

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

---***---

NGUYỄN THỊ THU HUYỀN

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI,
PHÂN TỬ VÀ SINH HỌC CỦA SÁN LÁ GAN LỚN
FASCIOLA SPP. Ở VIỆT NAM

CHUYÊN NGÀNH: ĐỘNG VẬT HỌC

Mã số: 60420103

LUẬN VĂN THẠC SỸ

Hà Nội, 2014

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

---***---

NGUYỄN THỊ THU HUYỀN

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI,
PHÂN TỬ VÀ SINH HỌC CỦA SÁN LÁ GAN LỚN
FASCIOLA SPP. Ở VIỆT NAM

CHUYÊN NGÀNH: ĐỘNG VẬT HỌC

Mã số: 60420103

LUẬN VĂN THẠC SĨ

Hướng dẫn khoa học: TS. Phạm Ngọc Doanh

Hà Nội, 2014

Lời cảm ơn

Để hoàn thành được công trình nghiên cứu này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ của các cá nhân, tổ chức. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn đối với ban lãnh đạo Viện sốt rét – ký sinh trùng và côn trùng ương, Khoa sinh học phân tử thuộc viện Sốt rét, phòng Ký sinh trùng, phòng Sau đại học cùng với ban lãnh đạo viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật đã tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tôi xin tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. Phạm Ngọc Doanh, người thầy luôn theo sát, tận tình chỉ bảo và trực tiếp hướng dẫn tôi trong quá trình học tập cũng như trong quá trình thực hiện luận văn này!

Tôi xin chân thành cảm ơn các anh chị em thuộc khoa Sinh học phân tử - Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng trung ương và phòng Ký sinh trùng viện Sinh thái và tài nguyên Sinh vật đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài cũng như đóng góp những ý kiến quý báu cho luận văn của tôi.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy/cô trong Hội đồng chấm luận văn đã có những ý kiến đóng góp quý báu để luận văn của tôi được hoàn thiện.

Tôi xin chân thành cảm ơn, người thân, bạn bè đồng nghiệp đã ủng hộ tôi và giúp đỡ, động viên tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn đến 2 bên Cha, Mẹ đã vất vả sinh thành, nuôi dưỡng cũng như tạo điều kiện để tôi có được kết quả như ngày hôm nay. Cũng xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc đến chồng và con tôi! Những người luôn sát cánh bên tôi và luôn là chỗ dựa tinh thần để tôi có thể hoàn thành tốt nhất luận văn này.

Hà Nội, tháng 12 Năm 2014

Nguyễn Thị Thu Huyền

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu này là do chính tôi thực hiện. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn trung thực và chưa từng công bố trong bất kỳ công trình khoa học nào khác. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về tính trung thực và khoa học của các kết quả trong nghiên cứu này.

Hà Nội, tháng 12 năm 2014

Tác giả

Nguyễn Thị Thu Huyền

Mục Lục

Lời cảm ơn	
LỜI CAM ĐOAN	
DANH MỤC HÌNH	
DANH MỤC BẢNG	
CHỮ VIẾT TẮT	
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Khái quát chung về đặc điểm hình thái và vòng đời phát triển của sán lá gan lớn <i>Fasciola</i> spp.	4
1.1.1. Vị trí phân loại và đặc điểm hình thái của sán lá gan lớn	4
1.2. Vòng đời phát triển của sán lá gan lớn.....	5
1.2. Tình hình nghiên cứu về sán lá gan lớn trên thế giới.....	6
1.2.1. Phân loại và phân bố của 2 loài sán lá gan lớn	6
1.2.2. Tình hình nhiễm sán lá gan lớn ở động vật và người	7
1.2.3. Vật chủ trung gian của sán lá gan lớn.....	9
1.3 Tình hình nghiên cứu sán lá gan lớn tại Việt Nam.	11
1.3.1. Mầm bệnh.....	11
1.3.2. Tình hình nhiễm sán lá gan lớn ở trâu bò.....	12
1.3.3. Tình hình nhiễm sán lá gan lớn trên người tại Việt Nam	12
1.3.4. Tình hình nghiên cứu về vật chủ trung gian của sán lá gan lớn	13
CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG, ĐỊA ĐIỂM, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. Đối tượng nghiên cứu: Sán lá gan lớn <i>Fasciola</i> spp. ở Việt Nam.....	15
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	15
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu	15
2.2.2. Thời gian nghiên cứu	15
2.3. Nội dung nghiên cứu.....	15

2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	15
2.4.1. Phương pháp thu sản lá gan lớn trưởng thành từ bò:	15
2.4.2. Phương pháp thu trứng sản từ bò	16
2.4.3. Phương pháp nghiên cứu hình thái sản lá gan lớn.....	16
2.4.4. Phương pháp nghiên cứu phân tử.....	16
2.4.5. Phương pháp nuôi trứng sản lá gan lớn	17
2.4.6. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học của miracidium:	17
2.4.7. Phương pháp gây nhiễm miracidium cho ốc	17
2.4.8. Phương pháp nghiên cứu sự hóa nang và sức sống của metacercaria	18
2.4.9. Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS.	18
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	19
3.1. Đặc điểm phân loại của sản lá gan <i>Fasciola</i> spp. ở Việt Nam	19
3.1. 1. Đặc điểm hình thái sản lá gan <i>Fasciola</i> spp. ở Việt Nam.....	19
3.1.2. Đặc điểm phân tử và quan hệ tiến hóa phân tử của sản lá gan lớn dựa trên trình tự ITS1-5.8S rDNA-ITS2.....	21
3.1.3. Thảo luận.....	26
3.2. Đặc điểm sinh học của sản lá gan <i>F. gigantica</i>	30
3.2.1. Sự phát triển của trứng sản lá gan <i>F. gigantica</i>	30
3.2.2. Đặc điểm sinh học của miracidium.....	34
KẾT LUẬN	51
KIẾN NGHỊ	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO	52

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình thể sán lá gan lớn trưởng thành.....	4
Hình 1.2. Vòng đời phát triển của sán lá gan lớn.	6
Hình 3.1. Hình thái chung của sán lá gan có ruột và tinh hoàn phân nhánh.....	19
Hình 3.2. Các dạng hình thái của sán lá gan lớn thu từ bò	20
Hình 3.3. Trình tự của TN3-Tây Ninh thể hiện một số vị trí có 2 đỉnh.....	24
Hình 3.4. Mối quan hệ tiến hóa phân tử của các loài <i>Fasciola</i> spp.....	25
Hình 3.5. Trứng sán lá gan trong nước cất (a) và dung dịch muối 0,85% (b)	31
Hình 3.6. Sự phát triển của trứng sán lá gan ở nhiệt độ 25-34 ⁰ C	32
Hình 3.7. Miracidium của sán lá gan <i>F. gigantica</i>	32
Hình 3.8. Ba loài ốc <i>Lymnaea</i> ở Việt Nam.....	39
Hình 3.9. Các giai đoạn phát triển của ấu trùng sán lá gan	44
Hình 3.10. Metacercaria sống (a) và chết ở nước muối 1,5% sau 15 phút (b)	48
Hình 3.11. Ảnh hưởng của các nồng độ muối 3 và 5% lên rau bắp cá, rau diếp và rau ngổ sau thời gian ngâm 15 phút	49
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nước muối 2% đến các loại rau sau khi ngâm 15 phút.....	50
Hình 3.13. Một muỗng canh muối 20 gram pha trong 1 lít nước để rửa rau sống	50

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Vật chủ trung gian của <i>F. hepatica</i> ở các nước và vùng địa lý.....	10
Bảng 3.1. Kích thước sán lá gan lớn thu từ các địa điểm nghiên cứu	20
Bảng 3.2. So sánh kích thước của các nhóm sán lá gan có hình dạng cơ thể khác nhau.....	21
Bảng 3.3. Đặc điểm hình thái và phân tử của các mẫu nghiên cứu	22
Bảng 3.4. So sánh trình tự ITS1-5.8S-ITS2 của 2 loài sán lá gan	23
Bảng 3.5. Sự phát triển của trứng sán lá gan ở các điều kiện khác nhau.....	31
Bảng 3.6. Sự phát triển của trứng sán ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau	33
Bảng 3.7. Thời điểm trứng sán nở trong ngày	35
Bảng 3.8. Khả năng sống của miracidium ở điều kiện 26-28 ⁰ C	36
Bảng 3.9. Độ sâu ưa thích của miracidium	38
Bảng 3.10. Kết quả gây nhiễm miracidium sán lá gan cho các loài ốc	40
Bảng 3.11. Thời gian cercaria thoát khỏi ốc và hóa nang.....	45
Bảng 3.12. Sức sống của nang sán trong các nồng độ muối khác nhau	48

CHỮ VIẾT TẮT

ADN	: Axit deoxyribonucleic
BL	: Body length (chiều dài cơ thể)
PBS	: Phosphate-buffered Saline
BW	: Body width (chiều rộng cơ thể)
CO1	: Cytochrome c oxidase subunit 1
CS	: Cộng sự
CT	: Côn trùng
CW	: Cone width (chiều rộng đầu sán)
ITS	: Internal Transcribed Spacer (đoạn giao gen)
KST	: Ký sinh trùng
NaCl	: Natri clorua
NAD1	: Nicotinamide dehydrogenase subunit 1
PCR	: Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi Polymerase)
SR	: Sốt rét
WHO	: World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới)

MỞ ĐẦU

1. Sự cần thiết của đề tài

Bệnh sán lá gan lớn gây nên bởi các loài sán lá *Fasciola* spp., phổ biến là 2 loài *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 và *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855, có ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe gia súc và gây thiệt hại cho ngành chăn nuôi. Hơn thế nữa, sán lá gan còn gây bệnh cho người. Theo tổ chức Y tế thế giới (WHO) bệnh sán lá gan lớn là một trong những vấn đề y tế quan trọng và luôn được quan tâm nghiên cứu. Người và động vật nhiễm bệnh sán lá gan lớn do ăn phải rau, cỏ hoặc uống nước đã có chứa ấu trùng cảm nhiễm metacercaria. Sán trưởng thành ký sinh ở gan vật chủ, gây tổn thương chủ yếu ở gan, nhưng cũng có thể gây tổn thương ngoài gan khi ký sinh lạc chỗ (Dalton 1999).

Trong vòng đời phát triển của sán lá gan lớn, trứng được thải ở gan vật chủ, theo ống dẫn mật xuống ruột và ra môi trường cùng với phân. Gặp điều kiện thuận lợi, trứng phát triển và nở ra thành ấu trùng miracidium. Miracidium bơi trong nước, tìm vật chủ trung gian thích hợp để xâm nhập và phát triển thành các giai đoạn ấu trùng sporocyst, redia và cercaria. Cercaria trưởng thành thoát khỏi ốc, rụng đuôi hoá nang bám vào thực vật thủy sinh hoặc trôi nổi trong nước. Khi vật chủ chính ăn phải thực vật thủy sinh hoặc uống nước có chứa metacercaria của sán lá gan lớn thì chúng phát triển thành con trưởng thành ký sinh ở gan. Vật chủ trung gian thích hợp của sán lá gan lớn là ốc nước ngọt, thường là ốc thuộc họ *Lymnaeidae*. Tuy nhiên, ốc vật chủ trung gian của các loài sán lá gan lớn, thậm chí của cùng một loài ở các vùng địa lý khác nhau có thể là những loài ốc khác nhau (Dalton 1999). Vì vậy, việc xác định chính xác vật chủ trung gian của sán lá gan lớn rất quan trọng trong việc phòng chống bệnh sán lá gan lớn cho gia súc và người.

Ở Việt Nam, số ca bệnh mắc sán lá gan lớn ở người trong những năm gần đây tăng đáng kể, đặc biệt là ở miền Trung và miền Nam (Trần Vinh