

MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF *DEMODEX* MITES IN THE DEMODICOSIS' PATIENTS BASED ON MITOCHONDRIAL 16S rDNA TECHNIQUE

Nguyen Ngoc Vinh^{1*}, Do Trung Dung², Huynh Hong Quang¹,
Nguyen Thi Minh Trinh¹, Nguyen Thi Thanh Quyen¹, Nguyen Thi Lien Hanh¹, Nguyen Duc Chinh¹

¹Institute of Malariology Parasitology and Entomology Quy Nhon - 611B Nguyen Thai Hoc, Quy Nhon City, Vietnam

²National Institute of Malariology Parasitology and Entomology - 34 Trung Van, Nam Tu Liem Dist, Hanoi City, Vietnam

Received: 20/09/2024

Revised: 30/09/2024; Accepted: 23/12/2024

ABSTRACT

Objectives: To determine of *Demodex* species and phylogenetic relationship by molecular techniques.

Methods: DNA were isolated from the demodicois patients' *Demodex* mites and used for PCR amplification of mitochondrial (mt) 16S rDNA. The amplified PCR product were purified and used for molecular identification. The amplified mt16s rDNA product was sequenced and characterized to BLAST search in the NCBI database for molecular identification.

Results: All of 12 identified *Demodex* samples belongs to *Demodex folliculorum*. The phylogenetic tree constructed by using mt16s rDNA sequence suggests that *D. folliculorum* is closer to *D. brevis*. All the isolates belong to *D. folliculorum* and the mitochondrial DNA 16S rDNA partial sequence is applicable for phylogenetic relationship analysis, but not for interspecies identification.

Conclusions: All of 12 isolates belong to *D. folliculorum*, and the mitochondrial 16S rDNA partial sequence is applicable for phylogenetic relationship analysis at the genus-species level.

Keywords: *Demodex* spp, *Demodex folliculorum*, mt 16S rDNA, phylogenetic relationship.

*Corresponding author

Email: vinh.tmed.vn@gmail.com Phone: (+84) 905581950 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66i1.1904>

ĐỊNH LOÀI PHÂN TỬ VÀ QUAN HỆ PHẢ HỆ CỦA NGOẠI KÝ SINH TRÙNG TRÊN BỆNH NHÂN VIÊM DA DO *DEMODEX* SPP. DỰA TRÊN 16S rDNA TY THỂ

Nguyễn Ngọc Vinh^{1*}, Đỗ Trung Dũng², Huỳnh Hồng Quang¹,
Nguyễn Thị Minh Trinh¹, Nguyễn Thị Thanh Quyên¹, Nguyễn Thị Liên Hạnh¹, Nguyễn Đức Chính¹

¹Viện Sốt rét-Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn - 611B Nguyễn Thái Học, Tp. Quy Nhơn, Việt Nam

²Viện Sốt rét-Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương - 34 Trung Văn, Q. Nam Từ Liêm, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 20/09/2024

Chỉnh sửa ngày: 30/09/2024; Ngày duyệt đăng: 23/12/2024

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định thành phần loài và quan hệ phả hệ *Demodex* spp. bằng sinh học phân tử.

Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu: Tách chiết DNA từ các phân lập *Demodex* trên các bệnh nhân viêm da và khuếch đại PCR gen ty thể (mt) 16S rDNA. Sản phẩm PCR khuếch đại được tinh khiết và định loài. Sản phẩm mt16s rDNA đã khuếch đại được giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu BLAST trên ngân hàng gen NCBI để so sánh góc độ phân tử.

Kết quả: Tất cả 12 mẫu *Demodex* spp. đều thuộc loài *D. folliculorum*. Cây phả hệ di truyền được dựng dựa trên trình tự mt16s rDNA cho thấy *D. folliculorum* quan hệ gần hơn *D. brevis*. Tất cả phân lập thuộc *D. folliculorum* và giải trình tự một phần 16S rDNA ty thể có thể ứng dụng phân tích quan hệ phả hệ di truyền, nhưng không xác định nội loài.

Kết luận: Tất cả phân lập thuộc loài *D. folliculorum* và giải trình tự một phần (mt) 16S rDNA có thể phân tích mối quan hệ phả hệ ở mức độ phân tử giống loài.

Từ khóa: *Demodex* spp, *Demodex folliculorum*, mt 16S rDNA, quan hệ phả hệ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Demodex spp. là ngoại ký sinh trùng bắt buộc có vật chủ đặc hiệu, lần đầu tiên được mô tả bởi Simon vào năm 1842 và từ đó phát hiện ra 140 loài hoặc dưới loài *Demodex*. Hai loài chính thường gặp nhiễm trong nang lông, tuyến bã, tuyến dầu mi mắt, tuyến đầu tiết ráy tai ở người là *D. folliculorum* và *D. brevis*. Đặc biệt, cùng một vật chủ có thể bị ký sinh bởi hai hay nhiều loài *Demodex* spp. và nhiễm trùng chéo loài giữa người và động vật đã được báo cáo [1]. Về phân loài *Demodex* spp. kinh điển dựa vào hình thái, song có một số giới hạn, đôi khi không thể xác định loài [5]. Do đó, nghiên cứu về mối quan hệ di truyền phả hệ *Demodex* ở cấp độ phân tử là cần thiết.

Vài kỹ thuật phân tử được dùng để phân tích di truyền phả hệ *Demodex* và phân lập DNA của *D. canis* và giải trình tự *Demodex* thu được bằng khuếch đại mỗi oligonucleotide có thể áp dụng hữu ích về quan hệ phả hệ và diễn tiến bệnh [4]. Zhao và cộng sự phân tích *D.*

folliculorum, *D. brevis* và *D. canis* bằng phân tích trình tự RAPD với chỉ điểm vùng khuếch đại. rDNA ty thể di truyền từ mẹ, tiến hóa nhanh và đơn giản, cấu trúc gen không đặc hiệu mô (nontissue-specific gene structure) dùng nghiên cứu phả hệ *Demodex* spp. [6],[7]. Gen cytochrome C oxidase subunit và gen mã hóa protein (COI, COII, NDI và NDS) phân tích di truyền phả hệ đối với các loài có quan hệ gần, dưới loài và quần thể từ các vùng địa lý khác nhau, ngược lại gen 12S rDNA và 16S rDNA để phân tích phả hệ di truyền ở mức độ giống, loài. Nghiên cứu này định loài *Demodex* spp. thông qua giải trình tự một phần 16S rDNA trên 12 phân lập *Demodex* spp. để đánh giá quan hệ phả hệ.

Mục tiêu: Xác định thành phần loài và quan hệ phả hệ ký sinh trùng *Demodex* spp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

*Tác giả liên hệ

Email: vinh.tmed.vn@gmail.com Điện thoại: (+84) 905581950 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66i1.1904>

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu:

Nghiên cứu phòng thí nghiệm sinh học phân tử.

2.2. Địa điểm và thời gian:

- Từ năm 2018 đến năm 2021
- Tại Khoa Sinh học phân tử, Viện Sốt rét-KST-CT Quy Nhơn.

2.3. Đối tượng nghiên cứu: Mẫu phân lập *Demodex* spp. thu từ các vị trí viêm da của bệnh nhân;

2.4. Cỡ mẫu, chọn mẫu:

- Tổng số 12 phân lập *Demodex* spp. thu từ các vị trí viêm da khác nhau trên cơ thể bệnh nhân;
- Các mẫu gồm cả loài *D. brevis* và *D. folliculorum* đã được xác định qua kỹ thuật hình thái.

2.5. Các kỹ thuật sinh học phân tử và công cụ nghiên cứu:

2.5.1. Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số của *Demodex* spp. được tách chiết bằng bộ DNeasy tissue kit (Qiagen Inc., Mỹ). Quy trình tách chiết tóm tắt như sau:

- Mẫu vật sau khi xử lý được nghiền trong 180μl dd đệm ATL bằng chày đến khi thành dd đồng nhất;
- Bổ sung 20μl proteinase-K (50mg/ml) rồi ủ ở 55°C trong 2 giờ;
- Thêm 200μl AL, lắc mạnh rồi ủ ở 70°C trong 30 phút;
- Thêm 200μl ethanol (96-100%), vortex trong 15-20 giây;
- Toàn bộ hỗn dịch được chuyển lên màng của cột lọc, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút;
- Loại bỏ phần dd bên dưới, thêm 500μl dd AW1 vào cột lọc để rửa DNA bám vào màng, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch dưới. Thêm 500μl dd AW2 vào cột lọc để rửa tiếp DNA bám vào màng, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ dịch dưới;
- Chuyển sang ống eppendorf mới, DNA tổng số được thổi ra bằng 100μl dd AE, ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút, thu được DNA tổng số.

2.5.2. Kỹ thuật PCR thu nhận gen 16S *Demodex*: Mẫu *Demodex* spp. sau xác định hình thái, được thực hiện phản ứng PCR. Cặp mồi dùng nhân bản DNA dùng xác định gen 16S (Ya-E Zhao, 2012).

Bảng 1. Các cặp mồi được sử dụng để xác định gen 16S

rDNA	Tên loài	Mồi	Trình tự mồi 5' đến 3'	Chiều dài đoạn gen (bp)	
				<i>D. folliculorum</i>	<i>D. brevis</i>
16S	<i>C. thomsoni</i> , AF255703	F	CTGTGCTAAGGYAGC-GAAGTC	955	966
		R	TCAAAGGCCAA-CAKCGAGGTAA		
		R	GTTCCCTTGGCTGTG		

F: Mồi xuôi, R: Mồi ngược;

D. f: *Demodex folliculorum*; D. b: *Demodex brevis*

Thành phần phản ứng:

10X Buffer	5 μl	10μM mồi ngược	2 μl
25mM MgCl ₂	3 μl	Taq DNA polymerase	0,2 μl
10mM dNTP	1 μl	Nước tinh khiết	31,8 μl
10μM mồi xuôi	2 μl	DNA khuôn	5 μl
Tổng số: 50 μl			

Phản ứng PCR thực hiện chương trình: 1 chu kỳ 94°C trong 1 phút 30 giây, tiếp theo là 30 chu kỳ 94°C (1 phút 30 giây), 52°C (1 phút 30 giây), 72°C (2 phút) và 1 chu kỳ 72°C (10 phút). Bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bằng Nancy 10 phút và đọc kết quả trên máy đọc UV, ghi hình vào máy tính.

2.5.3. Kỹ thuật tinh sạch sản phẩm PCR: Trước khi giải trình tự, sản phẩm PCR sẽ được tinh sạch bằng bộ QIAquick PCR purification kit (QIAGEN).

- Thêm 200 μl PB vào 40 μl sản phẩm - trộn đều;
- Chuyển cột, ly tâm 13000 vòng/1 phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới;
- Thêm 750 μl PE, ly tâm 13.000 vòng/1 phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới;
- Ly tâm tiếp 13.000 vòng/1 phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới;
- Chuyển cột sang ống eppendorf mới, thêm 30 μl EB, ly tâm 13.000 vòng/1 phút trong 1 phút;
- Sản phẩm PCR tinh sạch thu nhận, được ký hiệu mẫu và giữ ở -20°C cho đến khi phân tích.

2.5.4. Kỹ thuật giải trình trình tự

Thành phần phản ứng giải trình trình tự

DTCS Quick start Master mix	8 µl	DNA khuôn (100 µg/ml)	1 µl
Primer (1,6µM)	2,5 µl	H ₂ O	8,5 µl
Tổng số: 20 µl			

Chu trình	96°C	20 giây	}	Chu kỳ
nhiệt:	50°C	20 giây 30		
	60°C	4 phút		
Giữ ở 4°C				

2.5.5. Kỹ thuật tinh sạch sản phẩm PCR giải trình trình tự

- Chuẩn bị ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, số lượng ống tương đương số mẫu cần tinh sạch;
- Thêm vào mỗi tube trên hỗn hợp dd dừng phản ứng với các thành phần và thể tích như sau:

3M Natri Acetate pH 5.2	2µl
100mM Na2EDTA pH 8.0	2µl
20mg/ml Glycogen (Cung cấp kèm theo DTCS Quick Start Kit)	1µl

- Chuyển toàn bộ dd phản ứng PCR giải trình trình tự đã có vào ống đã có hỗn hợp dừng phản ứng và vortex trong vài giây. Thêm vào mỗi ống 60µl Ethanol lạnh 95% (bảo quản ở -20°C), vortex và ly tâm tốc độ 14000 vòng/ phút trong 15 phút ở 4°C. Hút bỏ dd. Bước này thực hiện thêm 1 lần nữa;

- Quay khô chân không trong vòng 10 phút, hoặc để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng (không dùng máy ủ nhiệt để làm khô mẫu);

- Hòa tan DNA tủa vào trong 40 µl SLS (cung cấp kèm theo bộ DTCS).

2.5.6. Kỹ thuật giải trình trình tự trực tiếp

- Sản phẩm PCR gen 16S của *Demodex* spp. được giải trình trình tự trực tiếp. Các trình tự thu được kiểm tra xác định bằng chương trình BLAST trong ngân hàng gen NCBI;

2.6. Vật liệu nghiên cứu

- Gen 16S là hệ gen ty thể chọn làm đích. Cặp mồi dùng để nhân bản DNA tham khảo Ya-E Zhao [6],[7]. Bộ chiết tách DNA, tinh sạch sản phẩm PCR (Qiagen, Mỹ); PCR master mix (Promega, Mỹ), máy đo nồng độ DNA, máy PCR gen 2720A Thermal Cycler (Applied Biosystem, Mỹ), máy soi và chụp gel UV Genius (Syngene, Mỹ);

- Bộ điện di sản phẩm PCR (Mupid-eXU, Nhật Bản), máy giải trình tự GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, Mỹ).

2.7. Xử lý và phân tích số liệu:

- Dữ liệu gen trên ngân hàng gen để đối chiếu bằng chương trình BLAST, phân tích trình tự nucleotide thu được trên gen 16S *Demodex* spp;

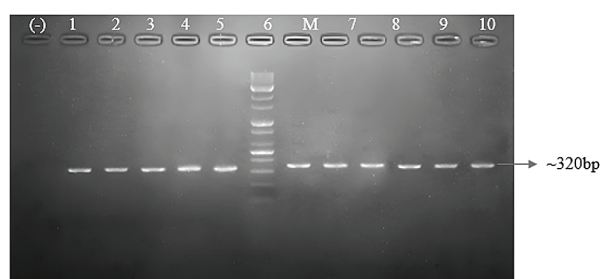
- Số liệu được phân tích trên phần mềm sinh tin như Genious R8, MEGA 6.0.

2.8. Khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu được thông qua Hội đồng phê duyệt Đạo đức Y sinh của Viện Sốt rét-KST-CT Trung ương và Viện Sốt rét-KST-CT Quy Nhơn.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả định loài các mẫu *Demodex* spp. bằng kỹ thuật PCR

Phân tích 12 mẫu *Demodex* spp. tại các vị trí viêm da khác nhau trên cơ thể bệnh nhân, tách chiết DNA tổng số, thực hiện phản ứng PCR gen 16S và định loài *Demodex*.



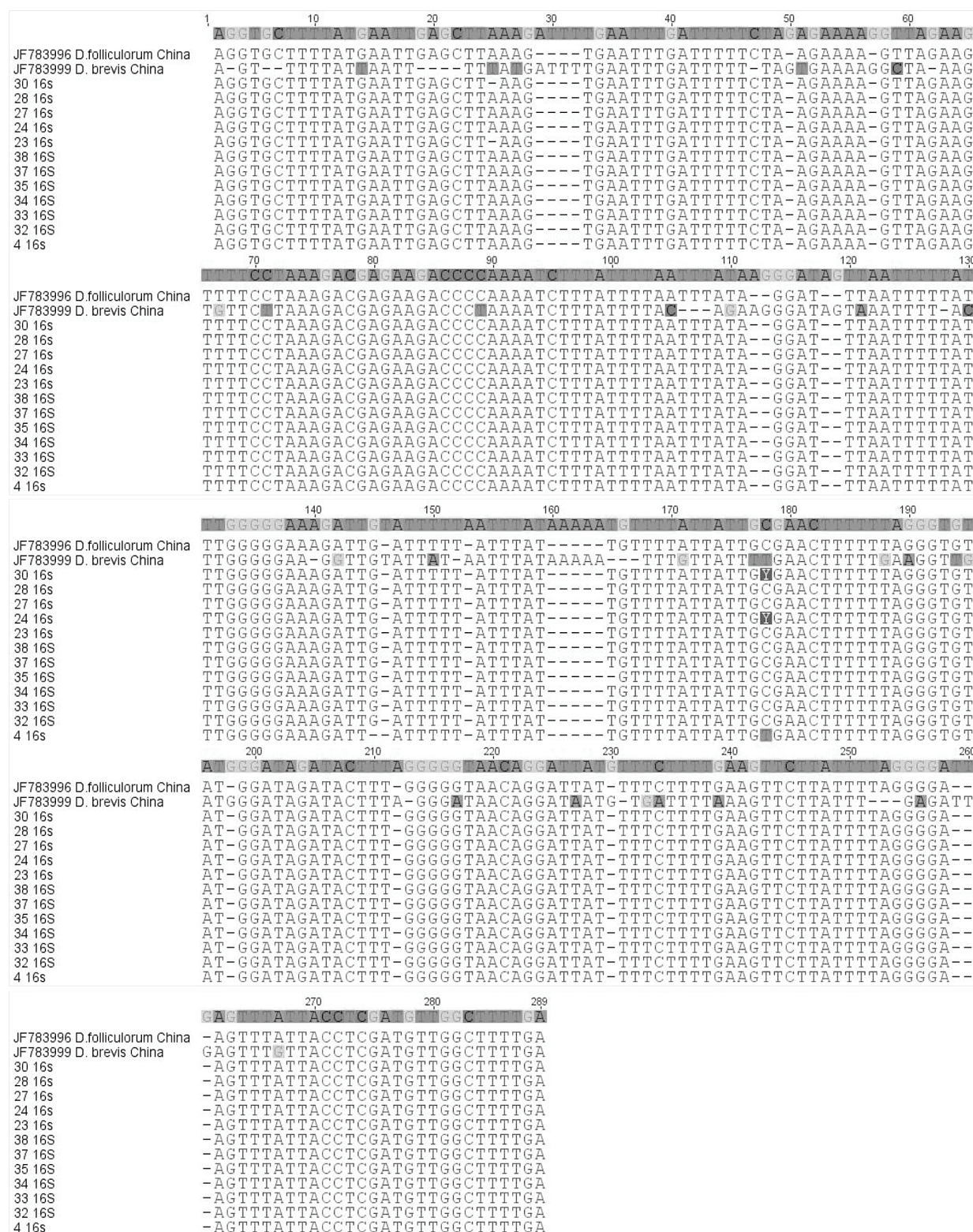
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen 16S các mẫu *Demodex* spp.

(-) Chứng âm; 1: Chứng dương của *D. folliculorum* (955bp); DNA ladder 100bp; Mẫu 1-12 thu thập ở da viêm của bệnh nhân.

Định loài *Demodex* spp. bằng PCR đã thu nhận sản phẩm PCR của gen 16S có độ dài dự kiến 955bp. Cặp mồi dùng trong phản ứng PCR thu nhận gen 16S đặc hiệu, sản phẩm PCR thu được có kích thước mong muốn (955bp) và mẫu *Demodex* spp. thu được trên da viêm đều là *D. folliculorum*.

3.2. Giải trình trình tự gen 16S các mẫu *Demodex* spp. tại điểm nghiên cứu

Sau thực hiện phản ứng PCR, giải trình trình tự đoạn gen 16S của *Demodex* spp. trên các mẫu thu được ở nhiều vị trí khác nhau trên da viêm. Giải trình trình tự gen 16S của *Demodex* spp. được thể hiện tại Hình 1. Trình tự gen thu nhận được kiểm tra bằng chương trình BLAST trên ngân hàng gen và xác nhận là trình tự gen 16S của *D. folliculorum*. Đoạn trình tự thu được có kích thước 955bp và giải trình trình tự đúng là gen 16S của *D. folliculorum*, các chuỗi nucleotide này được phân tích so sánh với nhau.



Hình 2. Phân tích các trình tự nucleotide gen 16S của chủng *D. folliculorum*

Chuỗi gen 16S của *D. folliculorum* thu nhận tại Việt Nam được ký hiệu theo mã số bệnh nhân. Trong đó, trình tự gen thu nhận so sánh với nhau và với trình tự gen 16S *D. folliculorum* trên ngân hàng gen, cụ thể mẫu tham chiếu ở đây là trình tự gen 16S của *D. folliculorum* China (mã số trên ngân hàng gen là JF783996) và trình

tự gen 16S của *D. brevis* China (JF783999). Phân tích chỉ lọc ra các phân lập có sự sai khác nucleotide, còn các phân lập giống nhau chỉ lấy 20% số mẫu đại diện và toàn bộ trình tự gen thể hiện rõ.

Bảng 1. Các vị trí có sự thay đổi nucleotide giữa các mẫu *D. folliculorum*

STT mẫu	Các vị trí có sự thay đổi nucleotide			
	136	380	576	582
DF-1	G	T	C	A
	G	T	C	A
	G	A	C	A
	G	A	C	A
	G	A	C	A
	G	A	C	A
	A	T	T	G
	A	T	C	A
DF-ref-VN	G	T	C	A
DF-ref	G	T	C	G

Qua so sánh phân tích các chuỗi gen thu được cho thấy trình tự nucleotide gen mã hóa cho gen 16S của *D. folliculorum* trên các bệnh nhân nghiên cứu có 4 vị trí sai khác so với mẫu tham khảo là *D. folliculorum* Việt Nam. Các vị trí có sự thay đổi nucleotide ghi nhận được là 136, 380, 576 và 582. Không có nhiều sai khác về nucleotide được ghi nhận trong đoạn gen 16S, điều này cho thấy đoạn gen này có tính bảo tồn cao.

	JF783996 D.f	JF783999 D.b	30 16S	28 16S	27 16S	24 16S	23 16S	38 16S	37 16S	35 16S	34 16S	33 16S	32 16S	4 16S
JF783996 D.f		74.3	99.4	100	100	99.8	99.6	100	100	99.6	100	100	100	99.2
JF783999 D.b	74.3		74.5	74.3	74.5	74.3	74.3	74.3	74.6	74.3	74.3	74.3	74.3	
30 16S	99.4	74.5		99.4	99.4	99.8	99.4	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	99.1	
28 16S	100	74.3	99.4		100	99.8	99.6	100	100	99.6	100	100	100	99.2
27 16S	100	74.3	99.4	100		99.8	99.6	100	100	99.6	100	100	100	99.2
24 16S	99.8	74.5	99.4	99.8	99.8		99.4	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	99.4
23 16S	99.6	74.3	99.8	99.6	99.6	99.4		99.6	99.6	99.2	99.6	99.6	99.6	98.9
38 16S	100	74.3	99.4	100	100	99.8	99.6		100	99.6	100	100	100	99.2
37 16S	100	74.3	99.4	100	100	99.8	99.6	100		99.6	100	100	100	99.2
35 16S	99.6	74.6	99.1	99.6	99.6	99.4	99.2	99.6	99.6		99.6	99.6	99.6	98.9
34 16S	100	74.3	99.4	100	100	99.8	99.6	100	100	99.6		100	100	99.2
33 16S	100	74.3	99.4	100	100	99.8	99.6	100	100	99.6	100		100	99.2
32 16S	100	74.3	99.4	100	100	99.8	99.6	100	100	99.6	100	100		99.2
4 16S	99.2	74.3	99.1	99.2	99.2	99.4	98.9	99.2	98.9	99.2	99.2	99.2		

Hình 3. So sánh độ tương đồng giữa *D. folliculorum* mẫu với loài *Demodex* spp. khác

Dựa vào độ tương đồng và khác biệt nucleotide trong trình tự gen 16S, tương đồng giữa các chuỗi gen cũng được phân tích so sánh với trình tự từ ngân hàng gen, *D. folliculorum* China với mã số trên ngân hàng gen JF783996 và trình tự gen 16S của *D. brevis* China (JF783999). Phân tích tỷ lệ tương đồng gen 16S cho thấy các mẫu trong nghiên cứu tương đồng cao với tỷ lệ 99-100%, ngoại trừ 4 mẫu có sự sai khác ở một vài vị trí nucleotide. Khi so sánh các mẫu thu được trong nghiên cứu này với mẫu *D. folliculorum* China (JF783996) tỷ lệ tương đồng trên 99%. Tuy nhiên, khi so sánh phân tích với các loài khác như *D. brevis* thì tỷ lệ tương đồng về gen chỉ 75%, điều này chỉ ra đoạn gen 16S đúng và chỉ thị di truyền sử dụng trong xác định loài *Demodex* spp.

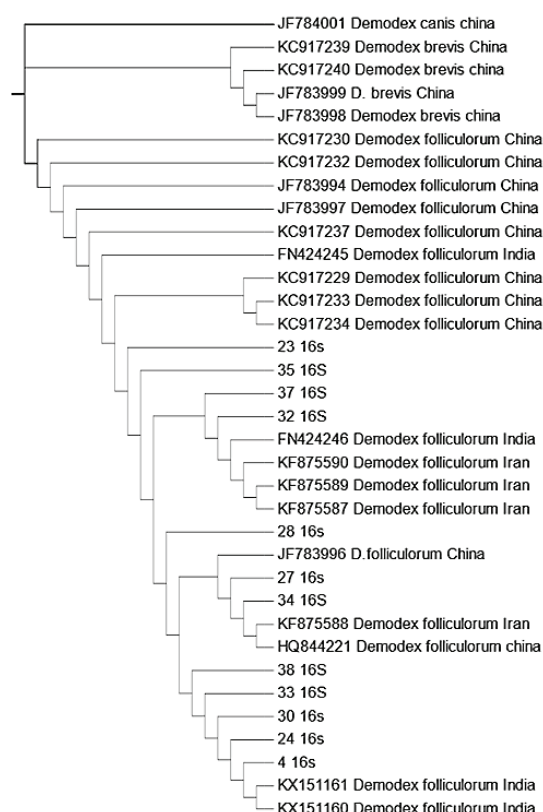
3.3. Phân tích thành phần nucleotide vùng gen 16S của *D. folliculorum***Bảng 2. Tỷ lệ các loại nucleotide của các mẫu *D. folliculorum***

Mã số các mẫu <i>Demodex</i>	A%	C%	T%	G%	A+T	G+C	Tổng
JF783996 <i>D. folliculorum</i>	27,55	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
JF783999 <i>D. brevis</i>	30,57	6,42	20,75	42,26	72,83	27,17	200
30 16S	27,27	7,58	20,83	43,94	71,21	28,41	199
28 16S	27,55	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
27 16S	27,55	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
24 16S	27,55	7,55	20,75	43,77	71,32	28,30	199
23 16S	27,27	7,95	20,83	43,94	71,21	28,79	200
38 16S	27,27	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
37 16S	27,27	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
35 16S	27,65	7,95	20,83	43,56	71,21	28,79	200
34 16S	27,55	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
33 16S	27,55	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
32 16S	27,55	7,92	20,75	43,77	71,32	28,68	200
4 16S	27,65	7,58	20,45	44,32	71,97	28,03	200
Trung bình	27,70	7,74	20,75	43,71	71,45	28,50	200

Phân tích chuỗi gen thu được cho thấy tỷ lệ nucleotide mã hóa gen 16S của *D. folliculorum* của bệnh nhân đến từ vùng khác nhau có tỷ lệ từng loại nucleotide tương đồng với mẫu tham chiếu *D. folliculorum* China (JF783996) và khác biệt từng loại nucleotide mẫu *D. brevis* China trên ngân hàng gen (JF783999). Phân tích thành phần nucleotide gen 16S *D. folliculorum* cho thấy G+C chiếm từ 27-29% và trong trình tự gen 16S của *D. folliculorum* có trình tự lặp đi lặp lại của 2; 3; 4 nucleotide liên nhau. Dựa trên kết quả thành phần nucleotide và vị trí sai khác giữa các phân lập gen 16S của *D. folliculorum* tại Việt Nam cho thấy có 4 kiểu gen đơn bộ được phát hiện trong nghiên cứu này, trong đó các mẫu con *Demodex* spp. trưởng thành xuất hiện 4 kiểu, mẫu ấu trùng spp. có 3 kiểu.

3.4. Phân tích mối quan hệ phả hệ của *Demodex* spp. dựa vào gen 16S

Trình tự gen 16S *D. folliculorum* thu nhận trên bệnh nhân cùng với trình tự 16S một số loài *Demodex* spp. trong ngân hàng gen để phân tích mối quan hệ phả hệ theo phương pháp Neighbor Joining trong phần mềm Mega 6.0. Mối quan hệ phả hệ các loài *D. folliculorum* được thể hiện trình tự 16S có thể có những sai khác tại vài vị trí nucleotide, nhưng mỗi loài đều tập trung tạo nhóm riêng biệt.



Hình 4. Quan hệ phả hệ giữa trình tự acid amin gen 16S của *D. folliculorum* và các loài *Demodex* spp. trên ngân hàng gen.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu chỉ ra các mẫu phân lập có trình tự 16S rDNA ty thể bảo tồn với sự sai khác nhỏ cùng loài. Các phân lập đều thuộc *D. folliculorum* dựa trên giải trình tự, 3 mẫu khác loài *D. brevis* với đặc điểm hình thái dù về mặt lý thuyết *D. folliculorum* dài 0,3-0,4 mm và *D. brevis* dài 0,15-0,2 mm có thể phân biệt được nhưng có thể hình thái bị thay đổi không rõ ràng trên tiêu bản soi tươi. Phân tích di truyền phả hệ cho thấy các phân lập kết cụm với trình tự khác *D. folliculorum* khi tham chiếu ngân hàng gen có sự khác biệt tính đa hình đơn nucleotide nhỏ. Các phân lập có tần suất A+T nucleotide hơn G+C nucleotide và ước tính sai số chuyển (transition bias R) là 0,93. Điều này cho thấy có sự đồng thuận với các nghiên cứu khác dùng đoạn gen ty thể cho tần số A+T cao hơn G+C, trong đó khoảng cách xa di truyền trung bình trong các loài *Demodex* spp. hơn khoảng cách nội loài. Trong khi Zhou và cộng sự nhìn thấy sự chuyển dạng giữa các loài *Demodex* là nhỏ hơn [6],[7], họ tìm thấy sự khác biệt giữa *D. folliculorum* và *D. canis* nhỏ hơn so với giữa *D. folliculorum* và *D. brevis*, nên trình tự một phần mt 16S rDNA có thể dùng xác định sự khác nhau giữa 3 loài *Demodex* spp. và trong nghiên cứu này cho thấy *D. folliculorum* gần gũi *D. canis* hơn *D. brevis*.

Pawan Prasher phân tích gộp về tính sai khác, khoảng cách di truyền và tính chuyển dạng của phân lập [4]. Ngoài ra, đoạn 16S rDNA các mẫu *D. folliculorum* trên nhiều vị trí da viêm của bệnh nhân chưa thể biết được loài *D. folliculorum* từ đâu. Điều này có thể lý giải một là trình tự một phần của (mt) 16S rDNA được bảo tồn

cao và không thể dùng để xác định nội loài; thứ hai *D. folliculorum* chỉ có một loài và sự khác biệt dưới loài (subspecies) từng xảy ra do thay đổi vị trí ký sinh và vùng địa lý. Nghiên cứu này đã chỉ ra các phân lập *Demodex* là 99% bao phủ cả phân lập *D. folliculorum* từ Trung Quốc [6],[7] khi nghiên cứu cây di truyền phả hệ trong giống *Demodex*, chỉ số bootstrap cho biết độ tin cậy clade cao 100% hỗ trợ cho sự có mặt của các nhánh chị em, nơi mà ở đó có hai loài *D. folliculorum* và *D. canis* kết cụm nhau (bootstrap 96-100%), nhưng một số *D. brevis* dường như xa hơn (bootstrap 98-100%). Phả hệ di truyền chứng minh ở cấp độ phân tử, *D. folliculorum*, *D. canis* và *D. brevis* là 3 loài khác nhau và *D. folliculorum* gần *D. canis* hơn *D. brevis* và cũng phù hợp với phân loại hình thái. Điều này có thể do cả *D. folliculorum* và *D. brevis* là ký sinh trùng ở người, nhưng ký sinh ở các vị trí khác nhau nang lông và tuyến bã có môi trường khác nhau. *D. canis* hiện diện trong nang lông chó, ở đó môi trường giống với nang lông tóc của người nên dẫn đến kiểu hình và kiểu gen của *D. folliculorum* và *D. canis* giống nhau.

5. KẾT LUẬN

Tất cả phân lập đều thuộc loài *D. folliculorum*, giải trình tự một phần gen ty thể mt 16S rDNA có thể ứng dụng phân tích mối quan hệ di truyền phả hệ ở mức độ giống loài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Fen Wei, Kevin J, Varghese, Hongxiang Chen (2024). Evidence for the clinical association between Demodex and rosacea: A review. *Dermatology*;240(1):95-102.
- [2] Gilbert Smith, Alejandro Manzano-Marín, Henk R. Braig (2022). Human follicular mites: Ectoparasites becoming symbionts. *Mol. Biol. Evol.* 39(6):msac125
- [3] Hsu CK, Hsu MM, Lee JY (2024). Demodicosis: A clinicopathological study. *J Am Acad Dermatol.*;60:453-62.
- [4] Pawan Prasher, Dolly Baghra, Drishtant Singh, Anup Kumar Kesavan (2020). Molecular identification and phylogenetic relationship of Demodex mites based on mitochondrial 16S rDNA. *Trop Parasitol.*; 10(2):136-141.
- [5] Sara Królik, Agnieszka Muth, Dorota Jenerowicz (2020). Demodicosis in humans as a current problem in dermatology and ophthalmology. *Journal of Face Aesthetics* 2020;3(2):108-121
- [6] Zhao YE, Wu LP, Hu L, Xu Y, Wang ZH (2012). Sequencing for complete rDNA sequences (18S, ITS1, 5.8S, ITS2, and 28S rDNA) of Demodex and phylogenetic analysis of Acari based on 18S and 28S rDNA. *Parasitol Res.* 2012;111:2109-14.
- [7] Zhao YE, Ma JX, Hu L, Wu LP, De Rojas M (2013). Discrimination between Demodex folliculorum (Acari: Demodicidae) isolates from China and Spain based on mitochondrial cox1 sequences. *J Zhejiang Univ Sci B.* (14):829-36.