

## XÁC ĐỊNH ẬU TRÙNG SÁN LÁ SONG CHỦ (METACERCARIAE) KÝ SINH TRÊN MỘT SỐ LOÀI CÁ DỪA VÀO ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ DI TRUYỀN

Đặng Thúy Bình<sup>1</sup>, Vũ Đăng Hạ Quyên<sup>1</sup>, Lê Thị Thu Hà<sup>2</sup>, Trần Quang Sáng<sup>2</sup> và Nguyễn Đắc Kiên<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

<sup>2</sup> Sinh viên ngành Công nghệ Sinh học

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

### Title:

Parasitic Metacercariae infected in fish species based on morphological and genetic characters

### Từ khóa:

Metacercariae, cá tra, cá đối, cá rô đồng, 28S rDNA

### Keywords:

Metacercariae, striped catfish, mullet, climbing perch, 28S rDNA

### ABSTRACT

The metacercariae species were detected on 3 fish species: striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), climbing perch (*Anabas testudineus*) and mullet (*Mugil cephalus*) by morphological and genetic characters (using 28S gene of genomic ribosome). 474 metacercariae were obtained from three fish species, in which 159 metacercariae on striped catfish including 3 species (*Clonorchis sinensis*, *Centrocestus formosanus*, *Haplorchis taichui*), 181 metacercariae of 3 unidentified species of 3 different genera (*Centrocestus*, *Haplorchis*, *Metagonimoides*) were found on the climbing perch, and 134 metacercariae of 3 genera (*Procerovum*, *Stellantchasmus*, *Clonorchis*) on the mullet. Prevalence fluctuates depending on the infected metacercariae and fish species, the lowest was 2.13% for *Centrocestus formosanus* on striped catfish and the highest is 83.33% for *Procerovum* sp. on mullet. Phylogenetic tree was constructed using 28S rDNA gene of ribosomal DNA. The phylogram showed the monophyly of studied metacercarian genera, except *Haplorchis* and *Procerovum*. Species of two different family (*Heterophyidae* and *Opisthorchiidae*) were placed in the same clade. Sequence differences of species rang from 2% to 9%. Research need to be conducted to species identification based on morphological and genetic characteristics.

### TÓM TẮT

Các loài metacercariae được phát hiện trên các loài cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), cá rô đồng (*Anabas testudineus*) và cá đối (*Mugil cephalus*) dựa vào đặc điểm hình thái và di truyền (sử dụng đoạn gen 28S của hệ gen ribosom). Nghiên cứu thu được 474 metacercariae trên 3 loài cá, trong đó trên cá tra thu được 159 metacercariae bao gồm 3 loài (*Clonorchis sinensis*, *Centrocestus formosanus*, *Haplorchis taichui*), trên cá rô đồng thu được 181 metacercariae bao gồm 3 loài chưa xác định thuộc 3 giống (*Centrocestus*, *Haplorchis*, *Metagonimoides*) và trên cá đối thu được 134 metacercariae bao gồm 3 loài chưa định danh thuộc 3 giống (*Procerovum*, *Stellantchasmus*, *Clonorchis*). Tỷ lệ cảm nhiễm dao động tùy theo loài metacercariae và loài cá nghiên cứu, thấp nhất là 2,13% đối với *Centrocestus formosanus* trên cá tra và cao nhất là 83,33% đối với *Procerovum* sp. trên cá đối. Metacercariae được kiểm chứng phân loại và xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên gen 28S rDNA. Cây phát sinh loài cho thấy sự đồng dạng (monophyly) của các giống nghiên cứu, ngoại trừ giống *Haplorchis* và *Procerovum*. Các loài thuộc 2 họ *Heterophyidae* và *Opisthorchiidae* được sắp xếp chung 1 nhánh. Sự khác biệt di truyền của các loài dao động từ 2% đến 9%. Cần tiến hành định danh các loài nghiên cứu dựa trên đặc điểm hình thái và di truyền.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Sán lá song chủ có nguồn gốc từ động vật thủy sản lây nhiễm cho người (Food - born trematode parasite) là vấn đề toàn cầu, trong đó có Việt Nam (WHO, 2004). Sự phát triển của ngành nuôi trồng thủy sản hiện nay có thể làm tăng nguy cơ nhiễm bệnh do ký sinh trùng gây ra, đặc biệt thông qua các vật chủ trung gian như ốc và cá. Theo Tổ chức Y tế Thế giới có hơn 40 triệu người nhiễm sán lá gan, khoảng 70 loài được biết là nhiễm vào con người. (WHO, 2004).

Hiện nay, việc nghiên cứu sán lá song chủ có nguồn gốc từ động vật thủy sản có khả năng lây nhiễm cho người được tiến hành ở nhiều tỉnh thành trên cả nước như: Hà Nội, Hải Dương, Nam Định, Nghệ An, Phú Yên, Khánh Hòa, Cần Thơ, An Giang (Nguyen Diem Thu *et al.*, 2007, Vo The Dung *et al.*, 2008, Nguyễn Văn Đề *et al.*, 2003, Trần Văn Quyên *et al.*, 2012). Rất nhiều loài cá nước ngọt được ghi nhận là vật chủ trung gian của các loài ký sinh trùng ở giai đoạn metacercaria như cá tra (Pham Cu Thien *et al.*, 2009, Dinh Thi Thuy *et al.*, 2010); cá mè, cá chép, cá trắm cỏ, cá trôi, cá diếc, cá rô phi, trong đó cá mè nhiễm cao nhất (Dương Thị Hoa và Nguyễn Ngọc Phước, 2009, Nguyễn Văn Đề và Phạm Văn Khuê, 2009, Trần Văn Quyên *et al.*, 2012); cá rô đồng (Pham Cu Thien *et al.*, 2007), Cá nước lợ (cá đối) và cá biển (cá mú) cũng được ghi nhận có sự hiện diện của ấu trùng metacercaria (Vo The Dung *et al.*, 2008).

Định danh ấu trùng sán giai đoạn metacercariae dựa trên đặc điểm hình thái thường gây nhầm lẫn vì sự hạn chế của các đặc điểm phân loại (hình dạng, kích thước bào nang, các giác bám, cơ quan sinh dục, tuyến bài tiết). Các chỉ thị phân tử của gen ribosom thuộc hệ gen nhân (18S, 28S, ITS1 và ITS2) được ứng dụng rộng rãi trong định danh loài và nghiên cứu di truyền phả hệ (Kim Văn Vạn *et al.*, 2007, Katokhin *et al.* 2008, Skow *et al.*, 2008, 2009). Nghiên cứu này nhằm xác định tình hình nhiễm và thành phần loài metacercariae trên cá tra, cá đối và cá rô đồng dựa vào đặc điểm hình thái và di truyền, đồng thời khảo sát mối quan hệ phát sinh loài của các loài metacercariae thu được trên cá.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương pháp thu mẫu

Metacercariae được thu từ 283 cá thể cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) ở các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long và Cần Thơ, 15 cá thể cá rô đồng (*Anabas testudineus* Bloch, 1792), 6 cá thể cá đối (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) thu ở tỉnh Khánh Hòa. Cá tra được vận chuyển sống hoặc bảo quản lạnh trong thùng xốp và vận chuyển về phòng thí nghiệm; các loài cá đối, cá rô đồng thu tại chợ Vĩnh Hải, tỉnh Khánh Hòa. Kích thước và trọng lượng trung bình của các loài cá được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1: Số lượng và kích thước trung bình các loài cá nghiên cứu**

Loài cá	Nơi thu mẫu	Số lượng (n)	Chiều dài (mm)	Khối lượng (g)
Cá tra ( <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> )	An Giang	30	216,5 ± 81,5	159,46 ± 134,43
	Vĩnh Long	68	185 ± 69	88,14 ± 72,14
	Đồng Tháp	113	296 ± 122	380,88 ± 305,2
	Cần Thơ	66	262,5 ± 52,5	192,97 ± 157,87
Cá rô đồng ( <i>Anabas testudineus</i> )	Khánh Hòa	15	121 ± 14	40,93 ± 14,26
Cá đối ( <i>Mugil cephalus</i> )	Khánh Hòa	6	132 ± 4	30,35 ± 2,85

Giá trị trình bày dưới dạng: giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn

### 2.2 Phương pháp tiêu cơ

Cá được nghiền nhỏ cho vào dung dịch tiêu cơ (8 ml HCl + 6g pepsin trong 1000 ml nước cất), cho mẫu vào tủ 37°C trong 2-3 giờ, sau đó tiến hành lọc với lưới lọc kích thước 1x1 mm, quan sát phân lắng trên kính soi nổi, kiểm tra, thu và đếm số lượng metacercariae (Sohn, 2009).

### 2.3 Phân loại hình thái

Metacercariae được định loại dựa vào các đặc điểm hình thái (hình dạng, cấu trúc thành bào nang,

giác bụng, giác miệng, cơ quan sinh dục) theo Bùi Quang tề (2006), Hà Ký và Bùi Quang Tề (2007); Sohn *et al.* (2009); Pinto *et al.* (2012). Đo các thông số hình thái gồm kích thước bào nang, thành bào nang (nếu dày), giác miệng, giác bụng, tinh hoàn, kích thước gai miệng, số lượng móc sinh dục.

### 2.4 Tách chiết DNA, nhân gen bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự

DNA từ 15 – 20 cá thể metacercariae của cùng 1 loài được tách chiết bằng bộ kit DNeasy® Blood

& Tissue (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một phần của đoạn gen 28S rDNA được khuếch đại sử dụng đoạn mồi được thiết kế 20H-F: 5' *ACT TTC ACA GAG TGG TCA CC 3'*; 19S-R: 5' *TCA GGT GGA AAG TCT ACC G 3'* (Nghiên cứu hiện tại).

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 50µl (bao gồm 9 µL khuôn DNA, 5 µL 10X Dream Tag Buffer, 1 µL dNTP, 1 µL mỗi mồi, 0.25 µL Tag DNA polymerase và 32,75 nước cất cho đủ thể tích), phản ứng được tiến hành theo chu trình nhiệt gồm 94°C trong 3 phút; 40 chu kỳ của 94°C trong 30s, 56°C trong 45s, 72°C trong 1 phút; chu kỳ cuối 72°C trong 7 phút (Olson *et al.*, 2003).

Sản phẩm PCR được tiến hành phản ứng giải trình tự theo nguyên tắc Dye – labelles dideoxy terminator (Big Dye Terminator v.3.1, Applied Biosystems) với các đoạn mồi tương tự như phản ứng PCR theo chương trình luân nhiệt như sau: 96°C trong 20 giây, 50°C trong 20 giây, cuối cùng là 60°C trong 4 phút. Sản phẩm sau đó được phân tích bằng thiết bị ABI Prism 3.700 DNA Analyser (Applied Biosystems) tại Công Ty TNHH Nam Khoa, TP HCM.

### 2.5 Phân tích mối quan hệ phát sinh loài

Trình tự gen 28S rDNA của các loài metacercariae thu được từ 3 loài cá nghiên cứu được xử lý và kết nối bằng phần mềm Geneious, sau đó kiểm chứng bằng chương trình BLAST ([ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast)). Các trình tự được đóng hàng (alignment) bằng phần mềm Bioedit (Hall, 1999), sau đó được kiểm tra, chỉnh sửa bằng mắt thường và xác định mức độ tương đồng của các loài. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên 9 trình tự của các loài metacercariae thu được và 6 trình tự từ Genbank sử dụng phần mềm MEGA 6.06 (Kumar *et al.*, 2009) và PAUP v4.0 (Swofford, 2001) bằng thuật toán Maximum parsimony (MP) và Maximum likelihood (ML) với giá trị bootstrap (độ tin cậy) (BT) 1000 lần lặp lại. *Echinochasmus japonicus* được sử dụng làm nhóm ngoại vì trình tự của loài này thể hiện sự khác biệt căn thiết với các trình tự trong nghiên cứu hiện tại.

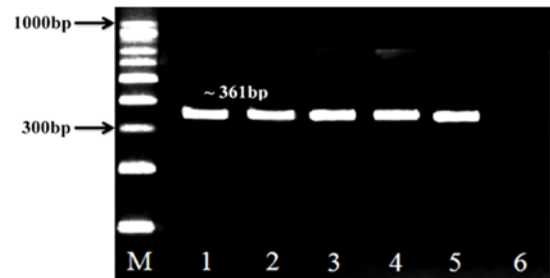
## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Thành phần loài metacercaria trên cá dựa vào đặc điểm hình thái và di truyền

Nghiên cứu tiến hành thu 283 cá thể cá tra trong các đợt thu mẫu ở An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long và Cần Thơ, 15 cá thể cá rô đồng, 6 cá thể cá đối được thu ở khu vực chợ Vĩnh Hải, Nha

Trang. Dựa vào đặc điểm và các thông số hình thái và đặc điểm di truyền (trình tự gen 28S rDNA), 474 cá thể metacercariae thuộc 9 loài được phát hiện trên 3 loài cá nghiên cứu. Hình thái ngoài, đặc điểm hình thái các loài metacercariae phát hiện được trình bày ở Bảng 2.

Kết quả khuếch đại gen 28S rDNA hiển thị dài DNA đích có chiều dài 381bp đúng như tính toán lý thuyết (Hình 1). So sánh kết quả trên ngân hàng quốc tế Genbank cho thấy các loài đều có trình tự tương đồng với các loài trên Genbank (*Centrocestus formosanus*, *Clonorchis sinensis* và *Haplorchis taichui*) với tỉ lệ tương đồng là 100%. Tuy nhiên, 6 loài còn lại cho thấy sự khác biệt với các loài cùng giống (tỉ lệ tương đồng dao động từ 86-90%) và không có trình tự tương đồng trên GenBank, vì vậy được ghi nhận là loài chưa xác định (*Clonorchis* sp., *Haplorchis* sp., *Metagonimoides* sp., *Centrocestus* sp., *Stellantchasmus* sp. và *Procerovum* sp.)





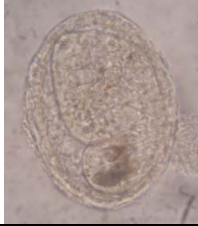




**Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn gen 28S rDNA của các loài metacercaria. Giếng M: Thang chuẩn DNA 100bp, Giếng 1-5: Sản phẩm PCR đoạn gen 28S rDNA, giếng 6: Chứng âm**

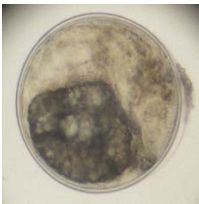

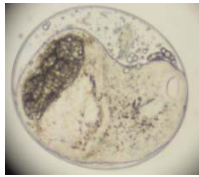
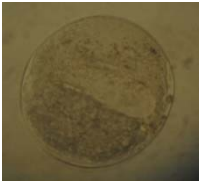

### 3.2 Tỉ lệ cảm nhiễm các loài metacercaria trên cá

Tỉ lệ cảm nhiễm của 9 loài metacercaria thu được trên cá tra, cá rô đồng và cá đối được thể hiện ở Bảng 2.

Tỉ lệ cảm nhiễm của các loài metacercariae dao động giữa các loài cá, ở cá tra thu được 3 loài với tỉ lệ cảm nhiễm từ 2,13% (*Centrocestus formosanus*) đến 43,47% (*Haplorchis taichui*). Trên cá rô đồng thu được 3 loài với tỉ lệ cảm nhiễm dao động từ 6,67% (*Centrocestus* sp.) đến 40% (*Haplorchis* sp.), và trên cá đối thu được 3 loài với tỉ lệ cảm nhiễm dao động từ 33,33% (*Clonorchis* sp.) đến 83,33% (*Procerovum* sp.). Tỉ lệ cảm nhiễm thấp nhất là 2,13% đối với *Centrocestus formosanus* trên cá tra và tỉ lệ cảm nhiễm cao nhất là 83,33% đối với *Procerovum* sp. trên cá đối.

**Bảng 2: Tỷ lệ cảm nhiễm và đặc điểm hình thái các loài metacercariae phát hiện trên các loài cá nghiên cứu**

Loài cá	Nơi thu mẫu	Metacercariae thu được (n)	Metacercariae quan sát	Tỷ lệ cảm nhiễm (%)	Hình ảnh	Đặc điểm hình thái
 Cá tra ( <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> )	An Giang	0	-	-		
	Đồng Tháp	0	-	-		
	Vĩnh Long	14	<i>Clonorchis sinensis</i>	14,89		Bào nang hình elip kích thước $259,5 \pm 0,5 \times 225,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , thành bào nang 1 lớp mỏng, giác miệng lớn thấy rõ có kích thước $35 \times 46,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , <u>giác bụng gần bằng giác miệng</u> <sup>(*)</sup> nằm ở giữa 2 ruột kéo dài xuống tuyến bài tiết, kích thước giác bụng $34,5 \pm 0,5 \times 44$ , hầu thấy rõ nằm dưới giác miệng, bào nang nhìn rõ dưới kính hiển vi, có sắc tố màu vàng nâu nằm rải rác khắp cơ thể, túi bài tiết hình chữ O ở phía cuối cơ thể.
			<i>Centrocestus formosanus</i>	2,13		Bào nang hình ôvan, kích thước $260 \times 121 \mu\text{m}$ , thành bào nang 2 lớp mỏng. Giác miệng kích thước $34 \times 46 \mu\text{m}$ ; có khoảng 32 gai lớn xếp so le chung quanh giác miệng, chiều dài gai $14 \mu\text{m}$ ; dưới miệng là hầu có kích thước nhỏ, giác bụng có kích thước $24 \times 43 \mu\text{m}$ . <u>Túi bài tiết hình chữ X</u> <sup>(*)</sup> ở phía cuối cơ thể.
Cần Thơ	145	<i>Haplorchis taichui</i>	43,47		Bào nang hình trứng, kích thước $220 \times 165,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , thành bào nang 1 lớp mỏng, giác miệng có kích thước $28,5 \pm 0,5 \times 41 \mu\text{m}$ , <u>giác bám giao phối</u> <sup>(*)</sup> hình găng tay có khoảng 16 gai hình que bao xung quanh gần tuyến bài tiết, kích thước mỗi gai $3 \mu\text{m}$ , giác bám bụng nằm lõm sâu vào trong 2 nhánh ruột không nhìn thấy rõ, có sắc tố màu vàng nâu nằm rải rác khắp cơ thể, túi bài tiết hình chữ O và chiếm phần lớn phía sau cơ thể.	
 Cá rô đồng ( <i>Anabas testudineus</i> )	Nha Trang	181	<i>Centrocestus</i> sp.	6,67		Bào nang hình ôvan, kích thước $212,5 \pm 7,5 \times 120,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , thành bào nang 2 lớp mỏng. Giác miệng kích thước $32 \times 44 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ; có khoảng 30 gai lớn xếp so le chung quanh giác miệng, chiều dài gai $9 \mu\text{m}$ ; giác bụng có kích thước $20 \times 39 \pm 0,5 \mu\text{m}$ . <u>Túi bài tiết hình chữ X</u> <sup>(*)</sup> ở phía cuối cơ thể.
			<i>Haplorchis</i> sp.	40		Bào nang hình trứng, kích thước $210 \times 155,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , thành bào nang 1 lớp mỏng, giác miệng có kích thước $28,5 \pm 0,5 \times 41 \mu\text{m}$ , <u>giác bám giao phối</u> <sup>(*)</sup> hình găng tay không nhìn thấy rõ bao xung quanh gần tuyến bài tiết, giác bám bụng không nhìn thấy rõ, có sắc tố màu vàng nâu nằm rải rác khắp cơ thể, túi bài tiết hình chữ O và chiếm phần lớn phía sau cơ thể.

Loài cá	Nơi thu mẫu	Metacercariae thu được (n)	Metacercariae quan sát	Tỷ lệ cảm nhiễm (%)	Hình ảnh	Đặc điểm hình thái
			<i>Metagonimoides</i> sp.	26,67		Bào nang gần tròn kích thước $154 \pm 1 \times 153 \mu\text{m}$ , thành bào nang 1 lớp mỏng, giác miệng nhỏ kích thước $25,5 \pm 0,5 \times 42 \mu\text{m}$ , giác bụng gần tròn thường lõm vào trong ở gần cuối cơ thể nên khó nhìn thấy rõ kích thước $32 \times 39,5 \pm 0,5$ , sắc tố màu vàng nâu nằm rải rác toàn bộ cơ thể, túi bài tiết hình chữ V và chiếm phần lớn phía sau cơ thể.
 Cá đoi ( <i>Mugil cephalus</i> )	Nha Trang	134	<i>Procerovum</i> sp.	83,33		Bào nang hình elip kích thước $255 \times 187,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$ , giác bám miệng có kích thước $26 \pm 1 \times 39 \mu\text{m}$ , giác bám bụng có kích thước $23,5 \pm 0,5 \times 32 \mu\text{m}$ nằm dưới ruột, thành bào nang 1 lớp trong suốt mỏng, có 1 tinh hoàn nhỏ nằm ở bên phải ruột <sup>(*)</sup> , sắc tố màu vàng nâu nằm rải rác khắp cơ thể, túi bài tiết hình chữ D phía sau cơ thể.
			<i>Stellantchasmus</i> sp.	66,67		Bào nang hình elip, kích thước $225 \pm 5 \times 156,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$ , thành bào nang 1 lớp mỏng, giác miệng có kích thước $41 \times 53,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ lớn hơn giác bụng nằm ở vị trí lệch sang bên phải của đường giữa hai ruột tịt <sup>(*)</sup> kích thước $27,5 \pm 0,5 \times 32 \pm 1$ , lỗ sinh dục nằm ở mép phải giác bụng gần túi bài tiết <sup>(*)</sup> , các sắc tố màu vàng nâu nằm rải rác xung quanh cơ thể, túi bài tiết hình chữ D lớn ở phía cuối cơ thể.
			<i>Clonorchis</i> sp.	33,33		Bào nang hình elip kích thước $171,5 \pm 3,5 \times 134,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , thành bào nang 1 lớp mỏng, giác miệng lớn thấy rõ có kích thước $38 \times 46,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , giác bụng gần bằng giác miệng <sup>(*)</sup> có kích thước $39,5 \pm 0,5 \times 48$ , bào nang nhìn rõ dưới kính hiển vi, có sắc tố màu vàng nâu nằm rải rác khắp cơ thể, túi bài tiết nhỏ hình chữ D ở phía cuối cơ thể.

Giá trị trình bày dưới dạng: giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn

Ghi chú: Dấu (-) chưa xác định được. Gạch dưới đặc điểm phân loại chủ yếu

Ở cá tra, metacercariae thu được tập trung ở Cần Thơ và Vĩnh Long (lần lượt là 145 metacercariae/66 cá thể và 14 metacercariae/68 cá thể), chủ yếu ở cá có kích thước nhỏ (Bảng 1), trong khi các điểm thu mẫu khác (Đồng Tháp và An Giang) không tìm thấy metacercariae (Bảng 2).

Dinh Thị Thuy *et al.* (2010) phát hiện được 4 loài metacercariae (*Haplorchis pumilio*, *H. taichui*, *Centrocestus formosanus* và *Procerovum* sp.) trên cá tra với tỉ lệ nhiễm dao động từ 1,66 - 6,45% tùy theo mô hình nuôi. Nhóm tác giả cũng ghi nhận sự xuất hiện của metacercariae theo mùa và độ tuổi của cá, cá nhiễm metacercariae cao nhất vào mùa

mưa và độ tuổi từ 61 đến 90 ngày. Lê Thị Kim Gương và *ctv.* (2010) phát hiện *Haplorchis pumilio* và 1 loài metacercaria chưa xác định trên cá tra giống ở Tiền Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ với tỉ lệ cảm nhiễm chung là 8,33%. Phạm Cu Thien *et al.* (2007) ghi nhận tỉ lệ nhiễm metacercaria trên cá tra khá thấp (0,03%). Nghiên cứu hiện tại phát hiện 3 loài metacercariae trên cá tra và ghi nhận sự xuất hiện của metacercariae theo kích thước và khu vực địa lý. Tỉ lệ cảm nhiễm cao nhất đối với loài *Haplorchis taichui* (43,47%) tập trung chủ yếu ở cá thu tại Cần Thơ là khá cao so với các nghiên cứu trước đây.

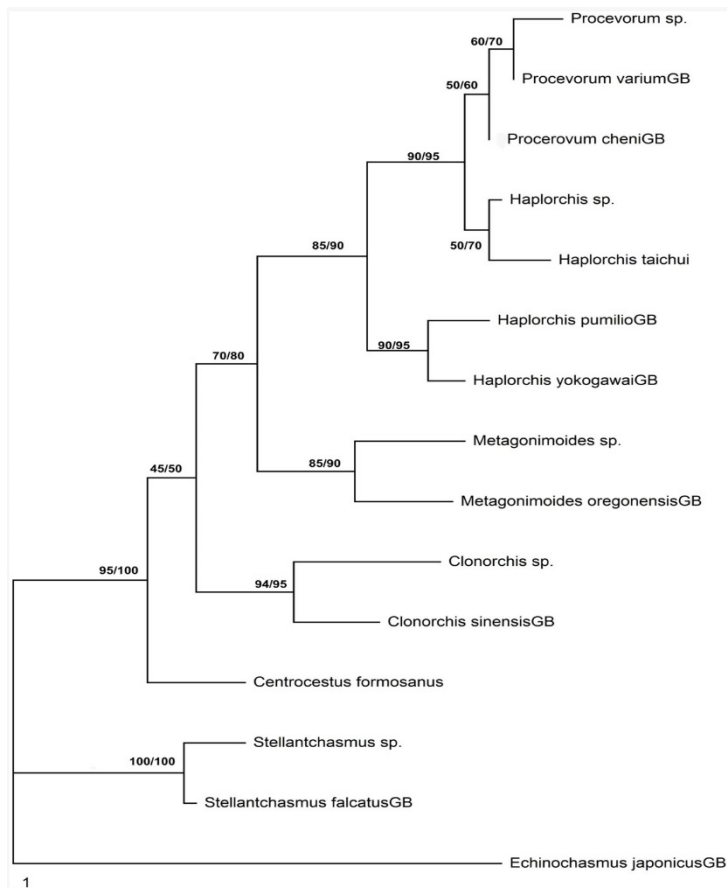
Vo The Dung *et al.* (2008) nghiên cứu trên cá đổng (*Mugil cephalus*) ở tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam phát hiện được 2 loài metacercariae là *Pygidiopsis summa* và *Heterophyopsis continua*. Kim *et al.* (2006) phát hiện được 4 loài metacercariae trên cá đổng ở Hàn Quốc là *Pygidiopsis summa*, *Heterophyes nocens*, *Heterophyopsis continua* và *Stictodora* sp. Các nghiên cứu trên khác với nghiên cứu hiện tại trên cá đổng tìm thấy được 3 loài metacercariae (*Procerovum* sp., *Stellantchasmus* sp. và *Clonorchis* sp.) dựa vào đặc điểm hình thái và di truyền. Chai *et al.* (2012) phát hiện được 2 loài metacercariae (*Procerovum varium* và *Stellantchasmus falcatus*) với tỉ lệ cảm nhiễm trung bình là 11,94%. Nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu hiện tại ở metacercaria thuộc 2 giống *Procerovum* và *Stellantchasmus*, tuy nhiên tỉ lệ cảm nhiễm của 2 giống trên trong nghiên cứu hiện tại cao hơn (lần lượt là 88,33 và 66,67%)

Rim *et al.* (2008) không tìm thấy metacercariae

trên cá rô đổng. Luangphai *et al.* (2003) phát hiện được 3 loài metacercariae (*Stellantchasmus falcatus*, *Acanthostomum* sp, *Centrocestus caninus*) trên cá rô đổng ở Thái Lan. Pham Cu Thien *et al.* (2007) cho thấy tỉ lệ cảm nhiễm loài *Haplorchis pumilio* và *Centrocestus formosanus* trên cá rô đổng lần lượt là 38,46% và 7,69%. Các nghiên cứu trên giống với nghiên cứu hiện tại cũng phát hiện được 3 loài metacercariae trong đó có 2 loài cùng giống với nghiên cứu trên là *Centrocestus* sp và *Stellantchasmus* sp. Tỉ lệ cảm nhiễm dao động từ 6,67-40% cũng phù hợp với nghiên cứu của Pham Cu Thien *et al.* (2007).

### 3.3 Khảo sát mối quan hệ phát sinh loài

Kết quả phân tích đối với dữ liệu trình tự gen 28S rDNA dựa trên phương pháp MP, ML cho kết quả tương tự về cây phát sinh loài. Kết quả được trình bày ở Hình 2 với cây phát sinh loài thu được từ phân tích MP với giá trị BT của thuật toán MP, ML được biểu hiện trên các nhánh.



**Hình 2:** Cây phát sinh loài dựa vào trình tự gen 28S rDNA của các loài metacercaria với giá trị BT của thuật toán MP và ML được thể hiện trên các nhánh. Loài có kí hiệu GB được lấy từ GenBank. *Echinochasmus japonicus* được sử dụng làm nhóm ngoại

Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen 28S rDNA (Hình 2) cho thấy sự hiện diện của 2 nhóm chính: Nhóm 1 gồm các loài thuộc giống *Haplorchis*, *Procerovum*, *Clonorchis*, *Centrocestus* và *Metagonimoides*. Nhóm 2 gồm 2 loài thuộc giống *Stellantchasmus*. Nhóm 1 được chia thành các nhóm nhỏ: Nhóm 1.1 gồm các loài thuộc giống *Haplorchis* và *Procerovum*; Nhóm 1.2 thuộc giống *Clonorchis*; nhóm 1.3 thuộc giống *Metagonimoides* và nhóm 1.4 là loài *Centrocestus formosanus*. Kết quả cho thấy các loài thuộc họ Opisthorchiidae (*Clonorchis* spp.) và Heterophyidae (các loài còn lại trừ giống *Stellantchasmus*) nằm cùng 1 nhánh đồng dạng (monophyly).

Loài *Clonorchis* sp. thuộc họ Opisthorchiidae nhưng sắp xếp cùng nhánh với các loài thuộc họ Heterophyidae cho thấy sự không phù hợp giữa phân loại dựa trên hình thái và di truyền. Hơn nữa, ở mức độ giống *Haplorchis* và *Procerovum* cũng cho thấy sự thiếu phân tách dựa vào đặc điểm di truyền. Các loài *Haplorchis* sp. và *Haplorchis taichui* thể hiện sự gần gũi với các loài thuộc giống *Procerovum* hơn là với các loài *Haplorchis* khác (*H. pumilio* và *H. yokogawai*). Điều này chứng tỏ các loài này có quan hệ gần gũi với nhau. Nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Thaenkham *et al.* (2010).

Loài *Stellantchasmus* sp. có quan hệ họ hàng với loài *Stellantchasmus falcatus*GB (sự khác biệt trình tự là 2,7%) dù nằm trong cùng một nhánh nhưng thể hiện là 2 loài khác nhau thuộc cùng một giống (BT 100%). Hai loài này tách ra một nhánh riêng biệt so với các loài khác dù thuộc cùng họ Heterophyidae. Giống như loài *Stellantchasmus* sp., các loài *Clonorchis* sp., *Metagonimoides* sp. và *Haplorchis* sp. tương tự cũng có quan hệ họ hàng với loài *Clonorchis sinensis*GB, *Metagonimoides oregonensis*GB và *Haplorchis taichui* (sự khác biệt trình tự lần lượt là 8,3%, 7,2% và 3,8%)

Skov *et al.* (2009) nghiên cứu ký sinh trùng gây hại cho người trên cá nước ngọt tại Việt Nam. Nhóm nghiên cứu ghi nhận sự hiện diện của metacercariae thuộc giống *Haplorchis* (*H. pumilio* và *H. taichui*) và *Procerovum* sp. trên cá mè trắng, cá trôi Trung Quốc và cá rô đồng. Trình tự tương đồng của gen ITS2 rDNA được xác nhận giữa cercaria Type A từ ốc *Melanooides tuberculata* với metacercariae từ cá và cá thể trưởng thành của *Haplorchis pumilio* từ miền Bắc, Việt Nam, tuy nhiên có sự khác biệt giữa trình tự gen ITS2 rDNA của các loài trong nghiên cứu này với các trình tự

từ nghiên cứu ở Isaren (Dzikowski *et al.* 2004). Kim Văn Vạn và *ctv.* (2007) ghi nhận sự tương đồng trình tự ITS2 rDNA của 2 loài sán lá ruột *H. pumilio* và *H. taichui* (cá thể trưởng thành từ người và metacercariae từ cá) với các loài sán lá tương tự ở Thái Lan (Ando *et al.*, 2001). Nhóm tác giả cũng ghi nhận mức độ tương đồng thấp với nghiên cứu từ Isarel (Dzikowski *et al.*, 2004). Dinh Thi Thuy *et al.* (2010) sử dụng gen ITS2 rDNA để kiểm chứng phân loại các loài metacercaria trên cá tra. Nhóm tác giả ghi nhận sự khác biệt nhỏ trong trình tự của loài *H. taichui* và *H. pumilio*, tuy nhiên, trình tự của loài *Procerovum* sp. thể hiện sự tương đồng cao.

Nghiên cứu hiện tại cho thấy dựa vào đặc điểm hình thái rất khó phân biệt các loài metacercariae thuộc cùng một giống. Kết quả cho thấy sự tương đồng về trình tự gen 28S rDNA của các loài metacercariae tìm thấy trên cá tra với các loài tương tự trên Genbank (Thaenkham *et al.*, 2010), tuy nhiên trên cá đối và cá rô đồng, các loài đều cho thấy sự khác biệt trình tự với các loài cùng giống. Các chỉ thị phân tử cần được áp dụng trong việc phát hiện và nghiên cứu dịch tễ ký sinh trùng gây hại cho người, đồng thời nghiên cứu cũng cần tập trung xác định các đặc điểm phân loại đặc trưng cho các loài nghiên cứu.

## LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn cộng đồng EU và dự án “Đánh giá mức độ nhiễm ký sinh trùng bằng các phương pháp kết hợp trong các sản phẩm cá nhập vào EU” đã cung cấp kinh phí và hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ando, K., Sathithaworn, P., Nuchjungreed, C., Tesana, S., Srisawangwong, T., Limviroj, W. Chinzei, Y. 2001. Nucleotide sequence of mitochondrial COI and ribosomal ITS-2 genes of *Opisthochis viverrini* in Northeast Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 32: 17-22.
2. Bùi Quang Tề. 2006. Bệnh học thủy sản. Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng thủy sản I, P. 220-407.
3. Dinh Thi Thuy, Kania, P., Buchmann, K. 2010. Infection status of zoonotic trematode metacercariae in Sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam: Associations with season, management and host age. Aquaculture. 302(1-2): 19-25.

4. Dzikowski, R., Levy, M.G., Poore, M.F., Flowers, J.R., Paperna, I., 2004. Use of rDNA polymorphism for identification of Heterophyidae infecting freshwater fishes. *Disease of Aquatic Organisms*. 59: 35–41.
5. Hà Ký và Bùi Quang Tề. 2007. *Ký sinh trùng cá nước ngọt Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*. 41: 95-98.
7. Katokhin, A.V., Shekhovtsov, S.V., Konkow, S., Yurlova, N.I., Serbina, E.A., Vodianskaia, S.N., Mordvinov, V.A. 2008. Assessment of the genetic distinctions of *Opisthorchis felineus* from *O. viverrini* and *Clonorchis sinensis* by ITS2 and CO1 sequences. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 421(1), 214–217.
8. Kim, D.G., Kim, T.-S., Cho, S.-H., Song, H., & Sohn, W.-M. 2006. Heterophyid metacercarial infections in brackish water fishes from Jinju-man (Bay), Kyongsangnam-do, Korea. *The Korean journal of parasitology*, 44(1): 7–13.
9. Kim Văn Vạn, Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Anders Dalgaard. 2007. Phân biệt sán lá ruột nhỏ *Haplorchis taichui* và *H. pumilio* với các loài sán lá khác sử dụng chỉ thị ITS-2 (Internal transcribed spacer). *Tạp chí KHKT Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp*. 2: 1–7.
10. Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. 2009. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences, 9(4): 299–306.
11. Lê Thị Kim Gương, Phạm Cừ Thiện và Phạm Duy Tân. 2010. Khảo sát kỹ thuật ương nuôi và mức độ nhiễm ấu trùng sán lá song chủ giai đoạn metacercaria trên cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) tại các tỉnh Tiền Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ. *Báo cáo khoa học, Đại học Nông Lâm TPHCM*, tr 228-235.
12. Luangphai, P., Wongsawad, C., Kumchoo, K., Sripalwit, P. 2004. Survey of Helminths in climbing perch (*Anabas testudineus*) from San Sai District, Chiang Mai Province, 35: 2–4.
13. Nguyen Diem Thu, Dalsgaard, A., Ly Thi Thanh Loan, Murrell, K. D. 2007. Survey for zoonotic liver and intestinal trematode metacercariae in cultured and wild fish in An Giang Province, Vietnam. *The Korean journal of parasitology*, 45(1): 45–54.
14. Nguyễn Văn Đề và Phạm Văn Khuê. 2009. Bệnh ký sinh trùng truyền lây giữa người và động vật. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, Tr 46-52.
15. Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Braya, R.A., Littlewood, D.T.J. 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International journal for parasitology*. 33(7): 733–755.16.
16. Pham Cu Thien, Dalsgaard, A., Olsen, A., Murrell, K. D., 2007. Prevalence of fishborne zoonotic parasites in important cultured fish species in the Mekong Delta, Vietnam. *Parasitology Research*. 101:1277-1284.
17. Pham Cu Thien, Dalsgaard, A., Nguyen Thanh Nhan., Olsen, A., Murrell, K. D., 2009. Prevalence of zoonotic trematode parasites in fish fry and juveniles in fish of the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture*, 295:1-5.
18. Pinto, H.A., and Melo, A.L.de. 2012. (Trematoda: Heterophyidae) in *Australoheros facetus* ( Pisces: Cichlidae ) in Brazil, 2961: 334–337.
19. Rim, H., Sohn, W., Yong, T., Eom, K. S., Chai, J., Min, D., Insisengmay, S. 2008. Fishborne trematode metacercariae detected in freshwater fish from Vientiane municipality and Savannakhet Province, Lao PDR. *Korean Journal of Parasitology*. 46(4): 253–260.
20. Skov, J., Kania, P.W., Dalsgaard, A., Jørgensen, T.R., Buchmann, K. 2009. Life cycle stages of heterophyid trematodes in Vietnamese freshwater fishes traced by molecular and morphometric methods. *Veterinary parasitology*. 160(1-2): 66–75.
21. Skov, J., Kania, P.W., Jørgensen, T.R. Buchmann, K. 2008, Molecular and morphometric study of metacercariae and adults of *Pseudamphistomum truncatum* (Opisthorchiidae) from roach (*Rutilus rutilus*) and wild American mink (*Mustela vison*). *Veterinary Pathobiology*, P. 209-216.



22. Sohn, W. 2009. Fish-borne zoonotic trematode metacercariae in the Republic of Korea. *The Korean journal of parasitology*, 47 Suppl(October): S103–13.
23. Sohn, W., Eom, K. S., Min, D., Rim, H., Hoang, E. 2008. Fishborne trematode metacercariae in freshwater fish from Guangxi Zhuang autonomous region, China. *47(3): 249–257.*
24. Swofford, D.L 2002. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
25. Thaenkham, U., Dekumyoy, P., Komalamisra, C., Sato, M. 2010. Systematics of the subfamily Haplorchiinae ( Trematoda: Heterphyidae ), based on nuclear ribosomal DNA genes and ITS2 region. *Parasitology International*. 59(3): 460–465.
26. Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước. 2009. Nghiên cứu mức độ nhiễm ấu trùng sán lá song chủ trên cá chép và cá trắm cỏ giai đoạn cá giống ương nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế số 55:131-138.*
27. Trần Văn Quyên, Nguyễn Văn Thọ, Nguyễn Thị Hoàng Yến, Nguyễn Thị Hồng Chiên, Nguyễn Văn Phương. 2012. Một số đặc điểm dịch tễ bệnh sán lá gan nhỏ do *Clonorchis sinensis*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 2012: Tập 10, số 1: 142 - 147 Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
28. Vo The Dung, Murrell D., Dalsgaard, A., Bristow, G, Nguyen Huu Dung, Bui Ngoc Thanh, Vo Thi Dung 2008. Prevalence of Zoonotic Metacercariae in Two Species of Grouper, *Epinephelus coioides* and *Epinephelus bleekeri*, and Flathead Mullet, *Mugil cephalus*, in Vietnam, *Korean Journal of Parasitology* 46(2): 77-82.
29. World Health Organization. 2004. Joint WHO/FAO workshop on foodborne trematode infections in Asia. Ha Noi, Viet Nam, (August), P. 1 - 55.