

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI

KIM VĂN VẠN

NGHIÊN CỨU DỊCH TỄ HỌC MỘT SỐ LOÀI ẤU TRÙNG
SÁN LÁ TRUYỀN LÂY QUA CÁ CHÉP (*Cyprinus carpio*)
VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG, TRỊ

CHUYÊN NGÀNH: KỸ SINH TRÙNG VÀ VI SINH VẬT HỌC THÚ Y
MÃ SỐ: 62 64 01 04

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS. TS. NGUYỄN VĂN THỌ

PGS. TS. NGUYỄN THỊ LAN

HÀ NỘI, 2013

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng những số liệu trong báo cáo này là hoàn toàn trung thực và chính xác, là kết quả của quá trình thực hiện Luận án Tiến sĩ, không sao chép của bất kỳ tác giả nào khác.

Tôi xin cam đoan mọi tài liệu tham khảo đã trích dẫn đều được nêu tên trong phần tài liệu tham khảo.

Hà Nội, ngày 2 tháng 12 năm 2013

Nghiên cứu sinh

Kim Văn Vạn

LỜI CẢM ƠN

Để đạt đ- ợc kết quả nh- ngày hôm nay Nghiên cứu sinh nhận đ- ợc rất nhiều sự giúp đỡ quý báu, tận tình từ tập thể thầy, cô h- óng dẫn. Nhân đây xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến PGS. TS. Nguyễn Văn Thọ, PGS. TS. Nguyễn Thị Lan (Khoa Thú Y, Tr- ờng ĐHNN Hà Nội), GS.TS. Kurt Buchmann, GS.TS. Anders Dalgaard (ĐH Copenhagen, Đan Mạch) và PGS.TS. Lê Thanh Hoà (Viện CNSH);

Không thể có kết quả này nếu không có sự giúp đỡ, tạo điều kiện từ các cán bộ trong các Bộ môn: Nuôi trồng Thủy sản; Môi tr- ờng và Bệnh Thủy sản; Ký sinh trùng Thú Y (ĐHNN Hà Nội) và anh chị em Phòng Miễn Dịch (Viện CNSH). Nhân đây xin cảm ơn sự giúp đỡ chân thành từ các thầy, cô, anh chị em đồng nghiệp;

Mọi nghiên cứu dù thành công hay ch- a thành công không thể không nhắc đến kinh phí, trong nghiên cứu này ngoài sự nỗ lực từ gia đình Nghiên cứu sinh còn nhận đ- ợc sự giúp đỡ kinh phí từ Dự án Ký sinh trùng truyền lây FIBOZOPA (Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1), Trung tâm Phát triển liên ngành Việt-Bỉ (Tr- ờng ĐHNN Hà Nội). Nhân đây NCS xin gửi lời cảm ơn đến các nhà tài trợ;

Trong quá trình thực hiện Luận án Nghiên cứu sinh còn nhận đ- ợc nhiều sự giúp đỡ từ các đối tác cùng thực hiện Dự án FIBOZOPA nh- Trung tâm Quan trắc, cảnh báo Môi tr- ờng và Dịch bệnh (Viện NCNTTTS1), Bộ môn Ký sinh trùng (Viện Thú Y-Quốc gia), Bộ môn KST (Viện KST, sốt rét TW), Bộ môn KST (Viện Sinh thái Tài nguyên Sinh vật), Bộ môn KST (Tr- ờng Đại học Y Mahidol-Thái Lan). Nhân đây tôi xin gửi lời cảm ơn tới toàn thể các anh chị em trong Dự án đã chia sẻ, cung cấp nguồn mẫu cũng nh- thông tin khoa học.

Cây có cội, n- ớc có nguồn, không thể không nhắc tới sự động viên, sẻ chia tinh thần từ bố, mẹ, anh chị em hai bên gia đình cùng vợ và 2 con thân yêu đã động viên, khích lệ kịp thời để hoàn thành tốt nghiên cứu này.

Hà Nội, ngày 2 tháng 12 năm 2013

Nghiên cứu sinh

Kim Văn Vạn

MỤC LỤC

	Trang
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục	iii
Danh mục các chữ viết tắt	vi
Danh mục các bảng	vii
Danh mục các hình	ix
MỞ ĐẦU	1
Tính cấp thiết của đề tài nghiên cứu	1
Mục tiêu nghiên cứu	3
Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	4
Những đóng góp mới của Luận án	4
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. Tổng quan về vùng nghiên cứu	5
1.2. Khái niệm về dịch tễ học và phương pháp nghiên cứu dịch tễ học	6
1.3. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu	7
1.3.1. Hình thái, phân loại và đặc điểm sinh học cá chép	7
1.3.2. Các giai đoạn phát triển của cá chép	10
1.3.3. Hệ thống ương, nuôi cá chép	10
1.4. Tổng quan về ký sinh trùng ký sinh trên cá chép	12
1.5. Tổng quan về các loài sán lá truyền lây qua cá	14
1.6. Dịch tễ học các loài ấu trùng sán lá truyền lây qua cá	16
1.6.1. Vòng đời của sán lá truyền lây qua cá	16
1.6.2. Đặc điểm hình thái một số ấu trùng sán lá ký sinh trên cá	17
1.6.3. Một số nghiên cứu về ấu trùng sán lá ký sinh trên cá chép	18
1.7. Tổng quan về gen ITS2 ở động vật và ở sán lá	19
1.8. Tổng quan về nghiên cứu ấu trùng <i>C. formosanus</i> ở cá trên thế giới và Việt Nam	21
1.8.1. Đặc điểm sinh học và chu kỳ phát triển	21
1.8.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về <i>C. formosanus</i>	23
1.9. Phòng bệnh tổng hợp do ấu trùng sán lá trên cá nuôi	27

1.9.1. Ngăn chặn sự xâm nhập và kìm hãm sự phát triển ấu trùng sán lá trong hệ thống nuôi	27
1.9.2. Nâng cao sức đề kháng của cá nuôi	32
1.9.3. Quản lý môi trường nuôi thích hợp và ổn định	33
1.10. Ngăn chặn và xử lý ấu trùng sán ký sinh trên cá	40
1.11. Một số hoá chất thường dùng điều trị bệnh ký sinh trùng trong nuôi trồng thủy sản	43
1.11.1. Sulphat đồng - Copper sulphate - $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	43
1.11.2. Formalin - Formol (36 - 38%)	44
Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	46
2.1. Nội dung nghiên cứu	46
2.2. Vật liệu, thời gian và địa điểm nghiên cứu	46
2.2.1. Vật liệu, thời gian và địa điểm nghiên cứu dịch tễ học ấu trùng sán lá	46
2.2.2. Vật liệu, thời gian và địa điểm nghiên cứu giải trình tự gen ITS2 một số loài sán lá ruột nhỏ	47
2.2.3. Vật liệu, thời gian và địa điểm nghiên cứu sự ảnh hưởng của ấu trùng sán lên sinh trưởng của cá chép và thử nghiệm thuốc, hoá chất điều trị bệnh	48
2.3. Phương pháp nghiên cứu	49
2.3.1. Phương pháp thu mẫu	49
2.3.2. Phương pháp ép mô	52
2.3.3. Phương pháp tiêu cơ	52
2.3.4. Nhận dạng ấu trùng sán lá	53
2.3.5. Phương pháp giải trình tự gen ITS2 sán lá ruột nhỏ	53
2.3.6. Phương pháp theo dõi ảnh hưởng của ATSL lên sinh trưởng của cá chép hương và cá chép giống	55
2.3.7. Thử nghiệm điều trị bệnh kênh mang cá chép do ATSL <i>C. formosanus</i>	56
2.3.8. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu	57
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	59
3.1. Kết quả nghiên cứu ấu trùng sán lá ký sinh trên cá chép	59

3.1.1. Kết quả kiểm tra ấu trùng sán lá trên cá chép bột	59
3.1.2. Kết quả kiểm tra ấu trùng sán lá trên cá chép hương	60
3.1.3. Kết quả kiểm tra ấu trùng sán lá trên cá chép giống	68
3.1.4. Kết quả kiểm tra ấu trùng sán lá trên cá chép thương phẩm	83
3.2. Kết quả và thảo luận việc giải trình tự gen ITS2 một số loài sán lá ruột nhỏ	89
3.2.1. Kết quả chạy PCR	90
3.2.2. Kết quả giải trình tự gen ITS2	91
3.2.3. So sánh sự tương đồng nucleotide trong gen ITS2	95
3.2.4. Kết quả phân tích và xây dựng cây phả hệ	97
3.3. Kết quả theo dõi ảnh hưởng của ấu trùng sán lá lên sinh trưởng của cá chép hương và cá chép giống	98
3.4. Biện pháp phòng bệnh do ấu trùng sán lá một cách tổng hợp	101
3.4.1. Chuẩn bị tốt ao, ruộng trước khi ương, nuôi cá chép	101
3.4.2. Khử trùng nước ao trước khi thả giống	101
3.4.3. Chuẩn bị cá giống	102
3.4.4. Chăm sóc và quản lý cá sau khi thả giống	102
3.5. Kết quả thử nghiệm điều trị bệnh kênh mang ở cá chép giống	104
3.5.1. Kết quả dùng CuSO ₄ điều trị bệnh kênh mang cá chép do ATSL C. formosanus	105
3.5.2. Kết quả dùng Formalin điều trị bệnh kênh mang cá chép do ATSL C. formosanus	108
3.5.3. Kết quả dùng Praziquantel điều trị bệnh kênh mang cá chép giống do ấu trùng sán lá C. formosanus gây ra	110
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	113
KẾT LUẬN	113
KIẾN NGHỊ	114
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	115
TÀI LIỆU THAM KHẢO	116

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa đầy đủ
ATSL	Ấu trùng sán lá
CDN	Cường độ nhiễm
C. formosanus	Centrocestus formosanus
cs.	<i>Cộng sự</i>
C. sinensis	Clonorchis sinensis
ĐBSCL	Đồng bằng sông Cửu long
ĐBSH	Đồng bằng sông Hồng
H. pumilio	Haplorchis pumilio
H. taichui	Haplorchis taichui
FIBOZOPA	Fishborne Zoonotic Parasites (Ký sinh trùng truyền lây qua cá)
HTX	Hợp tác xã
KHV	Kính hiển vi
KSH	Khí sinh học
KST	Ký sinh trùng
NTTS	Nuôi trồng Thủy sản
TBX	Trùng bánh xe
TLN	Tỷ lệ nhiễm

DANH MỤC CÁC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
2.1.	Danh sách và nguồn gốc mẫu sán Haplorchis spp. trong nghiên cứu	48
2.2.	Thông tin về việc thu mẫu cá chép giống để phân tích ATSL ký sinh	50
2.3.	Thông tin về việc thu mẫu cá chép giống theo mùa	50
2.4.	Thông tin về việc thu mẫu cá chép thương phẩm	51
2.5.	Bố trí thí nghiệm thử thuốc, hoá chất điều trị bệnh kênh mang cá chép do ATSL <i>C. formosanus</i> gây ra	57
3.1.	Kết quả kiểm tra ấu trùng sán lá trên cá chép bột	60
3.2.	Kết quả kiểm tra ATSL ký sinh trên cá chép hương từ các ao ương	61
3.3.	Tỷ lệ và Cường độ nhiễm ATSL ký sinh trên cá chép hương	62
3.4a.	Thành phần và tỷ lệ nhiễm ATSL ký sinh trên cá chép hương	64
3.4b.	Tần suất xuất hiện loài ATSL ký sinh trên cá chép hương	64
3.5.	Cường độ nhiễm ATSL và cơ quan ký sinh trên cá chép hương	66
3.6.	Kết quả kiểm tra ATSL ở cá chép giống trong các hệ thống nuôi	69
3.7.	Cường độ nhiễm ATSL ở cá chép giống trong các hệ thống nuôi	70
3.8.	Thành phần loài và tỷ lệ nhiễm ATSL ký sinh trên cá chép giống	71
3.9.	Tần suất nhiễm các loài ATSL trên cá chép giống	73
3.10.	Tổng số ATSL từng loài ký sinh trên cá chép giống trong các hệ thống nuôi	73
3.11.	Kết quả kiểm tra ATSL trên cá chép giống theo mùa	75
3.12.	Kết quả kiểm tra cường độ nhiễm ATSL trên cá chép giống theo mùa	77
3.13.	Thành phần loài, số cá chép giống nhiễm và tổng số ATSL trong vụ Xuân-Hè	78
3.14.	Thành phần loài và tỷ lệ ATSL ký sinh trên cá chép giống trong vụ Xuân-Hè	79
3.15.	Cường độ nhiễm ATSL ký sinh trên cá chép giống trong vụ Xuân-Hè	80
3.16.	Thành phần loài, số cá chép giống nhiễm và tổng số ATSL trong vụ Thu-Đông	81

3.17. Thành phần loài và tỷ lệ ATSL ký sinh trên cá chép giống trong vụ Thu-Đông	82
3.18. Cường độ nhiễm từng loại ATSL ký sinh trên cá chép giống trong vụ Thu-Đông	83
3.19. Kết quả kiểm tra tỷ lệ nhiễm ATSL trên cá chép thương phẩm	84
3.20. Cường độ nhiễm ATSL trên cá chép thương phẩm	85
3.21. Thành phần loài và số mẫu cá chép thương phẩm nhiễm ATSL	87
3.22. Sự tương đồng các nucleotides trong vùng gen ITS2 giữa các <i>Haplorchis</i> spp.	96
3.23. Kết quả theo dõi sự ảnh hưởng của ATSL <i>C. formosanus</i> lên tốc độ sinh trưởng của cá chép giống	99
3.24. Tỷ lệ và CDN ATSL <i>C. formosanus</i> ở mang cá chép giống	100
3.25. Kết quả điều trị bệnh kênh mang cho cá chép	106
3.26. Kết quả điều trị bệnh kênh mang cho cá chép	107
3.27. Kết quả điều trị bệnh kênh mang cho cá chép do ATSL <i>C. formosanus</i> bằng phương pháp ngâm Formalin	108
3.28. Kết quả điều trị bệnh kênh mang cho cá Chép do ATSL <i>C. formosanus</i> bằng phương pháp tắm Formalin	109
3.29. Kết quả điều trị bệnh kênh mang cho cá chép do ấu trùng sán lá <i>C. formosanus</i> bằng phương pháp trộn thuốc Praziquantel vào thức ăn	111

DANH MỤC CÁC HÌNH

TT	Tên hình	Trang
1.1.	Cá chép (<i>Cyprinus carpio</i>)	8
1.2.	Vòng đời của sán lá truyền lây qua cá.....	17
1.3.	Ấu trùng sán lá ruột nhỏ <i>Haplorchis pumilio</i>	18
1.4.	Ấu trùng sán lá ruột nhỏ <i>Haplorchis taichui</i>	18
1.5.	Vùng gen ribosom của hệ gen nhân tế bào (18S - 5,8S - 28S) và điểm bám mồi (3SF - BD2R) nhân đoạn gen ITS2.	20
1.6.	Ấu trùng sán lá song chủ <i>Centrocestus formosanus</i>	22
1.7.	Cấu trúc phân tử của Praziquantel ($C_{19}H_{24}N_2O_2$).....	41
3.1.	Thành phần loài ATSL ký sinh trên cá chép hương 21 ngày tuổi.....	65
3.2.	Thành phần loài ATSL ký sinh trên cá chép hương 28 ngày tuổi.....	66
3.3.	Cá chép hương bị kênh nắp mang do nhiễm ATSL <i>C. formosanus</i>	67
3.4.	Cường độ nhiễm ATSL ký sinh trên cá giống	74
3.5.	Tỷ lệ loài ATSL ký sinh trên cá chép giống trong vụ Xuân-Hè	79
3.6.	Tỷ lệ loài ATSL ký sinh trên cá chép giống trong vụ Thu-Đông	82
3.7.	Tỷ lệ nhiễm từng loại ATSL trong cá chép thương phẩm.....	87
3.8.	Cường độ nhiễm ATSL ở cá chép thương phẩm.....	88
3.9.	Sản phẩm PCR vùng gen ITS2 trên thạch agarose 1%.	91
3.10.	Trình tự vùng gen ITS2 của sán lá <i>Haplorchis</i> spp. thu ở Bắc Việt Nam và Thái lan	94
3.11.	Phân tích cây phả hệ của sán lá <i>Haplorchis</i> spp. dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen ITS2	97
3.12.	Cá chép hương bị bệnh kênh mang do ATSL	99
3.13.	Ấu trùng sán lá <i>C. formosanus</i> sống ký sinh trên mang cá chép giống	112
3.14.	Ấu trùng sán lá <i>C. formosanus</i> chết sau khi điều trị bằng thuốc Praziquantel	112