm tra sản phẩm trên thạch agarose 1%.

#### 2.4. Tinh sạch và tách dòng sản phẩm PCR từ gel điện di

Băng sản phẩm PCR được thu từ gel sau đó tinh sạch bằng bộ hóa chất QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN K.K. Nhật Bản) theo qui trình kèm theo. Sản phẩm tinh sạch được dòng hóa vào vector tách dòng và được chuyển nạp vào vi khuẩn *E.coli* chủng JM109 theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Nuôi cấy chọn lọc các vi khuẩn rồi tách chiết ADN plasmid tái tổ hợp sử dụng bộ hóa chất QIA Prep Spin Miniprep Kit.

#### 2.5. Giải trình tự và phân tích số liệu

ADN của CO1 và ND1 có trong vector pGEM-T Easy tái tổ hợp được tinh sạch rồi xác định trình tự theo nguyên lý của phương pháp enzym học của Sanger nhờ bộ hóa chất Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit.

Tiến hành phản ứng PCR giải trình tự chu kỳ nhiệt khuếch đại trong máy luân nhiệt theo chu trình: biến tính 96°C trong 1 phút; 25 chu kỳ: 96°C/30 giây, 50°C/15 giây, 60°C/ 4 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng giải trình tự được tinh sạch và đưa vào máy đọc trình tự gen tự động ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

#### 2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Chromas 2.3.3.0. So sánh đối chiếu các chuỗi nucleotit và xây dựng phả hệ bằng chương trình MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Sử dụng trình tự nucleotide của các đoạn gen tương ứng công bố trong ngân hàng gen (Bảng 2) để phân tích, so sánh về thành phần nucleotide và xây dựng cây phả hệ.

**Bảng 2. Ký hiệu, nguồn gốc, vật chủ và mã số truy cập của các loài, chủng *Echinococcus* sử dụng trong nghiên cứu**

Loài	Chủng	Ký hiệu	Nguồn gốc	Vật chủ	Mã số truy cập	
					COI	NDI
<i>E.granulosus</i>	G1	Eg1	Nhiều quốc gia	Cừu	AF297617	AJ237632
<i>E.granulosus</i>	G2	Eg2	Tasmania	Cừu	M84662	AJ237633
<i>E.granulosus</i>	G3	Eg3	Ấn Độ	Trâu	M84663	AJ237634
<i>E.granulosus</i>	G4	Eg4	Châu Âu	Ngựa	M84664	AJ237635
<i>E.granulosus</i>	G5	Eg5	Châu Âu, Ấn Độ	Bò	M84665	AJ237636
<i>E.granulosus</i>	G6	Eg6	Sudan, Somalia	Lạc đà	M84666	AJ237637
<i>E.granulosus</i>	G7	Eg7	Phần Lan	Lợn	M84667	AJ237638
<i>E.granulosus</i>	G8	Eg8	Estonia, Mỹ	Nai sừng tấm	EU151431	AJ237643
<i>E.granulosus</i>	G10	Eg10	Finland	Hươu, nai	AF525457	AF525297
<i>E.multilocularis</i>	Em1	Em1	Alaska	Loài gặm nhấm	M84668	AJ237639
<i>E.multilocularis</i>	Em2	Em2	Đức	Loài gặm nhấm	M84669	AJ237640
<i>E.oligarthrus</i>	-	Eo	Panama	Loài gặm nhấm	M84671	AJ237642
<i>E.vogeli</i>	-	Ev	Nam Mỹ	Loài gặm nhấm	AB208546	AJ237641
<i>E.shiquicus</i>	-	Es	Trung Quốc	Pika	AB159136	AB159137
<i>Taenia saginata</i>	-	T.saginata			AY684274	AY684274

*Ghi chú: - Không phân chia các chủng do chỉ có 1 loài duy nhất*

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sản phẩm PCR đoạn gen CO1 và ND1

Tiến hành phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi nhân hai đoạn gen CO1 và ND1 và chu trình nhiệt như đã trình bày. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và soi phát hiện dưới ánh sáng tử ngoại (Hình 1A và 1B). Hình ảnh điện di đã khuếch đại được cả hai đoạn gen CO1 và ND1 ở 10 mẫu sán kiểm tra. Sản phẩm PCR cho 2 cặp mồi tương ứng thu được là đặc hiệu, đều có một dải băng sáng tập trung trên bản gel, không có vạch phụ và có độ dài vào khoảng 444 bp cho gen CO1 và khoảng 327 bp cho gen ND1 so với thang chuẩn như dự kiến.

#### 3.2. Trình tự nucleotide của gen CO1 và ND1

Thu băng ADN trên gel điện di, gắn vào vec tơ tách dòng pGEM-T Easy tạo plasmid tái tổ hợp. Các plasmid tái tổ hợp này được chuyển nạp vào tế bào vi khuẩn khả biến *E.coli* JM109. Nuôi cấy trên mặt thạch LB có bổ sung kháng sinh và chỉ thị màu. Chọn lọc các khuẩn lạc màu trắng ngà có khả năng chứa plasmid tái tổ hợp và nuôi cấy trong môi trường LB lỏng để thu nhận ADN plasmide, sau đó giải trình tự toàn bộ ADN plasmid tái tổ hợp mang đoạn sản phẩm khuếch đại và phân tích chuỗi gen. Nghiên cứu đã thu được 10 chuỗi trình tự nucleotide đoạn gen CO1 và 10 cho đoạn ND1 tương ứng với từng sản phẩm PCR. Phân tích và

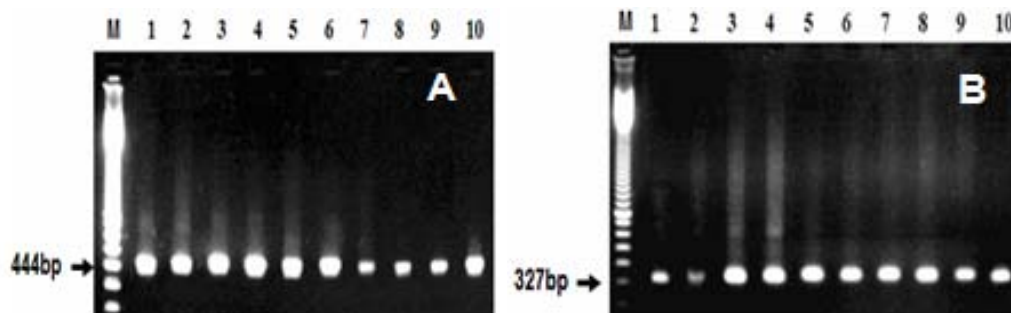
xử lý trình tự thu được bằng phần mềm sinh học Chromas 2.3.3.0 kết quả cho thấy, tất cả trình tự đoạn ADN của gen CO1 và ND1 thu được từ các mẫu sán có chiều dài 444 và 327 cặp bazơ tương ứng.

#### 3.3. Kết quả truy cập ngân hàng gen

Trình tự nucleotide từ hai đoạn gen được truy cập ngân hàng gen tìm kiếm trình tự tương đồng. Kết quả cho thấy, trình tự ADN của hai gen CO1 và ND1 từ các mẫu sán thu được đều có độ tương đồng cao nhất với chủng Eg1 của loài *Echinococcus granulosus*. Độ tương đồng đều đạt 99%. Điều đó có thể nhận xét trình tự các gen thu nhận được là từ chủng Eg1 loài *E.granulosus*.

#### 3.4. So sánh thành phần gen CO1 và ND1 của chủng *Echinococcus granulosus* nghiên cứu với một số chủng đã công bố

Để làm sáng tỏ hơn về sự tương đồng của các trình tự, nghiên cứu này tiến hành so sánh đối chiếu thành phần nucleotide của các phân đoạn gen CO1 và ND1 thu từ các mẫu sán ở Qinghai với trình tự cùng đoạn gen này trong Ngân hàng gen quốc tế (gen CO1 do Le và cs. công bố năm 2002 với mã số truy cập AF297617; gen ND1 do Bowles và McManus công bố năm 1993 với mã số truy cập AJ237632). Đây là chủng phổ biến nhất, được phát hiện ở nhiều quốc gia và đã được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử.



Hình 1. A- Sản phẩm PCR đoạn gen CO1;

B- Sản phẩm PCR đoạn gen ND1 trên thạch agarose 1%

M: thang ADN chuẩn (MWM XIV 123bp); giếng số 1 đến 4: ADN của sán trưởng thành; giếng số 5-8: ADN của nang sán ừ; giếng số 9 và 10: ADN của nang sán người



Kết quả giống hàng trình tự nucleotide đoạn gen CO1 (Hình 2) cho thấy, các mẫu sán phân lập được có độ tương đồng cao với trình tự so sánh, đạt 99,09% - 99,54%, chúng chỉ sai khác bởi 2 đến 4 vị trí nucleotid (Bảng 4). Trình tự EQC1 có 3 vị trí khác với trình tự so sánh là vị trí nucleotide thứ 8 (T thay thế cho C), 66 (A/T) và 146 (C/T). Hai trình tự EQC2 và EQC6 tương đồng hoàn toàn với nhau, khác trình tự so sánh tại các vị trí 6 (T/G), 8 (G/C) và 146 (C/T). Ba vị trí nucleotide sai khác được phát hiện trong trình tự EQC3 là vị trí 8 (T/C), 85 (A/T) và 146 (C/T). Bốn trình tự nucleotide EQC4, EQC5, EQC7 và EQC10 là tương đồng 100% với nhau và chỉ khác với chủng so sánh tại 2 vị trí nucleotide thứ 8 (T/C) và 146 (C/T). Trình tự mẫu EQC8 khác tại 3 vị trí 8 (T/C), 146 (C/T) và 149 (C/G). EQC9 có 4 vị trí nucleotide khác biệt là 6 (T/G), 8 (G/C), 97 (C/G) và 146 (C/T). Kết quả so sánh cho thấy, tất cả các trình tự thu được đều khác với trình tự so sánh tại 2 vị trí nucleotide là 8 và 146.

Kết quả giống hàng ở hình 3 cho thấy, trình tự đoạn ADN của gen ND1 có độ tương đồng cao với đoạn gen ND1 do Bowles và McManus công bố năm 1993 trong Ngân hàng gen quốc tế. Độ tương đồng đạt 99,08% - 99,38%, các trình tự khác nhau từ 2 đến 3 nucleotide (Bảng 4). Chín trình tự, EQN1, EQN2, EQN3, EQN4, EQN6, EQN7, EQN8, EQN9 và EQN10 là giống hệt nhau và đều khác với trình tự so sánh bởi 2 nucleotide, đó là nucleotide ở vị trí thứ 145 (T thay thế C) và 319 (T/G). Trình tự EQN5 khác ở 3 vị trí thứ 58 (C/T), 145 (T/C) và 319 (T/G). Như vậy có thể thấy tất cả các trình tự trong nghiên cứu này đều có vị trí nucleotide khác với trình tự so sánh tại 2 vị trí nucleotid thứ 145 và 319.

Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide các đoạn gen CO1 và ND1 từ mẫu sán kiểm tra cho thấy có sự sai khác ở một số vị trí nucleotide với chủng Eg1 tham khảo. Kết quả này cũng được báo cáo trong nhiều công trình nghiên cứu như Bart và cs. (2005) và Ma và cs. (2005) mô tả 3 kiểu gen Eg1 khác với chủng Eg1 tham khảo (AF297617) trong 26 mẫu sán kiểm tra ở

Romania, 10/ 87 mẫu ở Trung Quốc và 22/71 mẫu sán được kiểm tra ở Algeria và Ethiopia; Vural & cs. (2008), Kamenetzky & cs. (2002) và Rozenzvit & cs. (1999) phát hiện có nhiều biến thể của kiểu gen Eg1 ở các mẫu sán thu từ các vật chủ, khu vực phân bố khác nhau ở Thổ Nhĩ Kỳ và Argentina ở cả hai đoạn gen CO1 và ND1. Ngoài ra nhiều biến thể của kiểu gen Eg1 khác cũng được tìm thấy ở Morocco, Úc, Hy Lạp, Ấn Độ... với mã truy cập tương ứng trên ngân hàng Gen quốc tế lần lượt là: EF367291, AJ508063, DQ856469, EF423800. Tất cả biến thể đã báo cáo sai khác không quá 6 vị trí nucleotide so với chủng tham khảo. Điều này được lý giải bởi sự đa hình kiểu gen trong chủng Eg1 có thể do ảnh hưởng lâu dài của các nhân tố địa lý, vật chủ khác biệt. So sánh với các biến thể đã công bố (kết quả không trình bày), cho thấy không có trình tự nucleotide nào trong nghiên cứu này là tương đồng hoàn toàn với những biến thể đã công bố. Do vậy, chúng tôi cho rằng trình tự nucleotide từ mẫu sán trong nghiên cứu này là những biến thể mới của chủng Eg1 trên cả hai đoạn gen CO1 và ND1.

Kết quả giống hàng trình tự nucleotide của hai đoạn gen cũng cho thấy, kiểu gen thu được từ mẫu sán trưởng thành ký sinh ở vật chủ cuối cùng (chó) và các nang sán ở vật chủ trung gian (cừu và người) mắc bệnh có sự tương đồng rất cao với nhau, đặc biệt ở đoạn gen ND1. Điều này khẳng định loài sán gây bệnh trên cả 2 loại vật chủ đều do cùng một chủng gây ra.

Phân tích gen và hệ gen (genome) của cơ thể có ý nghĩa quan trọng để nhận diện và phân loại sinh vật. Đồng thời dựa trên các số liệu phân tích này, xây dựng cây phả hệ sẽ phản ánh chính xác mối quan hệ họ hàng của chúng. Bởi vì trình tự các nucleotid trong ADN cũng như trình tự các axit amin trong protein của cơ thể càng giống nhau thì chúng càng có họ hàng thân thuộc với nhau. Do vậy, để xác định mẫu sán phân tích có mối quan hệ họ hàng ra sao với các loài, chủng đã công bố, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phả hệ dựa trên bộ số liệu đoạn gen CO1 và ND1 đã thu được.

AJ237632-Eg1-ND1	TTA	TGG	TAG	ATA	TTA	TAG	AGC	TAG	TTA	TAG	AGG	CCT	CTC	CGT	GTT	45
EQN1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
AJ237632-Eg1-ND1	GTG	GTT	TTT	GGC	TGC	CGC	CAG	AAC	ATC	TAG	GTA	TTC	TTT	GTT	GTG	90
EQN1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
AJ237632-Eg1-ND1	TAC	TGG	TTG	GGG	TGG	TTA	CAA	CAA	TTA	TTC	ATT	TTT	AAG	GTC	GGT	135
EQN1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
AJ237632_Eg1-ND1	TCG	ATG	TGC	CTT	TGG	ATC	TGT	TAG	GTT	TGA	GGC	TTG	TTT	TAT	GTG	180
EQN1	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN2	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN3	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN4	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN5	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN6	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN7	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN8	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN9	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN10	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
AJ237632_Eg1-ND1	TGT	GGT	GAT	TTT	TTG	TGC	TTT	GTG	TAG	TTG	TAG	GTA	TAA	TTT	AAT	225
EQN1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
AJ237632-Eg1-ND1	TGA	TTT	TTA	TTA	TAA	TTG	TTG	ATT	AAG	TTT	GTT	ATT	ATT	TCC	ATT	270
EQN1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
AJ237632-Eg1-ND1	AAT	TTA	TGT	GTT	ATT	TTT	AAT	ATG	TAT	ATT	GTG	TGA	AAC	TAA	TCG	315
EQN1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
EQN10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
AJ237632-Eg1-ND1	TAC	GCC	ATT	TGA												327
EQN1	...	T..	...	...												
EQN2	...	T..	...	...												
EQN3	...	T..	...	...												
EQN4	...	T..	...	...												
EQN5	...	T..	...	...												
EQN6	...	T..	...	...												
EQN7	...	T..	...	...												
EQN8	...	T..	...	...												
EQN9	...	T..	...	...												
EQN10	...	T..	...	...												

Hình 3. So sánh trình tự giữa đoạn ADN của gen ND1 từ mẫu sán thu được với đoạn ADN đặc hiệu tương ứng của chủng Eg1 trong Ngân hàng gen quốc tế AJ237632, mã số truy cập chủng Eg1; EQN1-EQN10, trình tự mẫu sán phân tích; dấu chấm “.” biểu thị các nucleotide tương đồng, sai khác về nucleotide được thể hiện bằng chính chữ cái ký hiệu của chúng



### 3.5. Kết quả phân tích mối quan hệ phả hệ

Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm sinh học MEGA 3.1 dựa trên bộ số liệu của gen CO1 và ND1 từ các mẫu sán phân tích và các chủng, loài họ hàng của giống *Echinococcus* đã được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế (Bảng 2); sử dụng loài *Taenia saginata* mã truy cập là AY684274 làm gốc cây phát sinh. Kết quả được biểu hiện ở hình 4.

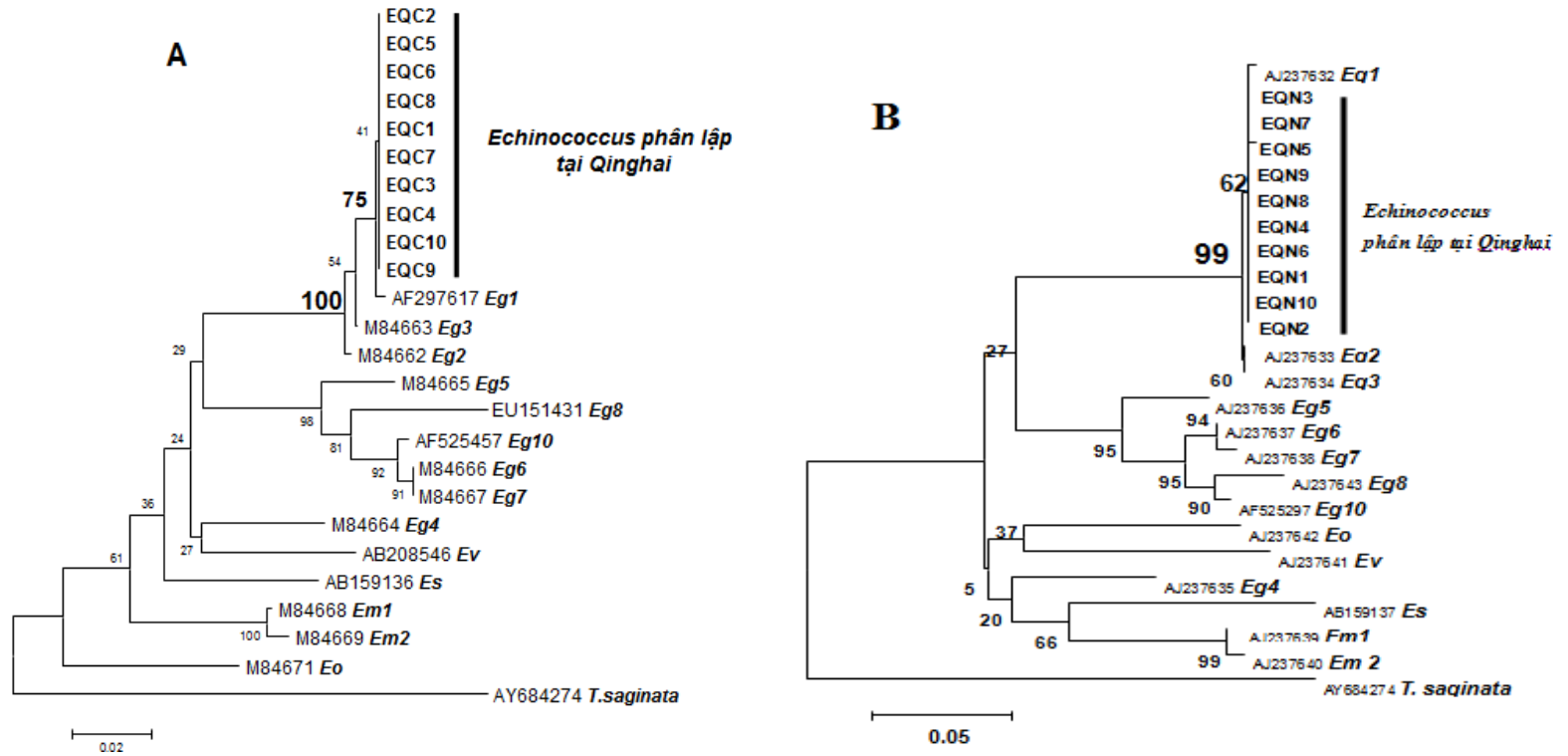
Đúng như kết quả phân tích trình tự nucleotide, kết quả phân tích quan hệ phả hệ cho thấy tất cả các mẫu sán phân lập được tập hợp trong loài *E.granulosus* trên cả 2 cây phả hệ. Chúng cùng 3 chủng có họ hàng gần gũi Eg1, Eg2 và Eg3 lập nên một nhóm với độ tin cậy đạt 100% ở cây CO1 và 99% ở cây ND1. Trong nhóm chủng này, trình tự các mẫu sán nghiên cứu được nhóm với chủng Eg1 ở cả 2 cây và có độ tin cậy tương đối cao, 75% và 62% ở cây CO1 và ND1.

Như vậy, số liệu về sinh học phân tử khẳng định mẫu sán mà chúng tôi nghiên cứu là chủng Eg1, loài *E.granulosus*. Kết quả này là phù hợp với nghiên cứu của McManus, Ding và Bowles, 1994; Chai, 1995). Các tác giả này cho biết, chủng Eg1 loài *E.granulosus* là tác nhân gây bệnh chủ yếu cho người và động vật ở Trung Quốc trong đó các loài chó nuôi, chó sói, cáo là vật chủ cuối cùng, còn cừu, yak, lợn, dê, lạc đà, hươu, ... là các vật chủ trung gian cho chúng.

Sự sai khác xuất hiện ở một số vị trí trong các trình tự nucleotide thu được cho thấy sự đa hình về kiểu gen của chủng Eg1 loài *E.granulosus* tại Qinghai. Kết quả này góp phần làm sáng tỏ hơn nữa về đặc điểm này của kiểu gen trong loài *E.granulosus* ở các khu vực địa lý khác nhau. Điều đó có thể dẫn đến sự biến đổi về các đặc tính sinh học của sán như đặc điểm hình thái học, đặc tính gây bệnh, tính kháng nguyên miễn dịch... của loài cũng như làm giảm hiệu quả của các chiến lược phòng bệnh. Do vậy các nghiên cứu trong tương lai cần tiến hành kiểm tra ảnh hưởng của những biến thể này, từ đó làm cơ sở cho việc đề ra các biện pháp khống chế bệnh bảo vệ con người cũng như các động vật mắc cảm.

## 4. KẾT LUẬN

Các mẫu sán thu từ các loài vật chủ khác nhau (chó, cừu, người) được xác định là chủng Eg1 của loài *Echinococcus granulosus* qua kỹ thuật sinh học phân tử. Các kiểu gen thu được từ các mẫu sán nghiên cứu có từ 2-4 nucleotide sai khác với chủng Eg1 phổ biến trên thế giới, biểu thị sự đa hình về kiểu gen của chủng này ở các khu vực địa lý khác nhau. Sáu biến thể của đoạn gen CO1 và 2 của đoạn gen ND1 của chủng Eg1 loài *Echinococcus granulosus* được phát hiện từ các mẫu sán thu tại Qinghai.



**Hình 4. Cây phả hệ từ số liệu gen CO1 (A) và ND1 (B)**

Số ở gốc các nhánh biểu thị độ tin cậy với 1000 lần lặp lại.

Mã số truy cập Ngân hàng gen quốc tế phân trước tên mỗi loài, chủng loài họ hàng.

Thanh (bar) thể hiện khoảng cách di truyền.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bart, J. M., Morariu, S., Knapp, J., Ilie, M.S., Pitulescu, M., Anghel, A., Cosoroaba, I., Piarroux, R (2005). Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res* 98, 130–137.
- Bowles, J., Blair, D. and McManus, D. P (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial ADN sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54, 165–173.
- Bowles, J. and McManus, D. P (1993a). NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *InteARNtional JouARNI for Parasitology* 23, 969–972.
- Bowles, J. and McManus, D. P (1993b). Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Tropica* 53, 291–305.
- Chai, J. J (1995). Epidemiological studies on cystic *Echinococcus* in China – a review. *Biomedical and Environmental Sciences* 8, 122–136.
- Kamenetzky L., Gutierrez A.M., Canova S.G., Haag K.L., Guarnera E.A., Parra A., Garca G.E., Rosenzvit M.C (2002). Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 2, 129-136.
- Kumaratilake L. M. and Thompson R. A. C. (1982). A review of the Taxonomy and Speciation of the Genus *Echinococcus Rudolphi* 1801. *Z Parasitenkd* 68, 121-146.
- Ma, S. M., Maillard S., Zhao, H. L., Huang, X., Wang, H., Geng, P. L., Bart, J.-M., Piarroux, R. (2008). Assessment of *Echinococcus granulosus* polymorphism in Qinghai Province, People’s Republic of China. *Parasitol Res* 102, 1201–1206.
- McManus, D. P., Ding, Z. and Bowles, J. (1994). A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in northwestern China. *Acta Tropica* 56, 7–14.
- McManus, D.P., Zhang,W., Li, J., Bartley, P.B. (2003). Echinococcosis. *Lancet* 362, 1295–1304.
- Rosenzvit, M. C., Zhang, L. H., Kamenetzky, L., Canova, S. G., Guarnera, E. A. and McManus, D. P. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118, S523–S530.
- T. H. Le, M. S. Pearson, D. Blair, N. Dai, L. H. Zhang and D. P. McManus (2002). Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 124, 97-112.
- Thompson, R.C.A. and Lymbery, A.J. (1988). The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology*. 27, 210–263.
- Thompson, R.C.A. and McManus P. D. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology* 18.
- Torgerson P. R. (2003). Economic effects of Echinococcosis. *Acta Tropical* 85, 113-118.
- Vural G., Baca U. A., Gauci G. C., Bagci O., Gicik Y., Lightowlers M. W. (2008). Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol* 154, 347-350.