

ĐÁNH GIÁ, SO SÁNH HIỆU QUẢ ỨNG DỤNG HAI KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM MẦM BỆNH SÁN LÁ GAN LỚN Ở ỐC *LYMNAEA VIRIDIS*

BÙI THỊ DUNG, HOÀNG VĂN HIỀN
Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Bệnh sán lá gan lớn (Fascioliasis) là bệnh ký sinh trùng gây ra bởi 2 loài sán *Fasciola hepatica* và *Fasciola gigantica*, bệnh phổ biến ở gia súc và người là vật chủ nhiễm tự nhiên. Bệnh phân bố rộng trên toàn thế giới, đặc biệt là những nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam.

Ở nước ta, bệnh sán lá gan lớn có xu hướng tăng nhanh trong những năm gần đây. Qua chu trình phát triển của sán lá gan, có thể thấy ốc nước ngọt đóng vai trò quan trọng trong việc truyền bệnh sán lá gan. Đã có một số công trình công bố hai loài ốc *Lymnaea viridis* và *Lymnaea swinhoei* đóng vai trò vật chủ trung gian truyền bệnh sán lá gan lớn (Phan Dịch Lân, 1983; Hồ Thị Thuận & Nguyễn Ngọc Phương, 1987; Nguyễn Trọng Kim và Phạm Ngọc Vĩnh, 1997; Nguyễn Thị Kim Thành và cs., 1995; Đặng Tất Thế & Nawa, 2005; Đỗ Đức Ngái và cs., 2006). Xác định tình hình nhiễm sán lá gan lớn ở ốc đóng vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu dịch tễ học bệnh sán lá gan lớn. Phương pháp chủ yếu đã được các tác giả trước đây sử dụng rộng rãi để phát hiện ấu trùng sán lá gan lớn ở ốc là phương pháp ép ốc thường quy. Tuy nhiên, chưa có công trình nào công bố sử dụng phương pháp sinh học phân tử trong việc phát hiện mầm bệnh sán lá gan ở ốc ở nước ta. Vì vậy, nghiên cứu này bước đầu sử dụng và so sánh hiệu quả của hai phương pháp (phương pháp ép ốc và phương pháp phân tử PCR đa môi) trong việc phát hiện mầm bệnh sán lá gan lớn ở ốc.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu nghiên cứu

Mẫu ốc *Lymnaea* được thu thập tại huyện Lục Nam, Bắc Giang vào tháng 3 năm 2011. Sau đó, mẫu ốc chuyển về phòng thí nghiệm Ký sinh trùng, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật để tiến hành xét nghiệm.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp định loại ốc:

Mẫu ốc: định loại theo khóa định loại của Đặng Ngọc Thanh (1980).

Mẫu ấu trùng *Fasciola* spp.: định loại theo khóa định loại của Shell (1985).

2.2. Phương pháp xét nghiệm ấu trùng sán lá gan lớn:

Phương pháp ép ốc:

Mẫu ốc được rửa sạch dưới nước vòi trước khi tiến hành xét nghiệm. Sử dụng 2 tấm kính có kích thước 15 cm x 25 cm. Sau đó, đặt khoảng từ 10 đến 15 cá thể ốc trên tấm kính. Dùng tấm kính còn lại đặt lên phía trên rồi dùng lực ép mạnh tới khi vỏ ốc vỡ. Mẫu được kiểm tra dưới kính lúp để phát hiện ấu trùng sán lá gan.

Đặc điểm hình dạng cercaria của sán lá gan lớn *Fasciola gigantica* (Ditric và cs, 1992; Doanh & Le, 2005): Cercaria thuộc nhóm Gymnocephalous có chứa tế bào xâm nhập. Bề mặt cơ thể có gai nhỏ. Đuôi không chẻ đôi. Giác bụng lớn hơn giác miệng. Hầu hình cầu. Thực quản phân nhánh ở phía trước giác bụng, ruột kéo dài tới phía cuối cơ thể. Có nhiều tế bào tạo nang. Túi bài tiết thon dài. Ống đuôi phân nhánh ở vị trí một phần tư của chiều dài đuôi.

Đo kích thước và ghi lại kết quả xét nghiệm bằng phương pháp ép của từng mẫu ốc. Sau đó, từng mẫu ốc xét nghiệm được lưu trữ trong cồn 70% để phân tích phân tử sau này. Toàn bộ mẫu ốc xét nghiệm được chuyển tới phân tích phân tử tại phòng thí nghiệm Ký sinh trùng, Khoa Y học Thú Y, Trường Đại học Tổng hợp Liège, Bỉ.

Tách chiết DNA

Sử dụng phương pháp tách chiết DNA Chelex®: mẫu ốc được nghiền nát bằng que nghiền (TrefLab). Sau đó thêm 200µl dung dịch Chelex® 5% (Bio Rad) và ủ 1 tiếng ở nhiệt độ 56°C, 30 phút ở 95°C trong máy MJ Research với chương trình Chelex. Sau khi ủ, mẫu được li tâm ở 13000 vòng trong 7 phút. Phần dịch trên chính là DNA được lấy sang ống mới và lưu trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

PCR đa môi

Thí nghiệm PCR đa môi khuếch đại lặp đi lặp lại trình tự DNA 124bp của sán lá gan *Fasciola* sp. và trình tự rDNA ITS-2 của ốc (500-600bp). Đoạn môi sử dụng cho *Fasciola* sp. là: Fsh1 (5'-GAT-CAA-TTC-ACC-CAT-TTC-CGT-TAG-TCC-TAC-3') và Fsh2 (5'-AAA-CTG-GGC-TTA-AAC-GGC-GTC-CTA-CGG-GCA-3'), và đoạn môi cho ốc ITS-2 News2 (5'-TGT-GTC-GAT-GAA-GAA-CGC-AG-3') và ITS2 Rixo (5'-TTC-TAT-GCT-TAA-ATT-CAG-GGG-3'). Sự tập trung các đoạn môi khác nhau được kiểm tra và kết quả đạt được với 5µM đối với môi *Fasciola* sp. và 50µM đối với môi ITS-2. Trình tự được khuếch đại bằng cách sử dụng Kit (Tap PCR Master Mix, Qiagen) có chứa MgCl₂ (3mM) và 400µM của mỗi dNTP. Sự khuếch đại được thực hiện trong tổng số 25µl trong máy PCR MJ Research theo chu trình như sau: bước làm biến tính đầu tiên ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, sau đó 40 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 1 phút, ủ ở 56°C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút và cuối cùng kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm khuếch đại được chạy điện di trên gel agarose 2% và nhuộm với ethidium bromide. Vạch ITS-2 được xem như là vạch kiểm tra chung bởi vì nếu không có vạch này trong hình điện di cho thấy sự có mặt của chất ức chế PCR. Để giảm các bước lặp lại quy trình PCR, 10 ống (gồm 9 ống chứa 10 ốc và 1 ống chứa 6 ốc) được dùng để trộn 1µl của mỗi mẫu DNA. Hỗn hợp mẫu này không pha loãng và 1µl được kiểm tra bằng phương pháp PCR đa môi. Để đánh giá ảnh hưởng của chất ức chế PCR, khi những mẫu không thấy vạch ITS-2 ở ảnh điện di thì sẽ pha loãng mẫu với tỉ lệ 1/10, 1/20, 1/100, sau đó kiểm tra lặp lại với PCR đa môi.

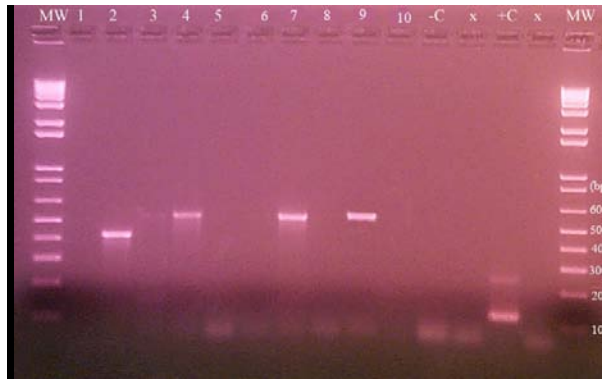
II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu

Sử dụng hai phương pháp xét nghiệm mầm bệnh sán lá gan lớn cho 100 mẫu ốc *Lymnaea viridis* chúng tôi thu được kết quả như sau:

Phương pháp ép ốc: Không tìm thấy ấu trùng sán lá gan lớn *Fasciola* spp. trong 100 mẫu.

Phương pháp PCR đa môi: Điện di sản phẩm PCR đa môi cho thấy mẫu số 2,4,7 không bị nhiễm sán lá gan lớn *Fasciola* sp., những mẫu còn lại 1, 3, 5, 6, 8, 10 bị ảnh hưởng của chất ức chế PCR nên không thấy vạch ITS-2 trên ảnh điện di (Hình 1).



Hình 1: Điện di sản phẩm PCR đa môi của 10 ống DNA hỗn hợp

(M) Đánh dấu kích cỡ phân tử của 1000bp.

(2), (4), (7): mẫu DNA của ốc không nhiễm *Fasciola* sp.; (1), (3), (5), (6), (8), (9): Ảnh hưởng của chất ức chế PCR, khi những mẫu không thấy vạch ITS-2 ở ảnh điện di;

(-C): Mẫu đối chứng không nhiễm *Fasciola* sp.; (+C): Mẫu đối chứng nhiễm *Fasciola* sp.

Pha loãng mẫu số 1, 3, 5, 6, 8, 10 với tỉ lệ như sau: 1/10; 1/20; 1/100. Tiến hành chạy PCR đa môi theo chu trình như trên cho những mẫu này. Kết quả điện di sản phẩm PCR đa môi cho thấy: mẫu số 5 nhiễm sán lá gan lớn *Fasciola* sp. thể hiện trên vạch Fhs1, Fhs2 cùng với mẫu đối chứng nhiễm sán lá gan lớn (+C). Các mẫu còn lại đều không nhiễm sán lá gan lớn (Hình 2).



Hình 2: Điện di sản phẩm PCR đa môi của mẫu số 1, 3, 5, 6, 8, 10 với tỉ lệ pha loãng 1/10, 1/20, 1/100

Mẫu số 5 nhiễm sán lá gan lớn, các mẫu còn lại 1, 3, 6, 8, 10 không nhiễm sán lá gan lớn.

(M): Đánh dấu kích cỡ phân tử của 1000bp;

(C-) mẫu đối chứng không nhiễm sán lá gan lớn; (C+) mẫu đối chứng nhiễm sán lá gan lớn.

2. Thảo luận

Sử dụng hai phương pháp khác nhau trong việc phân tích, phát hiện mầm bệnh sán lá gan lớn *Fasciola* sp. ở 100 mẫu ốc cho thấy kết quả khác nhau. Không tìm thấy mẫu ốc nào nhiễm ấu trùng sán lá gan lớn khi sử dụng phương pháp ép, trong khi đó có 1 mẫu nhiễm ấu trùng sán lá gan lớn khi sử dụng phương pháp phân tử PCR đa môi.

Đối với phương pháp ép ốc, không tìm thấy mẫu ốc *Lymnaea viridis* nào trong số 100 mẫu xét nghiệm nhiễm ấu trùng sán lá gan lớn. Mặc dù đây là phương pháp phổ biến, được rất nhiều nhà ký sinh trùng học sử dụng trong việc điều tra tình hình nhiễm mầm bệnh sán lá gan ở ốc, như công trình của Phan Địch Lâm (1983), Vũ Sĩ Nhân (1989), Nguyễn Trọng Kim (1997),

Nguyễn Thị Lê và cs. (2005), Đỗ Đức Ngái và cs. (2006)... Đây là phương pháp đơn giản, nhanh, dễ sử dụng, rẻ, cho phép phát hiện trực tiếp mẫu ấu trùng sán lá gan lớn, có thể phát hiện các dạng ấu trùng khác nhau như: sporocyst, redia, cercaria. Phương pháp này có thể sử dụng ở mọi nơi ngay trên thực địa chỉ cần có một kính lúp đảm bảo yêu cầu. Tuy nhiên, một số mặt hạn chế của phương pháp này cho thấy việc xác định tỉ lệ nhiễm chậm, phải dành nhiều thời gian trong việc xét nghiệm, người xét nghiệm phải có nhiều kinh nghiệm trong việc định loại hình thái ấu trùng *Fasciola* nếu không kết quả sẽ thiếu độ tin cậy. Đặc biệt, khi sử dụng phương pháp này thì chỉ có thể nhận biết được mầm ấu trùng *Fasciola* khi mà mẫu ấu thực sự nhiễm và ấu trùng phát triển ở giai đoạn tiếp theo sau giai đoạn Miracidia.

Cho đến nay ở nước ta chưa có công trình nào công bố về việc sử dụng phương pháp sinh học phân tử trong việc xét nghiệm mầm bệnh sán lá gan ở ốc. Nhưng trên thế giới đã có rất nhiều công trình công bố sử dụng phương pháp sinh học phân tử trong việc xét nghiệm mầm bệnh sán lá gan lớn ở ốc (Bargue và cs., 2001; Bargue & Mas-Coma, 2005; Caron và cs., 2007; Margalhães và cs., 2008...). Do vậy, đây là thí nghiệm bước đầu chúng tôi sử dụng phương pháp PCR đa mồi đối với ốc *Lymnaea viridis*. Phương pháp PCR đa mồi là phương pháp ứng dụng cho kết quả thông tin chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Đặc biệt, phương pháp PCR đa mồi sử dụng hiệu quả trong nghiên cứu dịch tễ học. Sử dụng phương pháp này có thể phát hiện mầm bệnh sán lá gan lớn ở ốc ở giai đoạn sớm, trong khi đó phương pháp ép không thể phát hiện được khi không nhìn thấy các dạng ấu trùng phát triển trong ốc. Điều này có thể giải thích tại sao không tìm thấy mẫu ốc nào trong số 100 mẫu ốc xét nghiệm bằng phương pháp ép. Toàn bộ số mẫu ốc này được thu vào tháng 3 năm nay, có thể thời điểm này là thời điểm ốc mới nhiễm, ấu trùng chưa đủ thời gian phát triển thành các giai đoạn mà có thể nhìn thấy bằng phương pháp ép ốc. Tuy nhiên, phương pháp này tốn nhiều kinh phí hơn so với phương pháp ép thường quy.

Do vậy, lựa chọn phương pháp xét nghiệm ốc là rất quan trọng. Lựa chọn phương pháp nào thì phải tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu, vì phương pháp nào cũng có cả hai mặt ưu điểm và nhược điểm. Tuy nhiên, nên sử dụng cả hai phương pháp để đạt được hiệu quả cao hơn trong điều tra tình trạng dịch tễ học tại vùng nghiên cứu, nhằm đánh giá chính xác vai trò của vật chủ trung gian trong việc phát tán và truyền bệnh sán lá gan lớn cho người và gia súc.

III. KẾT LUẬN

Sử dụng hai phương pháp ép ốc thường quy và phương pháp phân tử PCR đa mồi đối với 100 mẫu ốc *Lymnaea viridis* thu tại huyện Lục Nam, tỉnh Bắc Giang. Kết quả cho thấy phát hiện một mẫu ốc nhiễm mầm bệnh sán lá gan lớn *Fasciola* sp. khi phân tích bằng phương pháp PCR đa mồi.

Hai phương pháp xét nghiệm: phương pháp ép và phương pháp PCR đa mồi đều có những ưu điểm và nhược điểm riêng. Tuy nhiên, nên sử dụng cả hai phương pháp trong nghiên cứu dịch tễ học nhằm xác định chính xác nguồn lây truyền bệnh sán lá gan lớn từ vật chủ trung gian sang người và động vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

3. **Đỗ Đức Ngái, Phạm Văn Lực, Nguyễn Văn Đức, Phạm Ngọc Doanh, Nguyễn Văn Hà, Nguyễn Thị Minh**, 2006: *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú Y*, 3(5): 68-72.
4. **Nguyễn Thị Kim Thành và cộng sự**, 1995: *Tạp chí Nông nghiệp công nghiệp thực phẩm*, 5: 212-214.

5. **Nguyễn Trọng Kim & Phạm Ngọc Vĩnh**, 1997: Kết quả nghiên cứu khoa học, Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam, quyển 5: 407-411.
6. **The D.T., Nawa Y.**, 2005: *Asian Parasitology*, 1: 57-60.
7. **Bargues M.D., Mas-Coma S.**, 2005: *Journal of Helminthology*, 79: 257-267.
8. **Bargues M.D., Vigo M., Horak P., Dvorak J., Patzner R.A., Pointier J.P., Jackiewicz M., Meier-Brook C., Mas-Coma S.**, 2001: *Infection, Genetics and Evolution* 1: 85-107.
9. **Caron Y., Lasri S., Losson B.**, 2007: *Veterinary Parasitology*, 149, 95-103.
10. **Magalhães K.G., Jannotti-Passos L.K., Caldeira R.L., Berne M.E.A., Muller G., Carvalho O.S., Lenzi H.L.**, 2008: *Veterinary Parasitology*, 152, 333-338.

EVALUATION AND COMPARISON OF TWO APPLIED TECHNIQUES TO DETECT FASCIOLIASIS IN *LYMNAEA VIRIDIS* SNAILS

BUI THI DUNG, HOANG VAN HIEN

SUMMARY

Two methods were used to detect fascioliasis in 100 snail samples (*Lymnaea viridis*) collected in Luc Nam district, Bac Giang province, includes: crussing method and multiplex PCR method. Results showed that 100 snail samples were negative with fascioliasis by using crussing method. Applying the multiplex PCR method for the same 100 snail samples, the result showed one positive sample in 100 examined samples. Crussing method is microscope examination, simple, fast, easy to use, allowing direct detection of fascioliasis infected snails, and detect different types of larvae in snails. This method can be used anywhere, either in the laboratory or in the field. However, some drawbacks of this method for determining infection rates is the time consuming, good experience requiring in the identification of larval forms of Fasciola. Especially, when using this method, we can only identify Fasciola larvae in infected snail samples and real estate development in the larval stage following the miracidia period. Multiplex PCR method was applied for accurate results, the high sensitivity and specificity. In particular, multiplex PCR method is used effectively in the epidemiological research study. Using this method can detect pathogens in real estate fascioliasis in the early stages, while the crussing method can not detect when not seeing the larvae develop in snails. As multiplex PCR detects accurately the parasite invasion and microscopic examination reveals successful infections in the snail host, both techniques could be used together to achieve a more comprehensive understanding of the epidemiological situation in a given area and to assess the capacity of different intermediate host to sustain larval development.