

# CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN CỦA TRÚNG VÀ ẤU TRÙNG SÁN LÁ GAN NHỎ (*OPISTHORCHIS PARAGEMINUS*) NGOÀI MÔI TRƯỜNG VÀ TRONG VẬT CHỦ TRUNG GIAN

Nguyễn Đức Tân<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Thoại<sup>1</sup>, Trương Hoàng Phương<sup>2</sup>

## TÓM TẮT

Kết quả của nghiên cứu thực nghiệm này cho thấy trong môi trường nước tự nhiên, trứng sán lá gan nhỏ (*Opisthorchis. parageminus* - *O. parageminus*) đã phát triển thành mao ấu (miracidium), mao ấu vẫn nằm trong vỏ trứng. Khi vật chủ trung gian thứ nhất (ốc: *Bithynia siamensis*) ăn phải ấu trùng nằm trong vỏ trứng, miracidium ra khỏi vỏ rồi phát triển qua các giai đoạn, bao gồm: sporocyst (bào ấu), redia (lôi ấu) và cuối cùng là cercaria (vĩ ấu). Sporocyst non chứa nhiều tế bào mầm, có điểm mắt. Sporocyst thành thực có lớp vỏ mỏng, bên trong chứa nhiều redia, chiều dài từ 560-1100  $\mu\text{m}$ , chiều rộng từ 310-420  $\mu\text{m}$ . Redia thành thực có miệng, hầu, ruột, chiều dài từ 850-1300  $\mu\text{m}$ , chiều rộng từ 250-360  $\mu\text{m}$ . Cercaria thoát ra từ redia, sống trong gan của ốc, sau đó di chuyển ra môi trường, bơi lội tự do trong nước. Cercaria chứa nhiều sắc tố màu nâu, có giác miệng, giác bụng, 2 điểm mắt, một cái đuôi, chiều dài cơ thể từ 165-198  $\mu\text{m}$ , chiều rộng từ 86-98  $\mu\text{m}$ . Thời gian mầm bệnh sán lá gan nhỏ phát triển trên ốc mất khoảng 60 ngày. Khi cercaria xâm nhập vào vật chủ trung gian thứ 2 (cá trắng- *Systemus binotatus*), phát triển đến giai đoạn gây nhiễm, sau đó rụng đuôi, tạo thành dạng ấu trùng nang (metacercaria) nằm ở trong cơ vật chủ.

Từ khóa: sán lá gan nhỏ (*O. parageminus*), trứng, ấu trùng, ốc *Bithynia*, cá trắng

## Development of egg and larvae of *Opisthorchis parageminus* in environment and in intermediate host

Nguyen Duc Tan, Nguyen Van Thoai, Truong Hoang Phuong

## SUMMARY

The result of this experimental study showed that in the natural water environment, the eggs of *O. parageminus* developed into miracidia. When miracidia were eaten by the first intermediate host (snail: *Bithynia siamensis*), inside the snail the miracidia hatched and developed further through the stages of sporocysts, rediae and finally cercariae. The young sporocyst contained many germinal cells having eyespots. The mature sporocyst covered by thin membrane, inside contained many redia with the size was 560-1100  $\mu\text{m}$  (in length) x 310-420  $\mu\text{m}$  (in width). The mature redia possessed mouth, pharynx, gut and the size ranged from 850 to 1300 in length and 250 to 360  $\mu\text{m}$  in width. Cercaria escaped from the redia lived in snail liver then moved into water environment. The cercaria contained brownish pigment, having prominent oral sucker, ventral sucker, pair of eye spots, tail with the size ranged from 165 to 198  $\mu\text{m}$  in length and from 86 to 98  $\mu\text{m}$  in width. Cercaria have taken about 60 days to develop inside the snail. Cercaria penetrated under the scales of fish (*Systemus binotatus*), then its tail disappeared and became oval cyst, it is called metacercaria.

Keywords: *Opisthorchis parageminus*, egg, larvae, *Bithynia* snail, fish (*Systemus binotatus*)

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sán lá gan nhỏ *Opisthorchis* spp. thuộc

họ Opisthorchiidae gồm nhiều giống, loài khác nhau, một số loài thường gây bệnh như: *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus*, *O. lobatus*, *O. cheelis*, *O. longissimus*, *O. parageminus*,

<sup>1</sup> Phân viện Thú y miền Trung

<sup>2</sup> Sở Khoa học & Công nghệ Cần Thơ

*Clonorchis sinensis*, *Metorchis orientalis*. Vòng đời của *O. viverrini*, *O. felineus* và *C. sinensis* đã được nghiên cứu [8]: sán trưởng thành ký sinh trong gan hoặc túi mật của chó, mèo hoặc người, thải trứng theo phân ra ngoài môi trường (ao hồ, đầm lầy, sông, suối,...). Trứng sán bị ốc nước ngọt ăn phải (vật chủ trung gian thứ nhất), ấu trùng miracidium thoát ra khỏi trứng, phát triển qua các giai đoạn sporocyst, redia và cercaria thoát ra ngoài bơi tự do trong nước, xâm nhập vào cá nước ngọt (họ cá chép Cyprinidae - vật chủ trung gian thứ 2). Ấu trùng tiếp tục phát triển trên cá nước ngọt và tạo thành dạng nang kén (metacercaria) nằm trong cơ của vật chủ. Nếu người hoặc động vật (chó, mèo,...) ăn phải cá chứa nang kén này sẽ bị bệnh [8] [9] [10].

Bệnh sán lá gan nhỏ trên vịt do loài *O. parageminus* gây ra. Loài này được phát hiện trên vịt ở các tỉnh phía Bắc vào năm 1968 [4][7], những năm sau đó có một số công trình nghiên cứu về khu hệ giun sán trên vịt, nhưng các tác giả vẫn chưa phát hiện loài này ký sinh trên vịt [1][2][3][5]. Từ năm 2009 đến nay, bệnh này khá phổ biến trên vịt ở tỉnh Bình Định, với tỷ lệ nhiễm từ 5,83-32,5% [6]. Mặc dù sán lá gan trên vịt đã phát hiện từ lâu nhưng cho đến nay vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu về chu kỳ sinh học của chúng. Vì vậy, nghiên cứu các giai đoạn phát triển của trứng và ấu trùng sán lá gan nhỏ ở ngoài môi trường và trong vật chủ trung gian là cần thiết, nhằm xác định được mối quan hệ giữa ký sinh trùng và vật chủ trong điều kiện sinh thái ở khu vực Nam Trung Bộ.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên vật liệu

Mẫu bệnh phẩm : gan và túi mật của vịt nhiễm sán lá gan nhỏ (*O. parageminus*).

Ốc *Bithynia siamensis* và cá trắng (*Systemus binotatus*) được thu thập trong tự nhiên tại một số tỉnh Nam Trung Bộ, nuôi trong môi trường thí nghiệm để chúng đẻ ra thế hệ sau, đảm bảo

đủ tiêu chuẩn động vật thí nghiệm.

Một số dụng cụ, hóa chất, trang thiết bị cần thiết để nghiên cứu ký sinh trùng học.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thu thập trứng sán lá gan nhỏ trong túi mật của vịt nhiễm sán hoặc bằng cách nuôi sán trong nước sinh lý, sán tiếp tục sống thêm 2-3 ngày và không ngừng thải trứng. Sau đó cho trứng vào môi trường nước tự nhiên, để ở nhiệt độ 25-33°C (nhiệt độ môi trường) và theo dõi quá trình phát triển của trứng dưới kính hiển vi (10x hoặc 40x).

- Gây nhiễm ốc *Bithynia siamensis* khi trứng đã hình thành ấu trùng, mỗi bể 100 ốc gây nhiễm khoảng 1000-1200 trứng. Khi ấu trùng thoát ra khỏi ốc, bơi tự do trong nước thì gây nhiễm cá trắng. Cho cá vào cốc thủy tinh có chứa 250-300 ml nước cất, gây nhiễm khoảng 40-50 ấu trùng/cá. Sau khi gây nhiễm, định kỳ mổ khám để xác định các giai đoạn phát triển của mầm bệnh.

- Xử lý số liệu kết quả nghiên cứu bằng phần mềm Excel 2007.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

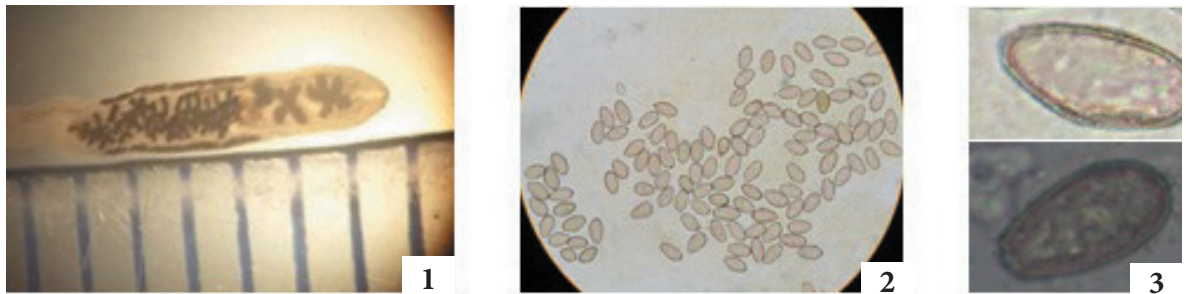
### 3.1. Quá trình phát triển của trứng sán lá gan nhỏ ở ngoài môi trường

Trứng sán lá gan nhỏ thu thập từ vịt nhiễm bệnh trong tự nhiên, cho vào môi trường nước tự nhiên và theo dõi quá trình phát triển của mầm bệnh. Kết quả được thể hiện ở bảng 1, hình 1.

Qua bảng 1 và hình 1 cho thấy, trứng mới phân lập có hình bầu dục, 2 lớp vỏ, đầu nhỏ có nắp, tế bào phôi phủ kín trứng, chiều dài 25-32 µm (trung bình 28 µm), chiều rộng 12-15 µm (trung bình 13,5 µm). Theo thời gian, 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 12 đến ngày 20, tế bào phôi hình thành miracidium, nằm trong vỏ trứng, với tỷ lệ từ 79,20-92,58%.

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

Lần thí nghiệm	Số trứng kiểm tra	Số trứng có ấu trùng (%)	Thời gian có ấu trùng (ngày)
1	250	198 (79,20)	16-18
2	350	303 (86,57)	15-19
3	445	412 (92,58)	17-20
4	355	323 (90,98)	16-20
5	235	212 (90,21)	17-19
6	450	403 (89,55)	15-18
7	354	323 (91,24)	15-19
8	342	301 (88,01)	16-20
9	291	267 (91,75)	17-20
10	387	356 (91,99)	15-20
<b>Tổng cộng</b>	<b>3459</b>	<b>3098 (89,56)</b>	



**Hình 1. Một số hình ảnh trứng sán lá gan nhỏ (*O. parageminus*)**

1: Sán trưởng thành, tử cung chứa đầy trứng. 2: Trứng sán lá gan nhỏ ở túi mật của vịt; 3: Trứng chứa ấu trùng miracidium

Để xác định các giai đoạn phát triển của mầm bệnh ở vật chủ trung gian, chúng tôi cho trứng chứa miracidium vào môi trường nuôi ốc *Bithynia siamensis*. Kết quả gây nhiễm thể hiện ở bảng 2 và hình 2.

Qua bảng 2 cho thấy ốc *Bithynia siamensis* là vật chủ trung gian thích hợp cho mầm bệnh sán lá gan nhỏ trên vịt tồn tại và phát triển. Trong ốc này, ấu trùng sán lá gan nhỏ phát triển qua các giai đoạn: miracidium, sporocyst, redia và cercaria.

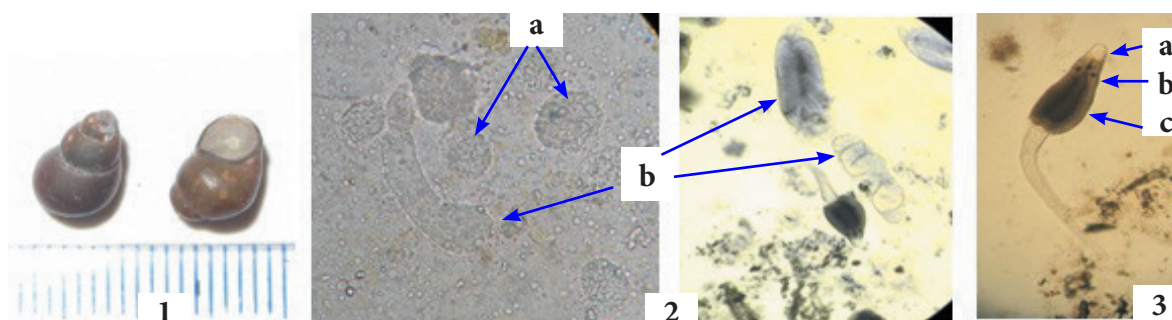
Miracidium: trứng sán lá gan nhỏ không nở ra miracidium trong môi trường nước, khi ốc *Bithynia siamensis* ăn trứng, miracidium

thoát ra sống trong ruột, ấu trùng này có hình bầu dục, phần đầu có điểm mắt, các cơ quan khác nhìn không rõ, bên ngoài có lông bao phủ. Miracidium xuyên qua thành ruột vào xoang bạch huyết quanh ruột, tới gan và hình thành dạng sporocyst sau 4 giờ ốc nhiễm mầm bệnh.

*Sporocyst*: dạng hình túi hoặc hình bầu dục, sporocyst non chứa nhiều tế bào mầm và sporocyst thành thực chứa nhiều redia. Sporocyst thành thực có lớp vỏ mỏng, chiều dài từ 560-1100  $\mu\text{m}$  (trung bình 995  $\mu\text{m}$ ), chiều rộng từ 310-420  $\mu\text{m}$  (trung bình 390  $\mu\text{m}$ ). Sporocyst phát triển thành redia sau 20 ngày ốc nhiễm mầm bệnh.

**Bảng 2. Các giai đoạn ấu trùng sán lá gan nhỏ trên ốc *Bithynia siamensis***

Thời gian sau gây nhiễm	Số ốc nhiễm /số ốc mổ khám (%)	Dạng ấu trùng	Kích thước ( $\mu\text{m}$ , n=130)		
			Dài	Rộng	Trung bình (dài x rộng)
< 4 giờ	57/132 (43,18)	Miracidium	28-35	15-17	31,5 x 16,3
4 giờ	89/187 (47,59)	Sporocyst	34-39	18-23	36,2 x 19,5
19 ngày	143/176 (81,25)	Sporocyst	560-1100	310-420	995 x 390
20 ngày	122/144 (84,72)	Sporocyst			
60 ngày	120/138 (86,96)	Redia	180-350	80-170	295 x 115
		Redia	850-1300	250-360	1150 x 286
		Cercaria	165-198	86-98	185 x 95

**Hình 2. Các giai đoạn ấu trùng sán lá gan nhỏ trên ốc *Bithynia siamensis***

1: Ốc *Bithynia siamensis* (mỗi vạch 1 mm); 2: a là sporocyst, b là redia; 3: Cercaria (a: giác miệng; b: điểm mắt; c: giác bụng)

**Redia:** dạng hình suốt chỉ, có miệng, hầu và ruột, chiều dài từ 850-1300  $\mu\text{m}$  (trung bình 1150  $\mu\text{m}$ ), chiều rộng từ 250-360  $\mu\text{m}$  (trung bình 286  $\mu\text{m}$ ). Các redia non chứa nhiều tế bào mầm và các redia thành thục chứa nhiều cercaria (khoảng 8-15 cercaria). Bằng lối sinh sản vô tính, sau một thời gian các redia sẽ sinh ra nhiều thể hệ redia và cercaria khác nhau.

**Cercaria:** Cercaria thoát ra từ redia thành thục, sống ở gan và ra ngoài môi trường sau 60 ngày ốc nhiễm mầm bệnh. 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, hai điểm mắt ở giữa giác miệng và hầu. Chiều dài từ 165-198  $\mu\text{m}$  (trung bình 185  $\mu\text{m}$ ), chiều rộng từ 86-98  $\mu\text{m}$  (trung

trung bình 85  $\mu\text{m}$ ); Phần đuôi mảnh, dài gấp 2-3 lần phần thân, đuôi là cơ quan giúp cho ấu trùng bơi lội tự do trong nước.

### 3.2. Quá trình phát triển của ấu trùng sán lá gan nhỏ ở cá trắng

Ấu trùng dạng cercaria thoát ra khỏi ốc, bơi lội tự do trong nước khoảng 24 đến 48 giờ, nhưng khi không hoạt động (chết), chúng chìm xuống đáy và dần dần bị phân hủy. Điều này cho thấy sau khi mầm bệnh phát triển trên ốc, ấu trùng cần tiếp tục phát triển trên một vật chủ trung gian nữa để đến giai đoạn gây nhiễm hoặc dạng nang kén (metacercaria) để tồn tại. Từ những vấn đề đó, chúng tôi tiếp tục gây nhiễm ấu trùng cho cá trắng. Kết quả được thể hiện ở bảng 3 và hình 3.

**Bảng 3. Kết quả gây nhiễm ấu trùng sán lá gan nhỏ cho cá trắng**

Thời gian sau gây nhiễm (ngày)	Số cá nhiễm/ số cá mổ khám (%)	Dạng ấu trùng	Cường độ nhiễm (ấu trùng/cá)
1-7	49/60 (81,67)	Cercaria	34-41 (35,50)
8- 14	47/60 (78,33)	Cercaria	32-39 (34,20)
		Metacercaria	
15-20	59/80 (73,75)	Metacercaria	29-37 (33,45)



**Hình 3. Metacercaria sán lá gan nhỏ ở cá trắng (*Systemus binotatus*)**

1: Cá trắng (dài 38-43 mm, rộng 13-16 mm); 2: Nang kén (dài 225-235 μm, rộng 195-220 μm)

Qua bảng 3 cho thấy, ấu trùng xâm nhập vào cá trắng, theo thời gian, cấu tạo các cơ quan trở nên rõ ràng và hoàn thiện hơn. Kết quả mổ khám 60 cá sau gây nhiễm 1-7 ngày, phát hiện 49 con có cercaria, với tỷ lệ nhiễm 81,67%, cường độ nhiễm từ 34-41 ấu trùng/cá.

Từ 8 đến 14 ngày, một số ấu trùng phát triển đến giai đoạn gây nhiễm, chúng cuộn lại và tạo thành dạng metacercaria nằm trong cơ của vật chủ. Mổ khám 60 cá, phát hiện 47 con có cercaria và metacercaria, với tỷ lệ nhiễm 78,33%, cường độ nhiễm từ 32-39 ấu trùng/cá.

Mổ khám 80 cá sau gây nhiễm 15-20 ngày, phát hiện 59 con có nang kén, với tỷ lệ nhiễm 73,75%, cường độ nhiễm từ 29-37 ấu trùng/cá

Tùy thuộc sự vận động của ấu trùng bên trong mà nang kén có hình tròn hoặc hình elíp, chiều dài từ 225-235 μm, chiều rộng từ 195-220 μm. Metacercaria có 2 lớp vỏ mỏng bao bọc ấu trùng, giác bụng bằng giác miệng, chất nền màu

nâu rải đều cơ thể, tuyến bài tiết hình chữ O và chiếm hầu hết phần sau cơ thể.

Với kết quả trên có thể thấy vòng đời của sán lá gan nhỏ trên vịt (loài *O.parageminus*) cần 2 vật chủ trung gian: vật chủ trung gian thứ nhất là ốc *Bithynia siamensis*, vật chủ trung gian thứ 2 là cá trắng.

Ở Nam Trung Bộ, ốc *Bithynia siamensis* tồn tại quanh năm, thường sống trên hoặc trong bùn, trên đá cũng như trên thảm thực vật trong môi trường nước ngọt như: sông suối, đồng ruộng, ao hồ và đầm lầy,... Chúng là mắt xích trong chu kỳ sinh học, là bộ máy khuếch đại mầm bệnh sán lá gan nhỏ trên vịt.

Cá trắng thuộc họ cá chép (*Cyprinidae*), có tên khoa học *Systemus binotatus*, cá này khá phổ biến ở tỉnh Bình Định, chiều dài 38-43 mm, chiều rộng 13-16 mm. Cá trắng là nơi để mầm bệnh sán lá gan nhỏ trên vịt hoàn thành quá trình phát triển, là vector truyền bệnh trên vịt.

#### IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu các giai đoạn phát triển của mầm bệnh sán lá gan nhỏ (*O. parageminus*) ở ngoài môi trường và trong vật chủ trung gian cho thấy, trong môi trường nước tự nhiên, trứng phát triển thành ấu trùng (miracidium) sau 15 đến 20 ngày. Mầm bệnh phải qua 2 vật chủ trung gian:

Vật chủ trung gian thứ nhất (ốc *Bithynia siamensis*) ăn trứng, miracidium tiếp tục phát triển qua các giai đoạn: sporocyst, redia và cuối cùng là cercaria. Thời gian mầm bệnh phát triển trên ốc mất khoảng 60 ngày.

Cercaria xâm nhập vào vật chủ trung gian thứ 2 (cá trắng- *Systomus binotatus*), sau 8-20 ngày ấu trùng phát triển đến giai đoạn gây nhiễm và tạo thành dạng nang kén nằm ở trong cơ vật chủ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đình Bảo, Đoàn Văn Phúc, Trần Đình Từ (2003), Các loài sán lá ký sinh ở vịt tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* (10), tr 1249-1250.
2. Nguyễn Xuân Dương (2008), Nghiên cứu tình trạng nhiễm giun sán của vịt ở Thái Bình, Nam Định, Hải Dương và đề xuất biện pháp phòng trị. Luận án tiến sĩ Nông nghiệp - Viện Thú y.
3. Nguyễn Hữu Hưng (2007), Giun sán ký sinh trên vịt tại đồng bằng sông Cửu Long và thí nghiệm thuốc phòng trị một số loài giun sán chủ yếu. Luận án tiến sĩ Nông nghiệp - Trường ĐH Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
4. Nguyễn Thị Lê (2000), Động vật chí Việt Nam (Tập 8, Sán lá ký sinh ở người và động vật). Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hà Nội, tr 236-246.
5. Huỳnh Tấn Phúc (2001), Tình hình nhiễm giun sán của đàn vịt huyện Bình Chánh- TP. Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, (1), tr.41-45.
6. Nguyễn Đức Tân, Nguyễn Văn Thoại, Nguyễn Thị Sâm, Trương Hoàng Phương (2016), Một số đặc điểm bệnh lý lâm sàng và kết quả chẩn đoán bệnh sán lá gan nhỏ trên vịt. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 1, tr 95-99.
7. Oschmarin P.G (1970), Sán lá ở chim nuôi và chim hoang Việt Nam dân chủ cộng hòa (trong sách Oschmarin P.G., Mamaev Lu.L, Lebedev B.I “Giun sán ở Động vật Đông Nam Châu Á”. Nhà xuất bản khoa học Matxcova. C.5, 126 (tiếng Nga).
8. Kaewkes S (2003), Taxonomy and biology of liver flukes. *Acta Tropica* 88: 3, 177-186.
9. Young N. D., Campbell B. E., Hall R. S., Jex A. R., Cantacessi C., Laha T., Sohn W. M., Sripa B., Loukas A., Brindley P. J. & Gasser R. B. 2010. Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4: 6, e719.
10. Rim H. J (2005), Clonorchiasis: an update. *Journal Helminthology* 79: 3, 269-281.

Nhận ngày 25-10-2016

Phản biện ngày 20-2-2017