

CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN CỦA TRÚNG VÀ ẤU TRÙNG GIUN DẠ DÀY CHÓ *GNATHOSTOMA SPINIGERUM* Ở NƯỚC NGỌT VÀ Ở VẬT CHỦ TRUNG GIAN *MESOCYCLOPS LEUCKARTI*

Nguyễn Văn Thoại¹, Nguyễn Đức Tân¹, Dương Văn Quý Bình¹, Nguyễn Hữu Hưng²

¹ Phân Viện Thú y Miền Trung; ² Đại Học Cần Thơ

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, trong môi trường nước (ở nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$), trứng *G. spinigerum* nở ra ấu trùng L2 từ 7 đến 15 ngày. Ấu trùng L2 tăng cường vận động xâm nhập vào vật chủ trung gian thứ nhất là giáp xác *Mesocyclops leuckarti*. Sau 24 giờ ấu trùng xuyên qua thành dạ dày, đến xoang cơ thể, tại đây ấu trùng giảm chiều dài nhưng tăng chiều rộng cơ thể. Từ ngày thứ 3, ấu trùng tăng chiều dài và chiều rộng cơ thể, giai đoạn này ấu trùng có ruột, thực quản, hành đầu. Ở ngày 7-9, ấu trùng L2 phát triển đến giai đoạn đầu của L3, giai đoạn này ấu trùng có nhiều hàng gai bao phủ cơ thể, có ruột, thực quản, hành đầu, trên hành đầu có miệng và 4 hàng móc, trên miệng có 2 môi đối xứng. *Mesocyclops leuckarti* nhiễm từ 1-5 ấu trùng, kích thước L3 phụ thuộc vào cường độ nhiễm ở *Mesocyclops leuckarti*.

Từ khóa: *Gnathostoma spinigerum*, trứng, ấu trùng, nước ngọt, *Mesocyclops leuckarti*

DEVELOPMENT OF EGGS AND LARVAE OF *GNATHOSTOMA SPINIGERUM* IN FRESH WATER AND IN FIRST INTERMEDIATE HOST (*MESOCYCLOPS LEUCKARTI*)

Nguyen Van Thoai, Nguyen Duc Tan,
Duong Van Quy Binh, Nguyen Huu Hung

SUMMARY

Development of eggs and larvae of *G. spinigerum* in fresh water and in first intermediate host (*Mesocyclops leuckarti*) were examined: After extensive washing, eggs were suspended in fresh water and incubated at $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Mean \pm SE). Development of embryonated eggs were regularly monitored. After hatching, L2 were collected for experimental infection to *Mesocyclops leuckarti*. They immediately appeared exsheathed in the stomach of *M. leuckarti* and then they penetrated across the stomach wall to lodge the body cavity of cyclops by 24h post-infection, where they started to increase in width but further reduce in length slightly. On day 3, the body size increased further and the esophagus, intestine became visible. On day 7-9, the majority of larvae exsheathed to become early third-stage larvae (L3). Minute cuticular striations were seen on the body, two lateral trilobed lips were symmetrically formed. The head bulb had four rows of hooklets. The esophagus and intestine were also well defined. The intensity of infection per *Mesocyclops leuckarti* ranged from 1-5. The body length and width of larvae in relation to the number of larvae per cyclops.

Key words: *Gnathostoma spinigerum*, Larvae, Egg, Fresh water, *Mesocyclops leuckarti*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gnathostoma spinigerum là loài giun tròn ký sinh ở chó, mèo. Ấu trùng *Gnathostoma spinigerum* có khả năng gây bệnh *Gnathostoma* ở người và ở nhiều loại động vật khác, tỷ lệ nhiễm được thông báo chủ yếu ở Châu Á và Nam Mỹ (Bunnag, 1991; Daengsvang, 1981). Vòng đời của *G. spinigerum* đã được thông báo trước đây (Daengsvang, 1972). Ở vật chủ cuối cùng (chó, mèo) giun sống trong khối U của dạ dày, trứng theo phân ra ngoài gặp điều kiện nhiệt độ, ẩm độ thích hợp, ấu trùng L2 sẽ thoát khỏi vỏ trứng và bơi tự do trong nước. Khi ấu trùng L2 xâm nhập vào giáp xác thuộc họ *Cyclopidae*, ấu trùng L2 phát triển đến giai đoạn đầu của L3. Khi vật chủ trung gian thứ 2 (các loài cá nước ngọt, ếch, lươn) ăn phải Cyclops, ấu trùng tiếp tục phát triển đến L3 hoàn thiện. Người hoặc chó, mèo nhiễm bệnh do ăn phải ấu trùng L3. Ở Việt Nam, người nhiễm *G. spinigerum* được phát hiện năm 1963 (Le VH và cộng sự, 1965), trong những năm gần đây có nhiều trường hợp nhiễm mới được phát hiện (Lê Thị Xuân, 2004; Trần Phú Mạnh Siêu, 2011). Như vậy, với vai trò quan trọng của loài ký sinh trùng

này đối với ngành Thú y và Y tế hiện nay, chúng tôi tiến hành nghiên cứu vấn đề này nhằm làm rõ hơn mối quan hệ sinh thái giữa ký sinh trùng và vật chủ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm nhiễm giun *G. spinigerum*, giáp xác *Mesocyclops leuckarti*; Kính hiển vi có gắn Micrometer thị kính và một số dụng cụ, hóa chất để nghiên cứu ký sinh trùng học.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Trứng *G. spinigerum* thu thập trong khối U ở dạ dày chó nhiễm bệnh. Sau khi rửa 3 lần với nước cất, cho trứng vào đĩa petri có chứa nước đã khử Chloride, để ở phòng thí nghiệm, nhiệt độ khoảng $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sự phát triển của phôi bào bên trong trứng được theo dõi hàng ngày. Sau khi ấu trùng thoát ra khỏi vỏ trứng, L2 được thu thập và gây nhiễm cho *Mesocyclops leuckarti*.

- Cyclops được thu thập từ những ao, hồ trong tự nhiên bằng lưới vớt sinh vật phù du (độ dày mắt lưới 250 μm) và được xác định loài *Mesocyclops leuckarti* theo Đặng Ngọc Thanh và cộng sự (1980).

- *Mesocyclops leuckarti* được phân ra 5 nhóm (500 *M. leuckarti*/ nhóm) và nuôi trong nước đã khử Chloride. Mỗi nhóm cho nhiễm ấu trùng L2 *G. spinigerum* lần lượt là 600, 800, 1000, 1200, 1500. Quá trình phát triển của ấu trùng trong *Mesocyclops leuckarti* được theo dõi hàng ngày dưới kính hiển vi có gắn Micrometer thị kính.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Các giai đoạn phát triển trứng *G. spinigerum* thành ấu trùng L2

Bảng 1: Quá trình phát triển trứng *G. spinigerum* thành ấu trùng L2

Yếu tố thí nghiệm	Tỷ lệ trứng nở (%)	Thời gian L2 thoát ra khỏi trứng (ngày)		Thời gian sống của L2 (giờ)		Kích thước L2 (Mean \pm SD)	
		Biến động	Mean	Biến động	Mean	Chiều dài (μm)	Chiều rộng (μm)
Nước cất	87,32	7-14	10	36 – 140	68	410-420 (416 \pm 3,5)	17-22 (18,9 \pm 1,6)
Nước ao tự nhiên	56,38	8-15	12	18 – 52	44		

Chúng tôi thấy trứng *G. spinigerum* mới phân lập, có hình bầu dục, có 2 lớp vỏ, đầu nhỏ có nắp, bên trong có 1 hoặc 2 tế bào phôi, kích thước chiều dài từ 68-81 μm (73,7 μm); chiều rộng từ 38-43 μm (39,8 μm). Trong môi trường nước (nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sau 2-4 ngày phôi bào trong trứng phân ra 2 - 4 tế bào. Ở ngày 5-6, ấu trùng đã hình thành nằm bên trong vỏ trứng, ấu trùng giai đoạn này gọi là L1. Trong vỏ trứng, L1 tiếp tục phát triển đến giai đoạn đầu của L2 và thoát ra ngoài từ nắp của vỏ trứng sau 7-15 ngày.

Cấu tạo ấu trùng L2 là hình trụ tròn chạy từ phần đầu đến phần đuôi, phần đầu nhọn và có khứa. Bên ngoài cơ thể của L2 trơn nhẵn, bên trong không nhìn rõ do bị che khuất bởi các hoạt khúc xạ phủ đầy xoang cơ thể. Chiều dài L2 biến động từ 410-420 μm (trung bình 416 \pm 3,5 μm); chiều rộng biến động từ 17-22 μm (trung bình 18,9 \pm 1,6 μm). Khi cho L2 vào đĩa petri có chứa nước đã khử Chloride, ấu trùng hoạt động mạnh trong nước, thời gian sống ấu trùng từ 36 - 140 giờ; ở bên ngoài môi trường ấu trùng không phát triển gì thêm (bảng và hình 1).

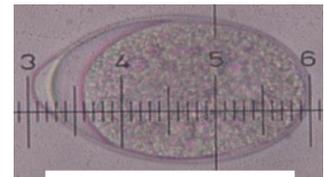
Hầu hết giun tròn (*Nematoda*) các giai đoạn phát triển của ấu trùng là ở bên ngoài môi trường, L1 nở ra từ trứng, sau các lần lột xác thành L2, L3, L4 (Smyth JD, 1962). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên giun tròn *G. spinigerum* thì giai đoạn L1 ở bên trong trứng, giai đoạn L2 ở bên ngoài môi trường và ở trong vật chủ trung gian.

Mặc dù cùng nghiên cứu trên loài *G. spinigerum* nhưng các thông báo có sự khác nhau về thời gian trứng nở ra ấu trùng: kết quả của chúng tôi từ 7-15 ngày, trong khi 8-18 ngày (Chellappa, 1970) và 7-30 ngày (Bhaibulaya, 1985). Kích thước L2 *G. spinigerum* cũng khác nhau giữa các thông báo: kết quả của chúng tôi là 416 x 18,9 μm , trong khi 360 x 18 μm (Penchom, 2011) và 242-267 x 12-13,5 μm (Chellappa, 1970).

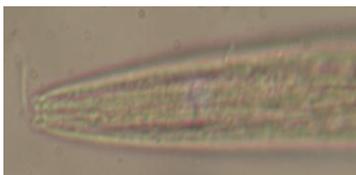
Các loài *Gnathostoma* khác nhau thì thời gian trứng nở ra ấu trùng cũng khác nhau: kết quả của chúng tôi loài *G. spinigerum* từ 7-15 ngày, trong khi loài *G. binucleatum* là 8 ngày (Almeyda, 1995) và loài *G. nipponicum* là 14 ngày (Ando, 1989). Kích thước L2 cũng khác nhau giữa các loài: kết quả của chúng tôi loài *G. spinigerum* là 416 x 18,9 μm , trong khi loài *G. binucleatum* là 231,3 x 11,8 μm (Almeyda, 1995); *G. nipponicum* là 280 x 13 μm và *G. spocyonis* là 276 x 19 μm (Ash, 1962).



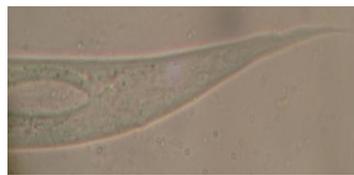
Giun *G. spinigerum* ký sinh trong khối U ở dạ dày chó



Trứng 1-2 ngày



Phần đầu L2



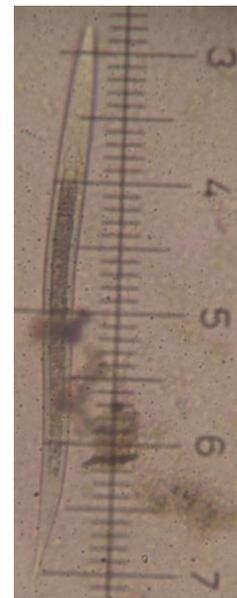
Phần đuôi L2



Trứng 3-4 ngày



T



L2



Hình 1: Các giai đoạn phát triển của *Gnathostoma spinigerum* thành ấu trùng L2

2. Các giai đoạn phát triển của ấu trùng *G. spinigerum* ở *Mesocyclops leuckarti*

Bảng 2: Hình thái ấu trùng *G. spinigerum* ở *Mesocyclops leuckarti*

Thời gian quan sát	Vị trí ký sinh	Hình thái ấu trùng L3 ở <i>Mesocyclops leuckarti</i>							
		Chiều dài (µm)		Chiều rộng (µm)		E	I	H	R
		Biến động	Mean ± SD	Biến động	Mean ± SD				
< 2 giờ	Dạ dày	370-400	390 ± 9,7	17-23	19 ± 1,8	+	+	-	-
>2 – 24 giờ	Xoang cơ thể	360-390	370 ± 9,4	18-24	20 ± 1,8	+	+	-	-
Ngày 2	Xoang cơ thể	270-300	280 ± 10	26-30	28 ± 1,4	+	+	-	-
Ngày 3-4	Xoang cơ thể	330-340	335 ± 4	29-33	32 ± 1,3	+	+	+	-
Ngày 5-6	Xoang cơ thể	350-360	355 ± 4	34-37	36 ± 1	+	+	+	+
Ngày 7-9	Xoang cơ thể	390-430	410 ± 12	44-48	46 ± 1,3	+	+	+	+
Ngày 10-15	Xoang cơ thể	390-430	415 ± 11	47-50	48 ± 1,1	+	+	+	+

Ghi chú: E: thực quản, I: ruột, H: hành đầu, R: hàng móc, + là thời điểm quan sát thấy

Ấu trùng L2 *G. spinigerum* nở ra từ trứng, kích thước trung bình 18,6 x 416 µm, sau khi gây nhiễm L2 cho *Mesocyclops leuckarti*. Kết quả theo dõi các giai đoạn phát triển ấu trùng sau gây nhiễm ở bảng 2 và hình 2 như sau:

Sau 2 giờ, tìm thấy L2 ở dạ dày của *Mesocyclops leuckarti*, thời điểm này L2 thay đổi kích thước cơ thể (giảm chiều dài), chiều dài biến động từ 370-400 µm (trung bình 390 ± 9,7), chiều rộng biến động từ 17-23 µm (trung bình 19 ± 1,8).

Sau 24 giờ, L2 xuyên qua thành dạ dày, đến sống tại xoang cơ thể của *Mesocyclops leuckarti*, ấu trùng tiếp tục giảm chiều dài nhưng tăng chiều rộng cơ thể, chiều dài biến động từ 360-390 µm (trung bình 370 ± 9,4), chiều rộng biến động từ 18-24 µm (trung bình 20 ± 1,8).

Ở ngày thứ 2, L2 tiếp tục giảm chiều dài và tăng chiều rộng cơ thể, chiều dài biến động từ 270-300 µm (trung bình 280 ± 10), chiều rộng biến động từ 26-30 µm (trung bình 28 ± 1,4).

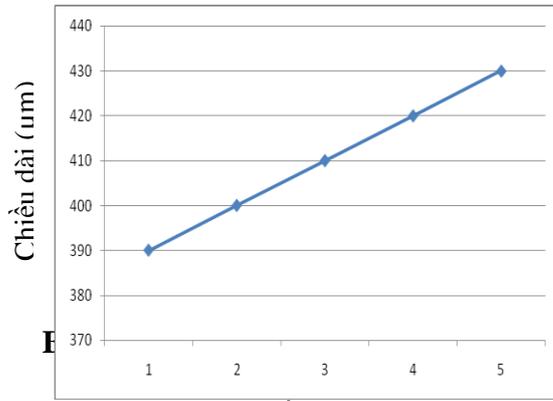
Ở ngày thứ 3 đến 4, L2 bắt đầu tăng chiều dài và chiều rộng cơ thể, chiều dài biến động từ 330-340 µm (trung bình 335 ± 4), chiều rộng biến động từ 29-33 µm (trung bình 32 ± 1,3).

Ở ngày thứ 5 đến 6, chiều dài L2 biến động từ 350-360 µm (trung bình 355 ± 4), chiều rộng biến động từ 34-37 µm (trung bình 36 ± 1), giai đoạn này nhìn thấy L2 có ruột, thực quản, hành đầu.

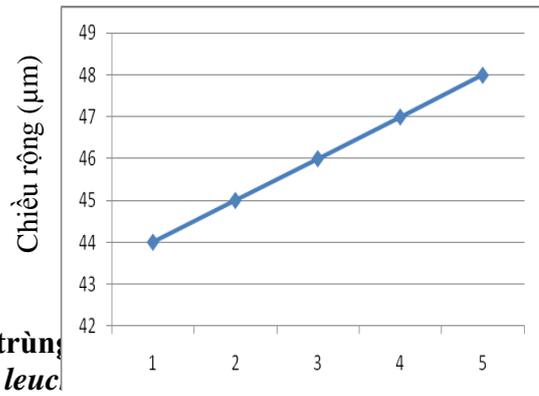
Ở ngày thứ 7, L2 phát triển đến giai đoạn đầu của L3, ấu trùng có nhiều hàng gai bao phủ cơ thể, có ruột, thực quản, hành đầu, trên hành đầu có miệng, trên miệng có 2 môi đối xứng, có 4 hàng móc trên hành đầu, số móc từ hàng 1 đến 4 lần lượt là 42, 44, 46 và 51. Kích thước L3 ở ngày thứ 7 đến 9, chiều dài biến động từ 390-430 µm (trung bình 410 ± 12), chiều rộng biến động từ 44-48 µm (trung bình 46 ± 1,3).

Ở ngày thứ 10-15, chiều dài L3 biến động từ 390-430 µm (trung bình 415 ± 11), chiều rộng biến động từ 47-50 µm (trung bình 48 ± 1,1).

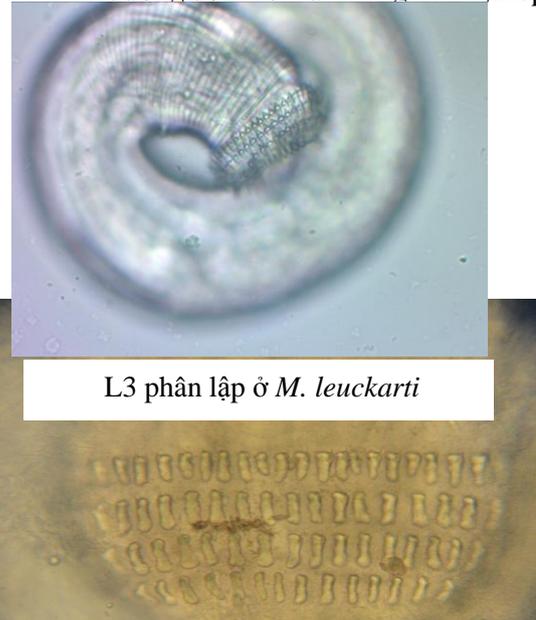
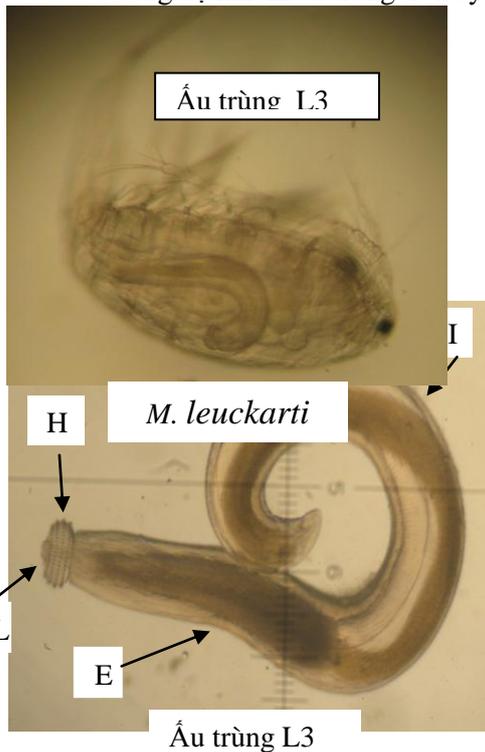
Chúng tôi thấy ấu trùng L3 *G. spinigerum* có thể sống ở *Mesocyclops leuckarti* trong khoảng 35 ngày, giai đoạn từ ngày thứ 15 trở về sau, không thấy ấu trùng phát triển gì thêm. *Mesocyclops leuckarti* nhiễm từ 1-5 ấu trùng, nếu *Mesocyclops leuckarti* nhiễm ít thì kích thước L3 lớn hoặc ngược lại (biểu đồ 1).



Cường độ nhiễm ấu trùng trên cyclops



Cường độ nhiễm ấu trùng trên cyclops



Ấu trùng L3 *G. spinigerum* ở *Mesocyclops leuckarti*; I: ruột; E: thực quản; L: môi

Giáp xác *Mesocyclops leuckarti* được xác định là vật chủ trung gian thứ nhất của loài giun tròn *G. spinigerum* (Sooksri V, 1967). *Mesocyclops leuckarti* phân bố rộng trên toàn cầu, ở Việt Nam loài này sống ở các thủy vực nước ngọt và nước lợ vùng đồng bằng, trung du và vùng núi (Đặng Ngọc Thanh và ctv, 1980).

Thời gian phát triển từ ấu trùng L2 đến L3 có sự khác nhau giữa các loài *Gnathostoma*. Kết quả của chúng tôi trên loài *G. spinigerum* là 7 ngày, trong khi loài *G. nipponicum* là 6 ngày (Ando K, 1989); *G. binucleatum* và *G. procyonis* là 8 ngày (Almeyda và ctv, 1995; Ash LR, 1962) và 9 ngày là *G. hispidum* (Daengvang, 1980).

Theo Penchom (2011) thì *Mesocyclops aspericornis* nhiễm từ 1-15 ấu trùng, ở ngày thứ 7, kích thước L3 khoảng 50 x 460 μm. Nhưng kết quả của chúng tôi thì *Mesocyclops leuckarti* nhiễm từ 1-5 ấu trùng, ở ngày thứ 7 kích thước L3 là 46 x 410 μm.

Cấu tạo hành đầu ấu trùng L3 có sự khác nhau giữa các loài *Gnathostoma*: loài *G. nipponicum* có 3 hàng móc, trong khi đó 4 hàng móc là loài *G. dolorest*, *G. hispidum* và *G. spinigerum*, nhưng số móc của mỗi hàng là khác nhau (bảng 3). Như vậy, qua so sánh thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi chính là *G. spinigerum*, đây là loài gây bệnh phổ biến trên người và trên động vật ở nhiều nước.

Bảng 3: So sánh số móc trên hành đầu của 4 loài *Gnathostoma*

Loài <i>Gnathostoma</i>	Thứ tự hàng móc trên hành đầu			
	I	II	III	IV
<i>G.nipponicum</i> (Miyazaki, 1952)	29-36 (32)	30-37 (35)	31-41 (37)	Không có
<i>G.dolorest</i> (Miyazaki, 1952)	34-42 (38)	35-43 (40)	34-39 (36)	33-41 (37)
<i>G.hispidium</i> (Koga và ctv, 1985)	32-38 (36)	37-41 (40)	39-44 (42)	42-48 (45)
<i>G. spinigerum</i> (Miyazaki, 1952)	40-47 (43)	37-49 (45)	42-52 (47)	48-58 (52)
Kết quả của chúng tôi	39-44 (42)	42-47 (44)	43-49 (46)	47-54 (51)

IV. KẾT LUẬN

Trứng *G. spinigerum* nở ra ấu trùng L2 sau 7-15 ngày, L2 có kích thước $416 \pm 3,5 \times 18,9 \pm 1,6 \mu\text{m}$. Sau 2 giờ gây nhiễm, L2 ở dạ dày *Mesocyclops leuckarti*, tại đây ấu trùng giảm về chiều dài cơ thể. Sau 24 giờ, ấu trùng xuyên qua thành dạ dày đến xoang cơ thể, ấu trùng tiếp tục giảm chiều dài nhưng tăng chiều rộng cơ thể. Từ ngày thứ 3, ấu trùng tăng chiều dài và chiều rộng cơ thể. Ở ngày thứ 7, ấu trùng L2 phát triển đến giai đoạn đầu của L3, kích thước $410 \pm 12 \times 46 \pm 1,3 \mu\text{m}$. Giai đoạn này ấu trùng có ruột, thực quản, hành đầu, trên hành đầu có miệng, trên miệng có 2 môi đối xứng, có 4 hàng móc trên hành đầu, số móc của hàng thứ 1 đến 4 lần lượt là 42, 44, 46 và 51. *Mesocyclops leuckarti* nhiễm từ 1-5 ấu trùng, cường độ nhiễm liên quan đến kích thước ấu trùng.

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*. Nxb KHKT - Hà Nội, 318-400.
- Ando K, Tanaka H, Chinzei Y (1989): Influence of temperature on development of eggs and larvae of *Gnathostoma nipponicum* Yamaguti. *Jpn J Parasitol*, 38: 31-37.
- Almeyda-Artigas, Mosqueda. M. A – Cabrera, Sanchez. E – Nunez et al (1995): Development *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematode: Gathostomidae) in its first intermediate experimental host. *Research and reviews in parasitology*, 53 (3): 189-194.
- Chellappa. D.J, Anantaraman. M (1970): The development of *Gnathostoma spinigerum* Owen, 1936, in its first intermediate host, *Mesocyclops Leuckarti* claus, 1857, in india with remarks on its zoonotic importance. *Veterinary Dispensary, Pennadam, S.Arcot*. No 9, May.
- Daengsvang S (1972): An experimental study on the life cycle of *Gnathostoma hispidum* Fedchenko 1872 in Thailand with special reference to the incidence and some significant morphological characters of the adult and larval stages. *Southeast Asian JTrop Med Public Health*, 3:376-389.
- Koga M, Ishibashi J, Ishii Y, Hasegawa H, Choi DW, Lo TY (1985): Morphology and Experimental infections of Gathostomse larvae from imported loaches. *Misgurnus anguilicaudatus*. *Jpn J Parasitol* 34: 361-370 (In Japanese).
- Le VH, Nguyen VA, Ta VL (1965): *Gnathostoma* and gnathostomose humaine au Vietnam. *Bull Soc Path Exot*, 58, 236.
- Manoon Bhaibulaya, M.B., Ph.D (1985): Development of egg and Larvae of *Gnathostoma spinigerum* intermediate host. *Sirij Hosp Gaz*. Vol 37, No 2, February.
- Miyazaki I (1952): On the second stage larvae of three species of *Gnathostoma* occurring in Japan (Nematoda: Gnathostomidae). *Acta Med* 22: 1433-1441 (in Japanese).
- Penchom Janwan, Pewpan M Intapan, Oranuch Sanpool, Luxkhana Sadaow, Tongjit Thanchomnang and Wanchai Maleewong (2011): Growth and development of *Gnathostoma spinigerum* (Nematoda: Gnathostomatidae) larvae in *Mesocyclops aspericornis* (Cyclopoida: Cyclopidae), *Parasites & Vectors, BioMed Central*, 4:93.
- Smith JD (1962): Introduction to animal parasitology, XXV Nematoda, General amount, London: *The English University Press Limited*, 283-304.