

NGHIÊN CỨU CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN CỦA ẤU TRÙNG SÁN LÁ KÝ SINH Ở VỊT Ở NGOÀI MÔI TRƯỜNG VÀ TRONG VẬT CHỦ TRUNG GIAN (ỐC NƯỚC NGỌT)

*Huỳnh Vũ Vy, Nguyễn Đức Tân,
Nguyễn Văn Thoại, Lê Hứa Ngọc Lược*
Bộ môn nghiên cứu Ký Sinh Trùng, Phân viện Thú y miền Trung

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu thực nghiệm về các giai đoạn phát triển của ấu trùng sán lá cho thấy trong môi trường nước ngọt tự nhiên, trứng sán lá *Prosthogonimus* spp. phát triển thành ấu trùng miracidium sau 10-16 ngày. Trong 12 loài ốc nước ngọt được gây nhiễm, chỉ phát hiện ốc *Bithynia siamensis* là vật chủ trung gian thứ nhất của ấu trùng sán lá *Prosthogonimus* spp. Sau khi ốc *B. siamensis* ăn phải trứng sán, miracidium thoát ra khỏi vỏ trứng, phát triển qua các giai đoạn sporocyst, redia và cuối cùng là cercaria. Sporocyst có dạng hình trứng hoặc hình oval, sporocyst non chứa nhiều tế bào mầm. Các tế bào này tiếp tục phân chia, phát triển và dần dần hình thành nên các vách ngăn, tạo nên những hình túi độc lập (redia I). Redia I có dạng hình cành cây, chứa nhiều tế bào mầm. Redia II có hình bầu dục, chứa nhiều cercaria. Cercaria thoát ra từ redia, sống trong ốc, sau đó di chuyển ra môi trường, bơi lội tự do trong nước sau 25 ngày từ khi ốc nhiễm mầm bệnh. Cercaria chứa nhiều hạt sắc tố màu xám, có giác miệng, giác bụng, ống tiêu hóa, chiều dài cơ thể từ 100-120 μm , chiều rộng từ 60-70 μm .

Từ khóa: trứng, ấu trùng, ốc nước ngọt, sán lá sinh sản, vật chủ trung gian.

Research on developing stages of oviduct fluke larvae in duck in the environment and intermediate host (freshwater snail)

*Huynh Vu Vy, Nguyen Duc Tan,
Nguyen Van Thoai, Le Hua Ngoc Luc*

SUMMARY

The result of experimental study on the developing stages of the oviduct fluke larvae in duck in the environment showed that in freshwater environment, eggs of *Prosthogonimus* spp. developed into miracidium larvae after 10-16 days. Out of 12 freshwater snail species used for experimental infection with fluke larvae, only the *Bithynia siamensis* was found to be the first intermediate host. The oviduct fluke eggs were swallowed by *B. siamensis* then miracidium was released out of egg and developed through several stages, such as: sporocyst, redia and cercaria. The sporocyst looked like egg or oval shape, the young sporocyst contained many germ cells. These cells continued to divide, develop and form partitions, creating separate pockets (redia I). Redia I looked like a tree branch and contained a lot of germ cells. The redia II looked like oval shape and contained many cercaria. Cercaria was released from redia II, lived in the snail, then moved out of the snail, swam freely in the freshwater environment. The cercaria contained a large number of the gray pigmented, appeared oral sucker, ventral sucker and digestive tract. The body length of cercaria was 100-120 μm and the body width was 60-70 μm .

Keywords: egg, larvae, freshwater snail, oviduct fluke, intermediate host.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sán lá sinh sản trên vịt do loài *Prosthogonimus* spp. gây ra. Bệnh xuất hiện phổ biến ở các nước Châu Âu, Châu Mỹ, Châu Phi và Châu Á (Macy, 1965; Saif, 2008; Naem, 2003; Taylor 2007). Vòng đời của *Prosthogonimus* spp. phải qua 2 vật chủ trung gian: Vật chủ trung gian thứ nhất là ốc nước ngọt, vật chủ trung gian thứ 2 là ấu trùng chuồn chuồn và chuồn chuồn. Gia cầm nhiễm bệnh do ăn phải ấu trùng chuồn chuồn hoặc chuồn chuồn chứa nang kén sán (McDonald, 1969). Sán trưởng thành ký sinh ở túi Fabricius, ống dẫn trứng và lỗ huyết. Sán ký sinh gây viêm ống dẫn trứng, viêm lỗ huyết và viêm phúc mạc (Soulsby, 1982; Arundel và cs, 1980). Trong túi Fabricius, sán làm viêm, thoái hóa tế bào biểu mô và thâm nhiễm tế bào kẽ, bao gồm lymphocytes, tương bào, bạch cầu a xít và đại thực bào (Arundel và cs, 1980).

Ở nước ta, Houdemer lần đầu phát hiện loài sán này gây bệnh trên vịt tại một số tỉnh phía Bắc. Đến nay, bệnh phân bố khắp các vùng miền: Từ miền núi đến trung du và đồng bằng, nhất là những nơi có nhiều ao, hồ, đầm, phá, ruộng nước,... Cho đến nay, chưa có công trình nào nghiên cứu về sự phát triển của mầm bệnh ở vật chủ trung gian (ốc nước ngọt) trong điều kiện sinh thái ở Việt Nam. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu vấn đề này nhằm làm rõ hơn mối quan hệ sinh thái giữa ký sinh trùng (*Prosthogonimus* spp.) và vật chủ.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Ốc nước ngọt, sán lá sinh sản ký sinh trên vịt và một số dụng cụ, hóa chất cần thiết để nghiên cứu ký sinh trùng.

Bể nuôi ốc với kích thước dài 1,5 m, rộng 70 cm, sâu 60 cm. Đáy bể có phủ lớp bùn dày khoảng 15-20 cm, mực nước trong bể duy trì từ 30-35 cm. Trong bể có bèo, rong rêu, cây cỏ thủy sinh đảm bảo các điều kiện giống như trong tự nhiên (không cần bổ sung thức ăn).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu trứng sán trong túi Fabricius hoặc thu thập sán từ vịt nhiễm bệnh trong tự nhiên, đưa sán trong nước sinh lý, sán thường sống được khoảng 3-4 giờ sau khi tách khỏi cơ thể vịt và tiếp tục thải trứng. Sau đó ly tâm, thu trứng cho vào môi trường nước ngọt tự nhiên, để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (22-23°C) và theo dõi quá trình phát triển của trứng dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100 đến 400 lần). Đếm toàn bộ số trứng có ấu trùng và trứng không có ấu trùng ở trong đĩa petri.

Gây nhiễm ốc: Các loại ốc nước ngọt được thu thập trong môi trường tự nhiên tại huyện An Lão, Vân Canh, Phù Cát, An Nhơn, Phù Mỹ, Tuy Phước (tỉnh Bình Định); huyện Đông Hòa, Phú Hòa, Tuy An, Sông Hinh, Sông Cầu (tỉnh Phú Yên); huyện Vạn Ninh, Ninh Hòa, Cam Ranh, Khánh Vĩnh, Khánh Sơn (tỉnh Khánh Hòa). Sau khi thu thập, tiến hành phân loại dựa theo tài liệu của Đặng Ngọc Thanh và cs (1980) và tài liệu khóa phân loại ốc của Burch (1982).

Sau khi định loại, ốc được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm để chúng đẻ ra thế hệ sau dùng gây nhiễm (một số ốc nuôi khó sinh sản thì nuôi khoảng 2-3 tháng để chúng thải hết mầm bệnh nếu bị nhiễm trong tự nhiên). Trước khi gây nhiễm, chúng được xét nghiệm ngẫu nhiên để đảm bảo không nhiễm mầm bệnh sán lá sinh sản.

Tiến hành gây nhiễm: Cho ốc vào cốc thủy tinh có chứa khoảng 1000 ml nước muối sinh lý, sau đó cho trứng sán đã hình thành ấu trùng miracidium vào cốc thủy tinh (Mỗi cốc có 100 ốc, gây nhiễm khoảng 1000-1200 trứng sán). Sau gây nhiễm, đưa cốc thủy tinh vào chỗ bóng tối (khoảng 8-12 giờ), tạo điều kiện ốc ăn hết trứng. Sau đó thả ốc xuống bể thí nghiệm, định kỳ 2 ngày/lần xét nghiệm ốc, theo dõi quá trình phát triển của mầm bệnh. Mỗi thí nghiệm bố trí 3 lô và 1 lô đối chứng (lặp lại 3 lần).

Phương pháp xét nghiệm ốc: Xét nghiệm được tiến hành từng cá thể ốc, ép giữa 2 tấm kính và kiểm tra dưới kính hiển vi để tìm ấu trùng sán lá sinh sản.

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

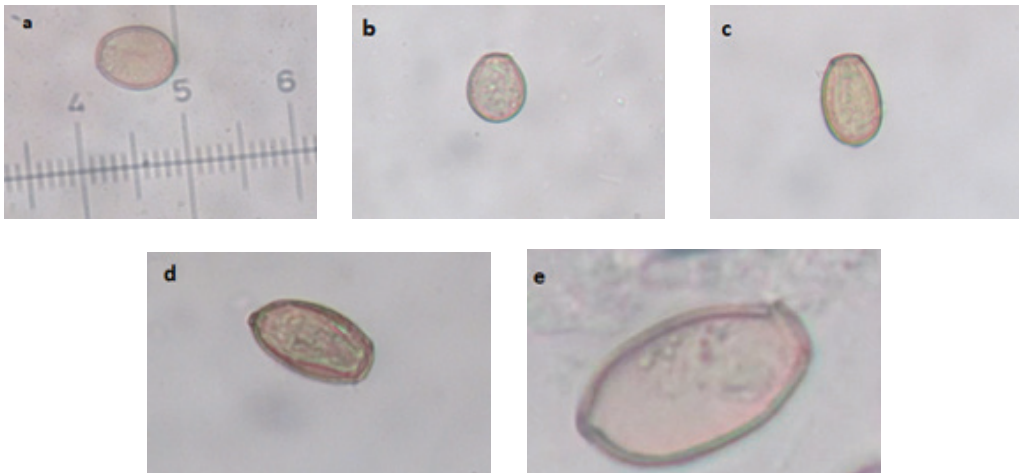
3.1. Quá trình phát triển của trứng sán lá sinh sản của vịt ở môi trường nước ngọt

Trứng sán lá sinh sản thu thập từ vịt

nhiễm bệnh trong tự nhiên, cho vào môi trường nước ngọt tự nhiên, theo dõi quá trình phát triển của mầm bệnh ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (22-23°C). Kết quả thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Quá trình phát triển của trứng ở môi trường nước ngọt tự nhiên

Thời gian (ngày)	Những thay đổi của trứng	Tỷ lệ trứng thay đổi (% , n=16915 trứng)
1-2	Tế bào phôi phủ kín trứng.	100,00
3-9	Tế bào phôi phân chia thành nhiều tế bào, sau đó tạo thành 1 khối thống nhất.	89,18
10-16	Các tế bào phôi thành một khối thống nhất. Ấu trùng hình thành nằm trong vỏ trứng.	72,94



Hình 1. Các giai đoạn trứng sán lá sinh sản ở môi trường nước ngọt tự nhiên (100X)
 Trứng sán mới đẻ tế bào phôi phủ kín (a); Trứng 3-9 ngày: phôi bào phân chia thành nhiều tế bào (b), sau đó hình thành 1 khối thống nhất (c); Trứng 10-16 ngày, ấu trùng miracidium nằm trong vỏ (d); trứng bị chết ấu trùng (e)

Kết quả ở bảng 1 và hình 1 cho thấy, trứng sán mới đẻ có hình bầu dục, 2 lớp vỏ, đầu nhỏ có nắp, tế bào phôi phủ kín trứng, chiều dài 24-33 µm, chiều rộng 12-16 µm. Sau ngày thứ 3, tế bào phôi phân chia thành nhiều tế bào, sau đó xuất hiện dạng phôi dâu, phôi nang (một khối tế bào đặc). Từ ngày thứ 10 đến ngày 16, tế bào phôi hình thành ấu trùng (miracidium) nằm trong vỏ trứng, với tỷ lệ 72,94 %.

Theo dõi quá trình phát triển của mầm bệnh cho thấy, miracidium hình thành và nằm trong vỏ trứng, không thoát ra ngoài môi trường. Ấu trùng tiếp tục sống trong trứng khoảng 9-11 ngày, sau đó bị chết nếu không bắt gặp vật chủ trung gian thích hợp, các tế bào co cụm từng đám hoặc bị phân hủy (hình 1-e).

3.2. Xác định thành phần vật chủ trung gian của sán lá sinh sản trên vịt

Tổng số 12 loài ốc nước ngọt thu thập được trong tự nhiên tại 3 tỉnh Bình Định, Phú Yên và Khánh Hòa. Tiến hành gây nhiễm trứng

sán lá sinh sản chứa ấu trùng miracidium cho ốc nước ngọt để xác định thành phần vật chủ trung gian.

Bảng 2. Kết quả gây nhiễm trứng sán lá sinh sản cho ốc nước ngọt

Họ	Loài ốc	Số ốc gây nhiễm	Số ốc nhiễm (%)
Bithyniidae	<i>Bithynia siamensis</i>	600	431 (71,83)
	<i>Melanooides tuberculata</i>	600	0
Thiaridae	<i>Sermyla tornatella</i>	600	0
	<i>Tarebia granifera</i>	600	0
Ancylidae	<i>Polypylis hemisphaerula</i>	600	0
Lymnaeidae	<i>Lymnaea swinhoiei</i>	600	0
	<i>Lymnaea viridis</i>	600	0
Littoridinidae	<i>Pachydrobia</i> sp.	600	0
Planorbidae	<i>Indoplanorbis exustus</i>	600	0
Ampullariidae	<i>Pomacea canaliculata</i>	600	0
Viviparidae	<i>Mekongia</i> sp.	600	0
	<i>Eyriesia</i> sp.	600	0

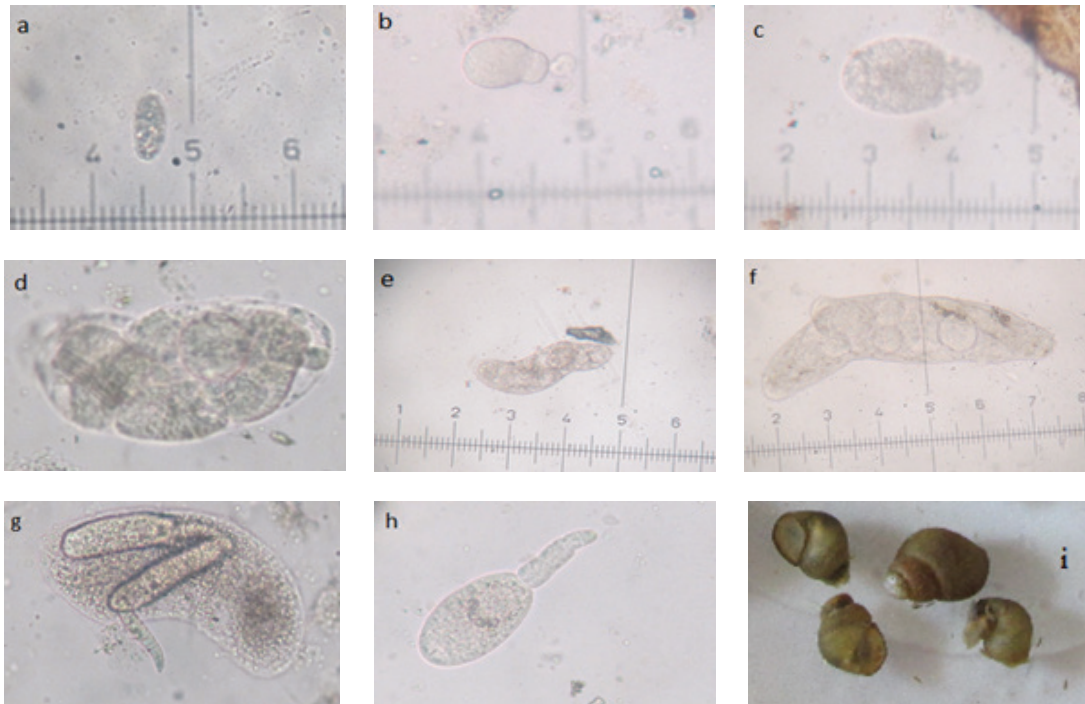
Kết quả ở bảng 2 chỉ phát hiện ốc *Bithynia siamensis* là thích hợp để mầm bệnh sán lá sinh sản tồn tại và phát triển. Trong ốc này, ấu trùng sán lá

sinh sản phát triển qua các giai đoạn miracidium, sporocyst, redia và cercaria. Các giai đoạn phát triển của ấu trùng trên ốc được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Các giai đoạn phát triển của ấu trùng sán lá sinh sản trên ốc *Bithynia siamensis*

Thời gian sau gây nhiễm	Dạng ấu trùng	Hình dạng ấu trùng	Kích thước (μm , n=250)	
			Dài	Rộng
Đến 4 giờ	Miracidium	Hình oval, lông bao phủ cơ thể	30-35 ($32 \pm 1,7$)	17-20 ($18 \pm 1,2$)
Ngày thứ 2	Sporocyst non	Hình oval hoặc hình trứng, bên trong có các tế bào mầm	36-41 ($38 \pm 1,9$)	18-23 ($20 \pm 2,0$)
	Sporocyst già	Hình bầu dục, bên trong là các Redia I	330-360 (347 ± 24)	220-250 ($234 \pm 13,3$)
Ngày thứ 9	Redia I	Dạng hình cành cây, bên trong có các tế bào hình tròn	150-600 (360 ± 174)	50-100 ($74 \pm 18,5$)
	Redia II	Hình bầu dục, bên trong có Cercaria	450-600 (510 ± 59)	100-160 ($130 \pm 22,4$)
	Sporocyst Redia I, II	Nt	Nt	Nt
Ngày thứ 13	Cercaria	Ấu trùng có phần thân và đuôi, sống trong cơ thể ốc	100-120 ($110 \pm 7,9$)	50-70 ($60 \pm 6,5$)
Ngày thứ 25	Cercaria thoát ra khỏi ốc	Ấu trùng có phần thân và đuôi, thoát khỏi ốc, bơi trong nước.		

Nt: giống như cách mô tả trên



Hình 2. Các giai đoạn ấu trùng sán lá sinh sản phát triển trong ốc *Bithynia siamensis* (100X)
a: Miracidium; b và c: Sporocyst non (chứa nhiều sporocyst con); d: Sporocyst già (chứa nhiều redia); e và f: Redia I (chứa nhiều redia con); g: Redia II (chứa nhiều cercaria); h: Cercaria; i: ốc Bithynia siamensis (vật chủ trung gian thứ nhất)

Qua bảng 3 cho thấy, ốc *Bithynia siamensis* ăn phải trứng sán chứa ấu trùng miracidium. Trong vòng 4 giờ, miracidium thoát khỏi vỏ trứng sán, có hình oval, lông bao phủ, chiều rộng $18 \pm 1,2 \mu\text{m}$, chiều dài $32 \pm 1,7 \mu\text{m}$.

Đến ngày thứ 2, miracidium hình thành sporocyst non, có dạng hình oval hoặc hình trứng, bên trong có nhiều tế bào mầm. Kích thước: chiều rộng $20 \pm 2,0 \mu\text{m}$, chiều dài $38 \pm 1,9 \mu\text{m}$. Các tế bào này tiếp tục phân chia, phát triển và dần dần hình thành nên các vách ngăn, tạo nên những hình túi độc lập.

Ngày thứ 9, sporocyst già có hình bầu dục, bên trong có các redia I. Kích thước chiều rộng $234 \pm 13,3 \mu\text{m}$, chiều dài $347 \pm 24 \mu\text{m}$. Redia I sinh ra từ sporocyst già, có dạng hình cành cây, bên trong có các tế bào hình tròn. Kích thước: chiều rộng $74 \pm 18,5 \mu\text{m}$, chiều dài $360 \pm 174 \mu\text{m}$. Redia II sinh ra từ redia I, có dạng hình bầu dục, bên trong có 5-9 ceraria. Kích thước chiều rộng $130 \pm 22,4 \mu\text{m}$, chiều dài $510 \pm 59 \mu\text{m}$.

Sau ngày 13, một số cercaria thoát ra khỏi redia II và sống trong cơ thể ốc.

Đến ngày thứ 25. Cercaria thoát ra từ redia II, ra khỏi ốc, bơi tự do trong nước. Cấu tạo cơ thể chia thành 2 phần (phần thân và phần đuôi): Phần thân hình bầu dục, có giác miệng, giác bụng, hầu, thực quản, ruột. Phần đuôi mảnh, dài gần bằng phần thân, đuôi là cơ quan giúp cho ấu trùng bơi lội tự do trong nước.

Theo dõi thí nghiệm chúng tôi thấy: Cercaria thoát ra khỏi ốc, bơi lội tự do trong môi trường nước. Lúc đầu ấu trùng hoạt động mạnh, sau đó yếu dần và ngừng hoạt động (chết). Thời gian hoạt động ở môi trường nước khoảng 12 đến 48 giờ. Khi bị chết, chúng chìm xuống đáy và dần dần bị phân hủy (mầm bệnh không tạo thành nang kén để tồn tại). Điều này cho thấy sau khi mầm bệnh phát triển trên ốc, cần tiếp tục phát triển trên một vật chủ trung gian nữa để đến giai đoạn ấu trùng gây nhiễm.

Như vậy, kết quả trình bày trên đây cho

thấy ốc *B. siamensis* là vật chủ trung gian thứ nhất của sán lá sinh sản ở vịt. Ốc *B. siamensis* khuếch đại mầm bệnh. Trong cơ thể ốc này, trứng chứa ấu trùng sán lá sinh sản phát triển từ dạng miracidium thành sporocyst, redia và cuối cùng là cercaria chui ra khỏi ốc.

Quá trình phát triển của ấu trùng sán lá sinh sản gây bệnh ở vịt trên đây giống như ấu trùng sán lá gan nhỏ gây bệnh ở người và động vật, trong đó vật chủ trung gian thứ nhất của sán lá gan nhỏ là ốc nước ngọt, gồm các loài ốc: *Bithynia striatulus*, *B. fuchsiana*, *B. siamensis*, *B. longicornis*, *Parafossarulus striatulus* (Kaewkes S, 2003; Petney T và cs, 2012; Suwannatrai K và cs, 2016; Nakamura S, 2017), *B. goniomphalos* và *B. funiculata* (Dao H. T. T và cs, 2017). Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ xét nghiệm ấu trùng trong 12 loài ốc đã xét nghiệm (bảng 3.2) và xác định chỉ có ốc *B. siamensis* mang ấu trùng sán lá sinh sản trên vịt. Hiện chúng tôi chưa thu thập được và chưa xác định nếu các loài *Bithynia* spp. khác cũng có thể nhiễm mầm bệnh.

IV. KẾT LUẬN

Trong môi trường nước ngọt tự nhiên, ở nhiệt độ 22-23°C, trứng sán lá sinh sản *Prosthogonimus* spp. phát triển thành ấu trùng miracidium sau 10-16 ngày.

Trong 12 loài ốc nước ngọt được gây nhiễm, chỉ phát hiện ốc *Bithynia siamensis* là vật chủ trung gian thứ nhất của sán lá sinh sản trên vịt. Trong ốc, ấu trùng phát triển qua các giai đoạn miracidium, sporocyst, redia và cuối cùng là cercaria thoát ra khỏi ốc, bơi tự do trong nước sau 25 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Ngọc Thanh, Thái Trần Bái, Phạm Văn Miên (1980), *Định loại động vật không xương sống nước ngọt bắc Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
- Arundel, J., Kingston, J., Kerr, P., 1980. *Prosthogonimus pellucidus* in domestic poultry. Aust. Vet J 56, 460-461.
- Burch, J., 1982. North American freshwater snails, identification keys, generic synonymy, supplemental notes, glossary, references, index. Walkerana 1: 217-365. Ann Arbor, Michigan.
- Dao, H. T. T., Dermauw, V., Gabriel, S., Suwannatrai, A., Tesana, S., Nguyen, G. T. T., & Dorny, P. 2017. Opisthorchis viverrini infection in the snail and fish intermediate hosts in Central Vietnam. Acta Trop., 170: 120-125
- Kaewkes, S. 2003. Taxonomy and biology of liver flukes. Acta Trop., 88(3): 177-186
- Macy, R. W., 1965. On the life cycle of the trematode *Prosthogonimus cuneatus* (Rudolphi, 1809) (Plagiorchiidae) in Egypt. Trans Am Microsc Soc. 84:577-80.
- McDonald, M., 1969. Catalogue of helminths of waterfowl (Anatidae). Spec. scient. Rep. US Fish Wildl. Serv., Wildlife.
- Naem, S., Golpayegani, M. H., 2003. *Prosthogonimus macrorchis* in the albumin of the egg from Sari Iran. Iran J of Vet Res, Uni of Shiraz 4, 160-2.
- Nakamura, S. 2017. Present Situation of Opisthorchiasis in Vientiane Capital, Lao Peoples' Democratic Republic. Nihon Eiseigaku Zasshi, 72(2): 101-105.
- Saif, Y. M., 2008. Diseases of poultry. 12th Ed. Balckwell publishing.
- Petney, T., Sithithaworn, P., Andrews, R., Kiatsopit, N., Tesana, S., Grundy-Warr, C., & Ziegler, A. 2012. The ecology of the *Bithynia* first intermediate hosts of *Opisthorchis viverrini*. Parasitol.Int, 61(1): 38-45.
- Soulsby, E. J. L. 1982. Helminths, Arthrozoa and Protozoa of domesticated Animals. London: Bailliere Tindall, 7th edition: 1-809.
- Suwannatrai, K., Suwannatrai, A., Tabsripair, P., Welbat, J. U., Tangkawattana, S., Cantacessi, C., Mulvenna, J., Tesana, S., Loukas, A., & Sotillo, J. 2016. Differential Protein Expression in the Hemolymph of *Bithynia siamensis goniomphalos* Infected with *Opisthorchis viverrini*. PLoS Negl.Trop. Dis, 10(11): e0005104.
- Taylor, M., Coop, R., Wall, R., 2007. Parasites of poultry and gamebirds. Veterinary Parasitology, Third ed. Blackwell Publishing, 459-534.

Ngày nhận 14-3-2018

Ngày phản biện 25-5-2018

Ngày đăng 1-3-2019