

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**NGUYỄN THỊ THU HẰNG**

**NGHIÊN CỨU VI BÀO TỬ TRÙNG  
(Microsporidia) NHIỄM TRONG CƠ CÁ TRA  
(*Pangasianodon hypophthalmus*)**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ THỦY SẢN**

**Cần Thơ, 2016**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**NGUYỄN THỊ THU HẰNG**

**NGHIÊN CỨU VI BÀO TỬ TRÙNG  
(Microsporidia) NHIỄM TRONG CƠ CÁ TRA  
(*Pangasianodon hypophthalmus*)**

**Chuyên ngành: Nuôi trồng thủy sản**

**Mã số: 62 62 03 01**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ THỦY SẢN**

**Cán bộ hướng dẫn:**

**PGS. TS. ĐẶNG THỊ HOÀNG OANH**

**Cần Thơ, 2016**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam kết luận án được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu do tôi thực hiện. Tất cả các số liệu và kết quả được trình bày trong luận án hoàn toàn trung thực, chưa từng được tác giả khác công bố trước đây và chưa được dùng cho bất cứ luận án cùng cấp nào khác.

*Cần Thơ, ngày      tháng      năm 2016*

Tác giả

**NGUYỄN THỊ THU HẰNG**

## LỜI CẢM TẠ

Trước hết tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Cần Thơ, Ban Chủ nhiệm Khoa Thủy sản, Bộ môn Bệnh học Thủy sản - Khoa Thủy sản, Phòng Đào tạo, Phòng Quản lý Khoa học và Phòng Tài vụ Trường Đại học Cần Thơ đã tạo mọi điều kiện cho tôi được thực hiện chương trình Nghiên cứu sinh trong những năm qua.

Tôi xin trân trọng và bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Cô hướng dẫn PGs.Ts. Đặng Thị Hoàng Oanh, trong thời gian qua đã tận tình hướng dẫn, động viên, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi học tập, nghiên cứu, chăm bồi kiến thức và hoàn thành luận án. Xin cảm ơn sâu sắc đến PGs.Ts. Phạm Minh Đức đã hướng dẫn chuyên đề nghiên cứu. Đặc biệt, trong quá trình nghiên cứu và thực hiện luận án, tôi đã nhận được những lời khuyên, những kinh nghiệm quý báu và sự giúp đỡ nhiệt tình về mặt chuyên môn từ PGs.Ts. Đặng Thị Hoàng Oanh. Bên cạnh đó còn có sự giúp đỡ của PGs.Ts Nguyễn Văn Công cho phép sử dụng máy chụp hình kính hiển vi điện tử của Khoa Môi Trường.

Xin chân thành cảm ơn tập thể quý Thầy/Cô thuộc Bộ môn Bệnh học Thủy sản - Khoa Thủy sản đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ và động viên tôi hoàn thành luận án này. Hơn nữa, kết quả của luận án cũng nhờ vào sự đóng góp không nhỏ của các em sinh viên Lưu Trường Hưng và Phan Kim Vàng (Bệnh học Thủy sản K34), Nguyễn Trọng Nghĩa (Bệnh học Thủy sản K35), Nguyễn Long An, Trần Đây Đôi và Đỗ Minh Thiện (Bệnh học Thủy sản K37), Đặng Ngọc Thiện Thảo (Bệnh học Thủy sản K38). Đặc biệt chân thành cảm ơn em Nguyễn Bá Quốc (Công ty TNHH Việt Thắng) đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi được phép thu mẫu cá bệnh trong suốt quá trình thực hiện luận án. Cuối cùng, xin được biết ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè và những người thân đã giúp đỡ, động viên để tôi có thêm nghị lực hoàn thành luận án.

**TÁC GIẢ**

# MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH SÁCH BẢNG .....	vi
DANH SÁCH HÌNH .....	vii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT .....	x
<b>Chương 1: GIỚI THIỆU .....</b>	<b>1</b>
1.1 Giới thiệu .....	1
1.2 Mục tiêu của nghiên cứu.....	3
1.2.1 Mục tiêu tổng quát.....	3
1.2.2 Mục tiêu cụ thể .....	3
1.3 Phạm vi nghiên cứu .....	3
1.4 Nội dung nghiên cứu.....	3
1.5 Ý nghĩa của luận án .....	4
1.6 Điểm mới của luận án .....	4
<b>Chương 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>	<b>5</b>
2.1 Tổng quan bệnh ký sinh trùng trên cá tra .....	5
2.2 Tổng quan kết quả nghiên cứu vi bào tử trùng Microsporidia trên cá .....	6
2.2.1 Thế giới.....	6
2.2.2 Việt Nam .....	10
2.3 Đặc điểm sinh học của vi bào tử trùng Microsporidia.....	11
2.3.1 Phân loại .....	11
2.3.2 Hình thái .....	12
2.3.3 Chu kỳ phát triển .....	15
2.3.4 Sự phân bố và các cơ quan cảm nhiễm .....	17
2.3.4.1 Phân bố .....	17
2.3.4.2 Các cơ quan cảm nhiễm với vi bào tử trùng Microsporidia .....	18
2.3.5 Phương thức lan truyền vi bào tử Microsporidia vào mô vật chủ.....	22
2.4 Các phương pháp phát hiện vi bào tử trùng Microsporidia .....	27
2.4.1 Nhuộm mẫu .....	27
2.4.2 Mô học.....	28
2.4.3 PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	29

2.5 Kỹ thuật nuôi cấy vi bào tử trùng Microsporidia .....	32
2.5.1 Những nguyên lý trong kỹ thuật nuôi cấy tế bào .....	32
2.5.2 Môi trường nuôi cấy .....	33
2.5.3 Các phương thức nuôi cấy .....	34
2.5.4 Các nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi vi bào tử trùng .....	35
2.6 Một số nghiên cứu thử nghiệm điều trị vi bào tử trùng Microsporidia .....	37
2.6.1 Ảnh hưởng của hóa chất đến vi bào tử trùng Microsporidia.....	37
2.6.1.1 Nhóm ion dương.....	37
2.6.1.2 Nhóm Halogen .....	39
2.6.1.3 Nhóm hợp chất oxy hóa .....	41
2.6.1.4 Nhóm hợp chất aldehyde.....	43
2.6.1.5 Nhóm hợp chất rượu.....	44
2.6.2 Các nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc kháng ký sinh trùng đến vi bào tử Microsporidia .....	45
2.6.3 Các nghiên cứu ảnh hưởng của thảo dược đến vi bào tử trùng Microsporidia .....	48
<b>Chương 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>52</b>
3.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	51
3.2 Đối tượng nghiên cứu .....	51
3.3 Vật liệu nghiên cứu.....	51
3.3.1 Dụng cụ .....	51
3.3.2 Hóa chất phân tích mẫu .....	51
3.3.3 Thuốc và hóa chất thử nghiệm tác động với vi bào tử trùng.....	52
3.4 Phương pháp nghiên cứu .....	52
3.4.1 Phương pháp thu và bảo quản mẫu cá.....	52
3.4.2 Phương pháp phân tích mẫu .....	52
3.4.2.1 Soi tươi .....	52
3.4.2.2 Phương pháp phết kính và nhuộm tiêu bản.....	53
3.4.2.4 Phương pháp mô bệnh học .....	54
3.4.2.4 Phản ứng PCR .....	54
3.4.2.5 Giải trình tự gen và định danh vi bào tử trùng .....	57
3.4.3 Thí nghiệm nuôi cấy tế bào thận và sợi cơ cá tra.....	57
3.4.3.1 Nuôi tế bào thận cá.....	57
3.4.3.2 Nuôi cấy sợi cơ cá .....	58
3.4.4 Thí nghiệm gây cảm nhiễm vi bào tử trùng với tế bào thận và sợi cơ cá tra .....	58
3.4.4.1 Thu mẫu, xác định mật độ và tỉ lệ sống của vi bào tử trùng .....	58

3.4.4.2	Thí nghiệm gây cảm nhiễm .....	60
3.4.5	Thí nghiệm in vitro vi bào tử trùng với hóa chất và thuốc.....	61
3.4.6	Thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế của thuốc lên vi bào tử trùng Microsporidia gây cảm nhiễm trong tế bào thận và sợi cơ cá tra.....	63
3.4.7	Xử lý số liệu .....	63
<b>Chương 4:</b>	<b>KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>65</b>
4.1	Đặc điểm bệnh học của vi bào tử trùng Microsporidia nhiễm trong cơ cá tra ( <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> ).....	64
4.1.1	Thông tin về ao nuôi và mẫu cá tra .....	64
4.1.2	Dấu hiệu bệnh lý của cá tra nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia.....	65
4.1.2.1	Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài.....	65
4.1.2.2	Dấu hiệu bệnh lý bên trong .....	68
4.1.3	Tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia .....	73
4.1.4	Kết quả phân tích mô bệnh học mẫu cơ cá tra nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia .....	75
4.1.5	Kết quả định danh Microsporidia nhiễm trong cơ cá tra.....	82
4.1.5.1	Xác định đặc điểm hình thái.....	82
4.1.5.2	Kết quả phân tích PCR.....	87
4.1.5.3	Định danh vi bào tử trùng dựa vào kết quả giải trình tự gen .....	89
4.2	Nghiên cứu kỹ thuật nuôi cấy vi bào tử trùng <i>Kabatana</i> sp. ....	93
4.2.1	Mật độ và tỉ lệ sống của vi bào tử trùng trong bào nang gạo cá tra ...	93
4.2.2	Kết quả nuôi tế bào thận và cơ của cá.....	97
4.2.3	Kết quả cảm nhiễm vi bào tử trùng vào tế bào thận và cơ cá tra .....	101
4.3	Xác định ảnh hưởng của một số hóa chất và thuốc kháng ký sinh trùng lên vi bào tử trùng <i>Kabatana</i> sp. ....	107
4.3.1	Tác dụng của hóa chất đối với vi bào tử trùng <i>Kabatana</i> sp.....	107
4.3.2	Tác dụng của thuốc kháng ký sinh trùng đối với <i>Kabatana</i> sp.....	116
4.3.2.1	Ảnh hưởng của thuốc với vi bào tử trùng <i>Kabatana</i> sp. ....	116
4.3.2.2	Xác định khả năng ức chế của thuốc lên vi bào tử trùng <i>Kapatana</i> sp. gây nhiễm trong tế bào thận/cơ cá tra.....	118
4.3.2.3	Thảo luận chung .....	123
<b>Chương 5:</b>	<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT.....</b>	<b>130</b>
5.1	Kết luận.....	128
5.2	Đề xuất.....	131
	<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>132</b>
	<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>146</b>

## DANH SÁCH BẢNG

Bảng 2.1: Đặc điểm hình thái và cấu tạo của một số giống loài Microsporidia .....	13
Bảng 2.2: Một số loại hóa chất và nồng độ thường được sử dụng tiêu diệt vi bào tử trùng .....	37
Bảng 2.3: Nồng độ ức chế 50% của các loại thuốc với <i>E. Cuniculi</i> (nguồn: Franssen <i>et al.</i> , 1995) .....	46
Bảng 2.4: Giá trị MIC của 3 loại thuốc với <i>E. intestinalis</i> và <i>V. corneae</i> (nguồn: Franssen <i>et al.</i> , 1995; Didier, 1997) .....	47
Bảng 3.1 Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại gen của vi bào tử trùng .....	55
Bảng 4.1: Thông tin về số lượng, chiều dài và trọng lượng của các mẫu cá... ..	64
Bảng 4.2: Cường độ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia .....	75
Bảng 4.3: Đặc điểm mô học của cá bị nhiễm vi bào tử trùng theo từng giai đoạn cá .....	76
Bảng 4.4: Đặc điểm của bào tử <i>Kabatana</i> sp.gây bệnh gạo trên cá tra .....	84
Bảng 4.5: Đặc điểm mẫu phân tích PCR .....	87
Bảng 4.6: Kết quả so sánh trình tự gen của vi bào tử trùng gây bệnh trên cá tra với các kiểu gen trong Ngân hàng Gen (GenBank).....	90
Bảng 4.7: Mật độ, tỉ lệ sống bào tử trong bào nang gạo.....	93
Bảng 4.8: Thời gian (phút) gây bất hoạt bào tử tương ứng với các nồng độ của ethanol và formaline .....	107
Bảng 4.9: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt bào tử của 4 loại hóa chất.....	111
Bảng 4.10: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt vi bào tử của Albendazole, fumagillin và TNP-470 .....	116



## DANH SÁCH HÌNH

Hình 2.1: (A) Các bào nang trong xoang nội quan và cơ của cá bóng lizardfish; (B) hình chụp SEM các bào nang của <i>Glugea</i> sp.....	8
Hình 2.2: Hình thái cấu tạo của Microsporidia (nguồn: Franzen, 2005) .....	13
Hình 2.3: Vòng đời phát triển của Microsporidia (nguồn: Franzen, 2005) ....	16
Hình 2.4: Bào tử <i>N. secunda</i> phát triển trong nhân tế bào ruột của loài cá <i>N. Rubripinis</i> (nguồn: Lom và Dykova, 2002) .....	19
Hình 2.5: Loài <i>K. arthuri</i> ký sinh trong cơ của loài cá <i>P. sutchi</i> .....	20
Hình 2.6: Phương thức lây nhiễm của Microsporidia vào tế bào ký chủ .....	25
Hình 2.7: (A) Mẫu bệnh phẩm nhuộm với Weber's trichromic (100x); (B) Mẫu bệnh phẩm nhuộm với Fluorochrome Uvitex 2B (100x) .....	27
Hình 2.8: Kết quả điện di sản phẩm PCR (nguồn: Fedorko et al., 1995) .....	31
Hình 2.9: Cấu trúc của bào tử <i>N. bombycis</i> (A): bào tử <i>N. bombycis</i> sau khi xử lý với chlorine dioxide 15 mg/ml; (B): cấu trúc của các sợi cực và không bào bị phá hủy hoàn toàn (nguồn: Zhengyoung et al., 2010) .....	42
Hình 2.10: Cấu trúc của bào tử <i>Glugea</i> sp. (A) Bào tử <i>Glugea</i> sp. sau khi xử lý với formalin 62 ppm; (B) các sợi cực và không bào bị phá hủy hoàn toàn (nguồn: Iglesias et al., 2002) .....	43
Hình 3.1 : Buồng đếm Neubauer, vùng đếm hồng cầu có màu đỏ .....	59
Hình 4.1: (A) cá tra ở giai đoạn cá hương nhiễm bệnh gạo (khoanh tròn); (B) Bào nang gạo nằm trong thân cá (mũi tên).....	65
Hình 4.2: (A-F) Biểu hiện bệnh lý bên ngoài của cá tra giống nhiễm bào nang gạo (vùng khoanh tròn hoặc mũi tên) .....	66
Hình 4.3: (A-E) Biểu hiện bệnh lý bên ngoài của cá tra thịt nhiễm bệnh gạo; (F) vết loét trên da cá đã được tái tạo (vùng khoanh tròn hoặc mũi tên).....	67
Hình 4.4: (A) cá hương nhiễm gạo; (B-D) cá giống nhiễm gạo; (E-F) cá thịt nhiễm bào nang .....	68
Hình 4.5: Dấu hiệu nhiễm gạo trong cơ cá tra; (A-H) cá thịt nhiễm gạo, bào nang xơ cứng thành mảng (vùng khoanh tròn hoặc mũi tên) .....	69
Hình 4.6: Cá giống bị dị hình nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia; A: dấu hiệu bên ngoài; B: bào nang gạo trong cơ cá (vùng khoanh tròn).....	70
Hình 4.7: (A-F) Kích thước của các bào nang gạo trong cơ cá tra.....	71
Hình 4.8: (A) bào nang gạo nâu trong cơ; (B) bào nang gạo đen trong cơ .....	72
Hình 4.9: (A) bào nang gạo nâu trong cơ; (B) tiêu bản gạo nâu - 40x;.....	72
Hình 4.10: (A) bào nang gạo đen trong cơ; (B) tiêu bản gạo đen - 40x.....	73
Hình 4.11: Tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia ở cá giống và cá thịt của tổng số mẫu phân tích ở 3 tỉnh.....	74

Hình 4.12: Tiêu bản cắt mô cơ cá tra nhiễm bào nang gạo (20x).....	77
Hình 4.13: Tiêu bản cắt mô cơ cá tra nhiễm bào nang gạo (20x).....	79
Hình 4.14: (A) mẫu soi tươi - 40x; (B) mẫu nhuộm Giemsa - 100x .....	83
Hình 4.15: Cấu trúc của bào tử <i>Kabatana</i> sp. (A) mẫu tươi - 200x và (B) mẫu chụp trên kính hiển vi điện tử SEM.....	84
Hình 4.16: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện Microsporidia .....	88
Hình 4.17: Bào tử <i>Kapatana</i> sp. trên buồng đém hồng cầu (mũi tên) (A-10x; B-40x) .....	94
Hình 4.18: (A) Bào tử bắt màu thuốc nhuộm SG - bào tử sống; (B) Bào tử bắt màu thuốc nhuộm PI - bào tử chết; (C) Bào tử bắt màu thuốc nhuộm SG và PI .....	96
Hình 4.19: Tế bào thận cá tra (mũi tên); (A) Mẫu tươi và (B) mẫu nhuộm với Trypan blue (40x) .....	97
Hình 4.20: Mật độ của tế bào thận cá sống sót ở các thời điểm nuôi cấy .....	98
Hình 4.21: Sợi cơ trong các giếng nuôi (mũi tên) (A); sợi cơ được nhuộm với trypan blue (B) .....	99
Hình 4.22: Tỷ lệ sợi cơ bám dính ở các thời điểm nuôi cấy.....	100
Hình 4.23: Tỷ lệ nhiễm bào tử <i>Kabatana</i> sp. trên tế bào thận .....	101
Hình 4.24: Giếng nuôi tế bào thận (A) trước và (B) sau cảm nhiễm 12 giờ .	102
Hình 4.25: Tế bào thận: (A) trước gây cảm nhiễm và (B) sau khi gây cảm nhiễm với bào tử <i>Kabatana</i> sp. (mũi tên) (40x) .....	103
Hình 4.26: Tỷ lệ nhiễm bào tử <i>Kabatana</i> sp. của sợi cơ .....	103
Hình 4.27: Giếng nuôi sợi cơ (A) trước và (B) sau cảm nhiễm 12 giờ .....	104
Hình 4.28: (A) bào tử sau 1 giờ cảm nhiễm vào sợi cơ (B) bào tử bám vào đầu sợi cơ sau 2 giờ cảm nhiễm (mũi tên).....	104
Hình 4.29: Cấu trúc bên ngoài của bào tử <i>Kabatana</i> sp. sau khi thí nghiệm với (A) C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH 50% ở 7,26 phút và (B) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,6% ở 2,55 phút (mũi tên) (200X) .....	114
Hình 4.30: Bào tử <i>Kabatana</i> sp. trước (A) và sau thí nghiệm (B) với fumagilin 2 µg/ml ở thời điểm 5 phút (Mẫu quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét, SEM) .....	117
Hình 4.31: Sự ức chế của albendazole lên bào tử <i>Kabatana</i> sp. nhiễm trên tế bào thận và cơ cá tra sau 6 giờ cảm nhiễm .....	118
Hình 4.32: Sự ức chế của fumagillin lên bào tử <i>Kabatana</i> sp. nhiễm trên tế bào thận và cơ cá tra .....	119
Hình 4.33: Giếng nuôi tế bào thận thử nghiệm tác động của thuốc albendazole và fumagillin .....	120

- Hình 4.34: Tế bào thận (A) NT3 - tế bào thận bị mất cấu trúc - 40X; (B) NT1 - tế bào thận phát triển bình thường - 100X..... 121
- Hình 4.35: Giếng nuôi sợi cơ thử nghiệm tác động của thuốc albendazole và fumagillin..... 122
- Hình 4.36: Sợi cơ cá tra (A) bào tử xâm nhiễm phá hủy cấu trúc sợi cơ; (B) bào tử dính lại với nhau thành cụm; (C, D) bào tử phá hủy vách sợi cơ..... 123

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

CĐN	:	Cường độ nhiễu
ĐBSCL	:	Đồng Bằng Sông Cửu Long
ĐC	:	Đối chứng
ĐLC	:	Độ lệch chuẩn
KST	:	Ký sinh trùng
NT	:	Nghiệm thức
s	:	Giây
SEM	:	Kính hiển vi điện tử quét
TEM	:	Kính hiển vi điện tử truyền qua
TLN	:	Tỷ lệ nhiễu

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát bệnh gao trên cá tra và biện pháp phòng ngừa. Nghiên cứu được thực hiện với 24 ao nuôi cá tra từ tháng 04 năm 2013 đến tháng 12 năm 2015 ở tỉnh An Giang, Cần Thơ, Vĩnh Long. Kết quả thu mẫu cho thấy cá tra nhiễm bào nang gao có vùng cơ bị mất cấu trúc và hoại tử, tế bào mô bị vi bào tử trùng *Microsporidia* ly giải hoàn toàn, có sự xuất hiện bào nang tiên khởi trong bó cơ. Vi bào tử trùng có cấu tạo bên ngoài hình quả lê hoặc hình trứng, kích thước rất nhỏ. Bên trong có sợi cực dạng xoắn rất khó phân biệt khi quan sát. Bên dưới sợi cực có không bào với kích thước bằng 1/3 chiều dài bào tử. Kết quả định danh bằng quan sát hình thái kết hợp giải trình tự gen xác định vi bào tử trùng là *Kabatana* sp.

Kết quả nuôi cấy tế bào thận và sợi cơ trong môi trường L-15 khá tốt, sau 48 giờ nuôi cấy, tế bào thận gia tăng 16,44%. Kết quả cảm nhiễm vi bào tử trùng vào tế bào thận và cơ cho thấy sau 2 giờ cảm nhiễm, các tế bào bị vi bào tử trùng xâm nhập, lần lượt là  $11,68 \pm 2,60\%$  tổng số tế bào thận và  $7,49 \pm 3,02\%$  tổng số sợi cơ. Thời điểm 12 giờ sau cảm nhiễm, 100% các tế bào thận và sợi cơ bị vi bào tử trùng xâm nhiễm. Các hóa chất gồm ethanol, formalin nồng độ từ 40-70%; chlorine dioxide, hydrogen peroxide, chlorine, iodine nồng độ từ 0,1-0,7% có tác động ảnh hưởng đến vi bào tử trùng. Thời gian tác động đến vi bào tử trùng dao động từ 1,05-39,50 phút phụ thuộc vào nồng độ hóa chất. Ba loại thuốc albendazole, fumagillin và TNP-470 cũng có khả năng tác động lên bào tử của vi bào tử trùng. Thời gian albendazole tác động từ 3,20-11,75 giờ, fumagillin từ 4,03-13,67 giờ và TNP-470 từ 5,37-13,75 giờ. Kết quả xác định khả năng ức chế của thuốc lên vi bào tử trùng nhiễm trong tế bào thận/cơ cá tra cho thấy albendazole và fumagillin nồng độ 5  $\mu\text{g/ml}$  có thể được áp dụng trong điều trị bệnh do vi bào tử trùng *Kabatana* sp. ký sinh trong cơ của cá.

**Từ khóa:** *giải trình tự, hóa chất, Kabatana, kháng sinh, mô bệnh học, nuôi tế bào, PCR, vi bào tử trùng*

## ABSTRACT

The study aimed to investigate the microsporidia infection in striped catfish and control methods. The study was carried out in 24 catfish ponds in An Giang, Can Tho, Vinh Long province from 04/2013 to 12/2015. Results showed that in fish muscle infected microsporidia, muscle tissue structure was damaged and necrosis, tissue cells began to completely lyse and there was appearance of sporophorocysts in tissue specimen. Spores were pear-shaped or ovoid appearance, and ultra-size. Inside the spore, there were one helical polar tubule which was very difficult to distinguish when observed under the microscope. Below polar tubule, there was the posterior vacuole occupied more than 1/3 of the spore length. Results of morphological observation combined with gene sequencing show that Microsporidia spores is *Kabatana* sp.

The results showed that kidney and muscle cells grew well in L-15 medium. After 48 hours of culture, numbers of kidney cells increased 16.44%. The results of spore experimental challenges showed that, after 2 hours of challenge, kidney and muscle cells were invaded by spores, accounted for  $11.68 \pm 2.60\%$  of total kidney cells and  $7.49 \pm 3.02\%$  of total muscle cell fibers. After 12 hours, 100% of kidney cells and muscle cell fibers were invaded. Formalin and ethanol (40-70%), chlorine dioxide, hydrogen peroxide, chlorine (0.1-0.7%) effectively killed microsporidia spores. However, the effective time for killing spores ranged from 1.05-39.50 minutes and it was highly dependent on the concentration and types of chemical. Albendazole, fumagillin and TNP-470 can be able to destroy spores of microsporidia. The effective time for killing spores were from 3.20 to 11.75 hours for albendazole, 4.03 to 13.67 hours for fumagillin and 5.37 to 13.75 hours for TNP-4. The results of chemicals inhibition on spores infected in kidney and muscle cells showed that albendazole and fumagillin, at concentration 5  $\mu\text{g/mL}$ , can be applied to treat infection of spores caused by *Kabatana* sp. in fish muscle.

**Keywords:** *sequencing, chemicals, Kabatana, antibiotics, histopathology, cell culture, PCR, Microsporidia*

# Chương 1

## GIỚI THIỆU

### 1.1 Giới thiệu

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng thủy sản được nuôi phổ biến và có giá trị kinh tế ở vùng ĐBSCL. Cá tra có nhiều ưu điểm hơn các loài cá da trơn khác như màu sắc cơ thịt trắng, mùi vị thơm ngon, chứa nhiều chất đạm, EPA, DHA, nhiều chất khoáng quan trọng và các loại vitamin (đặc biệt là vitamin A và D trong gan cá và một số vitamin nhóm B), ít cholesterol nên được thị trường trong và ngoài nước ưa chuộng (Lê Thanh Hùng, 2008).

Tuy nhiên, do cá tra chủ yếu được nuôi thâm canh trong ao đất với mật độ cao, diện tích lớn và sử dụng nguồn nước tự nhiên từ sông, rạch nên khó quản lý tốt môi trường nước trong ao nuôi và dễ phát sinh dịch bệnh. Một số bệnh truyền nhiễm thường gặp và gây nhiều thiệt hại cho nghề nuôi cá tra là bệnh do ký sinh trùng, vi nấm và vi khuẩn. Trong số các bệnh do ký sinh trùng thì bệnh “gạo” là bệnh không gây chết hàng loạt cá tra nuôi nhưng làm cá gầy yếu và làm giảm giá trị thương phẩm do sản phẩm không tiêu thụ được. Khi tỉ lệ nhiễm và cường độ nhiễm bệnh cao cũng có thể làm cá chết hàng loạt, đặc biệt là ở giai đoạn cá hương và cá giống (Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011 và 2012).

Do hình thái bào nang của ký sinh trùng có dạng vệt dài hoặc hình tròn hoặc bầu dục, màu trắng sữa giống hạt gạo ký sinh trong cơ của cá tra nên người nuôi cá gọi là bệnh “gạo”. Những nghiên cứu gần đây của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011 và 2012) ghi nhận bệnh gạo thường xuất hiện trong các ao nuôi cá tra từ giai đoạn giống đến giai đoạn nuôi thương phẩm, bệnh xuất hiện quanh năm, không theo mùa vụ như một số nhóm ký sinh trùng khác. Khi soi tươi mẫu cá tra bị bệnh gạo quan sát thấy vi bào tử trùng *Microsporidia*. Phân tích mô bệnh học ở những vùng cơ cá tra bị bệnh gạo thấy vùng cơ bị mất cấu trúc và hoại tử, bên trong chứa nhiều vi bào tử trùng

Microsporidia. Ngoài ra, phân tích PCR mẫu cơ cá tra nhiễm bệnh gao cũng đã xác định dương tính với vi bào tử trùng Microsporidia.

Có nhiều công trình nghiên cứu về vi bào tử trùng Microsporidia ký sinh trên một số loài cá có giá trị kinh tế như cá hồi, cá bơn, cá chêm, cá cảnh (Lom và Nilsen, 2003; Woo, 2006). Các kết quả nghiên cứu cho thấy đặc điểm hình thái, cách thức lây nhiễm cũng như dấu hiệu bệnh lý của những mẫu cá nhiễm Microsporidia giống nhau. Đặc biệt, Microsporidia có vòng đời khá phức tạp, mức độ lây nhiễm cũng phụ thuộc vào điều kiện môi trường nuôi (Lom và Dykova, 1992; Rodriguez-Tovar, 2004; Casal *et al.*, 2010; Morsy *et al.*, 2012).

Soi tươi, nhuộm và mô bệnh học là những phương pháp thường được sử dụng để chẩn đoán cá nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia. Hai kỹ thuật nhuộm phổ biến nhất đó là nhuộm Weber's trichromic và nhuộm fluorochrome để thấy rõ các nhóm vi bào tử trùng có kích thước nhỏ (Woo, 2006; Anane và Attouchi, 2010). Ngoài ra, phương pháp PCR cũng đang được ứng dụng rộng rãi để phát hiện sớm, nhanh và nhạy mầm bệnh Microsporidia (Pomport-Castillon *et al.*, 2000; Mansour *et al.*, 2005; Ghosh và Weiss, 2009).

Do vi bào tử trùng Microsporidia là nhóm nội ký sinh trùng ký sinh dạng bào nang, nằm ẩn ở nhiều vị trí trong cơ, xương, dưới da và các cơ quan nội tạng của cá, nên khi cá nhiễm bệnh nặng thì việc điều trị bệnh không có hiệu quả. Phòng bệnh cho cá bằng hóa chất (chlorine, hydrogen peroxide, formalin) là biện pháp thường được áp dụng (Santillana-Hayat *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2007). Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy thuốc kháng ký sinh trùng như fumagillin, toltrazuril, TNP-470, benzimidazole có tác dụng kìm hãm và tiêu diệt sự phát triển của một số loài vi bào tử trùng (Schmahl *et al.*, 1990; Woo, 2006; Athanassopoulou *et al.*, 2009). Tuy nhiên, hầu hết các loại thuốc/hóa chất chỉ có hiệu quả khi sử dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm, chưa có loại thuốc/hóa chất đặc trị Microsporidia cho cá nuôi trong ao. Người nuôi chủ yếu áp dụng các biện pháp ngăn chặn sự lây nhiễm bệnh trong ao nuôi hoặc phòng bệnh trong quá trình nuôi. Ở ĐBSCL, hầu hết các hộ nuôi



cá tra sử dụng một số loại thuốc/hóa chất định kỳ phòng bệnh gạo trong quá trình nuôi.

Hiện nay, rất ít thông tin và hầu như chưa có nghiên cứu chuyên sâu về bệnh gạo do vi bào tử trùng Microsporidia ở cá tra. Vì vậy, đề tài “**Nghiên cứu vi bào tử trùng (Microsporidia) nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)**” được thực hiện.

## **1.2 Mục tiêu của nghiên cứu**

### **1.2.1 Mục tiêu tổng quát**

Cung cấp thông tin về vi bào tử trùng Microsporidia gây bệnh gạo, làm cơ sở khoa học cho các giải pháp phòng trị bệnh gạo ở cá tra, hướng đến nghề nuôi cá tra bền vững.

### **1.2.2 Mục tiêu cụ thể**

- Xác định đặc điểm hình thái và giống loài vi bào tử trùng Microsporidia gây bệnh gạo trên cá tra.
- Thử nghiệm kỹ thuật nuôi bào tử vi bào tử trùng bằng tế bào thận và sợi cơ cá tra.
- Xác định khả năng ức chế vi bào tử trùng Microsporidia của một số hóa chất và thuốc kháng ký sinh trùng.

## **1.3 Phạm vi nghiên cứu**

Nghiên cứu tập trung vào việc xác định đặc điểm hình thái của vi bào tử trùng Microsporidia gây bệnh gạo trên cá tra giai đoạn cá hương, cá giống và nuôi thương phẩm ở các tỉnh Cần Thơ, An Giang và Vĩnh Long. Nuôi tế bào thận/cơ cá tra và thử nghiệm (*in vitro*) phòng trị vi bào tử trùng Microsporidia nhiễm trong thận/cơ cá tra bằng một số loại thuốc và hóa chất.

## **1.4 Nội dung nghiên cứu**

- Phân loại và xác định hình thái vi bào tử trùng Microsporidia
- Nghiên cứu kỹ thuật nuôi cấy tế bào thận/cơ cá và thí nghiệm gây cảm nhiễm với vi bào tử trùng Microsporidia

- Thử nghiệm (*in vitro*) một số loại hóa chất và thuốc có khả năng ức chế hoặc phòng trị vi bào tử trùng Microsporidia.

### **1.5 Ý nghĩa của luận án**

Kết quả nghiên cứu của luận án cung cấp thông tin chuyên sâu về tác nhân vi bào tử trùng Microsporidia gây bệnh gạo trên cá tra và phương pháp nuôi cấy chúng và tìm hiểu ảnh hưởng của một số hóa chất, hoạt chất kháng sinh lên vi bào tử trùng Microsporidia trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả của luận án góp phần hiểu rõ hơn về cơ chế gây bệnh và lây lan của mầm bệnh, từ đó có hướng phòng và điều trị bệnh gạo đạt hiệu quả để phục vụ cho nghề nuôi cá tra bền vững.

### **1.6 Điểm mới của luận án**

Lần đầu tiên xác định tác nhân gây bệnh gạo trên cá tra là vi bào tử trùng *Kabatana* sp. Đồng thời, ghi nhận được các đặc điểm hình thái, phân loại, bệnh học của vi bào tử trùng trong quá trình lây nhiễm ở cá tra.

Lần đầu tiên thử nghiệm cảm nhiễm vi bào tử trùng *Kabatana* sp. với tế bào thận và sợi cơ cá tra và xác định tác dụng của thuốc và hóa chất lên vi bào tử trùng trong môi trường nuôi tế bào sơ khai.

Xác định được một số loại hóa chất tiêu diệt vi bào tử trùng *Kabatana* sp. gây bệnh gạo ở cá tra và thuốc kháng ký sinh trùng có thể sử dụng điều trị bệnh.

## Chương 2

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 2.1 Tổng quan bệnh ký sinh trùng trên cá tra

Bệnh ký sinh trùng thường không gây chết hàng loạt nhưng làm cá gầy yếu và giảm giá trị thương phẩm. Tuy nhiên, nếu tỉ lệ và cường độ nhiễm ký sinh trùng cao có thể gây thiệt hại cao cho người nuôi. Bệnh ký sinh trùng gây hại cho cả cá giống và cá thịt. Theo Hà Kỳ và Bùi Quang Tề (2007) một số loài ký sinh trùng thường gặp trên cá nước ngọt ở Việt Nam bao gồm *Trichodina* (trùng bánh xe), *Ichthyophthyrus* (trùng quả dưa), *Balantidium* (trùng lông), *Dactylogyrus* (sán 16 móc), *Gyrodactylus* (sán 18 móc), *Philometra* (giun tròn) và *Trematoda* (sán song chủ).

Kết quả khảo sát thành phần giống loài ký sinh trùng hiện diện trên cá tra nuôi thâm canh trên địa bàn tỉnh An Giang của Nguyễn Thị Thu Hằng và *ctv* (2008) cho thấy thành phần ký sinh trùng xuất hiện trên cá tra nuôi rất đa dạng với 19 loài ký sinh trùng thuộc 4 ngành. Trong đó 13 loài thuộc nhóm ngoại ký sinh và 6 loài thuộc nội ký sinh. Trong báo cáo tác giả cũng cho thấy tần suất xuất hiện của các giống loài ký sinh trùng *Myxobolus* sp., *Trichodina* sp., *Dactylogyrus* sp., *Ichthyonyctus pangasia* và *Bucephalosis gracilescens* trên cá tra bệnh là rất thường xuyên.

Ngoài ra kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Thanh Hương và Từ Thanh Dung (2010) cho thấy có 7 loài ký sinh trùng trên cá tra bị vàng da chủ yếu ở 4 cơ quan ruột, gan, mật và tỳ tạng. Trong đó có 4 giống ký sinh trong ruột: sán song chủ *Bucephalopsis*, giun tròn *Spectatus*, trùng lông *Balantidium* và *Ichthyonytus*.

Gần đây, trên cá tra xuất hiện loại bệnh mới cũng do ký sinh trùng gây ra được biết với tên gọi bệnh gạo. Do hình thái bào nang của ký sinh trùng ký sinh trong cơ cá dạng vệt dài (lúc mới nhiễm trên cá giống) hoặc hình tròn hoặc hình bầu dục, màu trắng sữa giống hạt gạo nên được gọi là bệnh gạo. Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011, 2012) thì bệnh gạo không làm cho cá chết hàng loạt như một số loại bệnh khác

nhưng làm cho cá gầy yếu và đặc biệt làm giảm giá trị thương phẩm, ảnh hưởng đến kinh tế của người nuôi cá. Nếu tỉ lệ nhiễm và cường độ nhiễm ký sinh trùng cao, nhất là ở giai đoạn cá giống có thể gây chết cá và làm thiệt hại cho người nuôi. Kết quả nghiên cứu cho thấy bệnh gạo thường xuất hiện quanh năm trong các ao nuôi cá tra, không theo mùa như một số nhóm ký sinh trùng khác. Nghiên cứu đã xác định các bào nang gây bệnh gạo trong cơ cá là vi bào tử trùng *Microsporidia*. Bên cạnh đó, ở một số mẫu cá bệnh gạo còn có sự hiện diện của thích bào tử trùng *Myxobolus*.

Một số giống sán lá khác cũng được phát hiện nhiễm trên cá tra. Nghiên cứu gần đây đã phân lập được nhiều loài sán lá nhiễm trên cá tra ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long gồm: *Haplorchis pumilio*, *H. taichui*, *Centrocestus formosanus*, *Opisthorchis viverrini*, *Procerovum* sp. và *Stellantchasmus falcatus*. Ấu trùng của sán lá thường ký sinh trong cơ, đầu và vây cá. Nhìn chung, tỷ lệ nhiễm cao hơn trong mùa mưa từ tháng 4 đến tháng 10. Tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm ký sinh trùng trên cá nuôi ở các trang trại lớn thấp hơn so với mô hình nuôi dạng nông hộ. Cá giống từ 61-90 ngày tuổi thường nhiễm ký sinh trùng mật độ cao, từ đó có thể có nguy cơ lây nhiễm liên tục trong ao sau khi thả giống (Thien *et al.*, 2007; Thu *et al.*, 2007; Thuy *et al.*, 2010; Đặng Thúy Bình và *ctv*, 2014).

## **2.2 Tổng quan kết quả nghiên cứu vi bào tử trùng *Microsporidia* trên cá**

### **2.2.1 Thế giới**

Trên thế giới, nhiều công trình nghiên cứu đã ghi nhận sự lây nhiễm của vi bào tử trùng *Microsporidia* trên nhiều loài cá nuôi nước ngọt, lợ và mặn. Đặc biệt, *Microsporidia* thường ký sinh dưới dạng bào nang trong lớp mô cơ của cá. Theo Lom và Dykova (1992), *Microsporidia* có khả năng sinh sản bằng cách phân chia tế bào tạo ra một số lượng lớn bào tử. Các bào tử sẽ phát triển thành bào tử trưởng thành trong bào nang. Khi ký sinh trong tổ chức cơ quan của cá, bào nang có màu trắng sữa, đường kính 2-3 mm. Một số loài có khả năng kích thích làm các tế bào nhiễm bệnh trương to (xenomas), điển hình là loài *Glugea anomala*. Các tế bào bị nhiễm bệnh thường là tế bào ở mô liên kết hoặc trung

mô gốc, bào nang có thể đạt đến kích thước 14 mm. Lúc cá bị nhiễm nặng có thể nhìn thấy rõ các bào nang rất lớn trên thân cá, cá bơi lội không bình thường, sinh trưởng chậm và tỉ lệ chết khá cao.

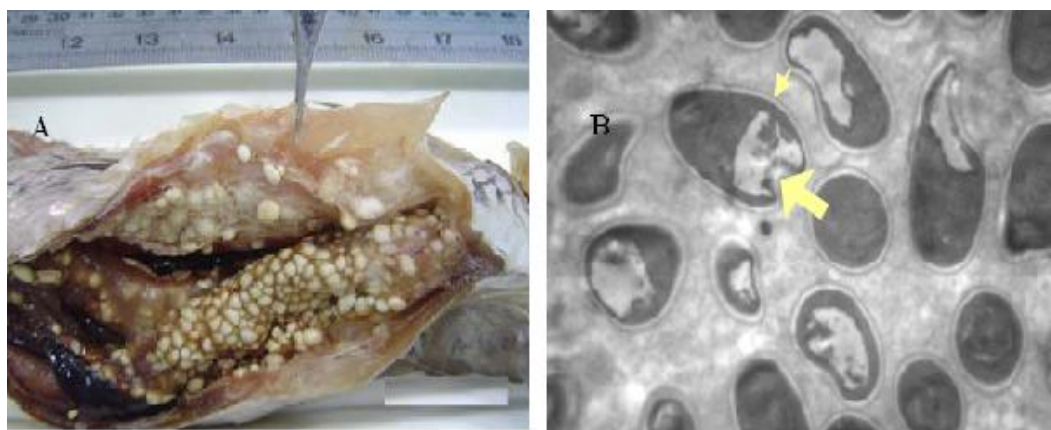
Sự phát triển của Microsporidia bên trong vật chủ phụ thuộc nhiều yếu tố môi trường, trong đó nhiệt độ có tác động lớn nhất đến quá trình sinh sản của bào tử. Kết quả nghiên cứu cá hồi 1 năm tuổi nhiễm vi bào tử trùng *Glugea plecoglossi* cho thấy sự phát triển của chúng xảy ra rất chậm nếu cá nhiễm bệnh được nuôi giữ ở nhiệt độ nước là 16°C. Khi chuyển cá hồi bị nhiễm bệnh xuống nuôi ở nhiệt độ nước là 8°C thì bào tử không phát triển. Bào tử có khả năng tồn tại trong nước ở 4°C trong thời gian 1 năm. Sự lây nhiễm mầm bệnh chủ yếu là do môi trường nước, chưa có tài liệu chứng minh được sự lây nhiễm qua vật chủ trung gian. Ngoài ra, các tác giả còn ghi nhận loài *Paracheirodon inessi* và loài *Glugea anomala* ký sinh trên cá hồi giai đoạn giống và gây hại trên nhiều loài cá chép nuôi nước ngọt (Lom và Dykova, 1992; Lom *et al.*, 1995). Loài *Microsporidium arthuri* thường nhiễm trên cá da trơn *Pangasius sutchi* ở khu vực Đông Nam Á. Nghiên cứu đã ghi nhận bào tử hình quả lê, kích thước trung bình 3,2 x 2,1 µm và có thể thay đổi hình dạng trong thời gian nhiễm. Khi cá bị nhiễm nặng, một số lượng lớn bào nang ký sinh sẽ phá hủy các hệ cơ của cá. Hệ miễn dịch của cá cũng có sự phản ứng lại để hạn chế sự xâm nhiễm của các bào tử (Lom *et al.*, 1999).

Một báo cáo khác của Lom *et al.* (2000) cũng cho thấy sự xâm nhiễm của loài *Kabatana arthuri* trên cá da trơn *Pangasius sutchi* ở Thái Lan đã gây ra sự thay đổi nghiêm trọng các sợi cơ của cá. Sự hoại tử nghiêm trọng xảy ra trên sợi cơ theo các giai đoạn phát triển của bào nang và trên bề mặt của các bào nang. Đặc điểm chính của sự phản ứng với ký chủ là quá trình thực bào của các đại thực bào trong lớp mô cơ.

Ngoài ra, loài *Glugea anomala* và loài *Glugea vincentiae* thuộc ngành vi bào tử trùng Microsporidia cũng đã được ghi nhận nhiễm trên cá gai (*Gasterosteus aculeatus*) ở Bắc Mỹ và nhiều loài cá ở Úc với tỉ lệ nhiễm hơn 50% (Bristow *et al.*, 2002; Vagelli *et al.*, 2005). Chúng ký sinh trong tổ chức

mô liên kết, bào nang có màu trắng sữa, đường kính 3-4 mm. Cơ thể cá bị nhiễm bệnh thường biến dạng, tế bào tổ chức bị trương nước, hoạt động của các tổ chức cơ quan bị rối loạn và có thể dẫn đến làm cá chết. Tương tự, kết quả nghiên cứu ký sinh trùng của Nguyễn Thị Thu Hằng và ctv (2008) cũng ghi nhận loài *G. anomala* trong cơ của cá gai (*Gasterosteus aculeatus*) sống trong môi trường nước ngọt, lợ và mặn ở Bergen, Na Uy.

Tại Iran, trên loài cá bống (*Saurida undosquamis*) có sự hiện diện của các bào nang màu trắng sữa, kích thước  $4,3 \pm 1,8$  mm, ký sinh trong cơ, dạ dày, ruột, gan và thận cá. Khi làm tiêu bản mẫu nhuộm với Giemsa và chụp hình dưới kính hiển vi điện tử (SEM), các bào nang này chứa hàng triệu bào tử của *Glugea* spp. với tỷ lệ nhiễm chiếm 44% (Hình 2.1A). Qua các mẫu chụp SEM cho thấy các bào tử *Glugea* spp có kích thước  $2,4 \times 1,3$   $\mu$ m, chúng có hình trứng hoặc hình bầu dục, mặt ngoài trơn láng và bên trong có 1 ống lớn (polar tube) gấp 6 đến 8 vòng (Hình 2.1B).



**Hình 2.1: (A) Các bào nang trong xoang nội quan và cơ của cá bống lizardfish; (B) hình chụp SEM các bào nang của *Glugea* sp. (nguồn: Peyghan et al., 2009)**

Theo Noga (2010), trên các đối tượng thủy sản đặc biệt là ở các loài cá nuôi, ký sinh trùng thường ký sinh ở các cơ quan như tia mang, mô cơ, gan, thận, tỳ tạng, thành ruột, ruột, dạ dày... Trong đó, nhóm trùng ký sinh trong các mô cơ thể rất nguy hiểm và rất khó điều trị khi chúng lây nhiễm trên cá. Khi xâm nhập vào các lớp mô cơ trùng sẽ được kích thích để hình thành bào nang (khối tế bào khổng lồ - xenomas) màu trắng sữa, bào nang có khả năng bảo vệ

trùng chống lại các tác nhân lý, hóa học. Bên cạnh đó, bào nang (xenomas) gắn chặt vào lớp mô cơ, vì vậy rất khó để loại bỏ khỏi xenomas. Do vậy, nhóm nội ký sinh trong lớp mô cơ thường làm suy giảm sức khỏe của cá, ảnh hưởng lớn đến chất lượng sản phẩm khi thu hoạch.

Tiếp theo đó một loài vi bào tử trùng mới (*Kabatana newberryi*) được tìm thấy trong cơ của loài cá bống *Eucyclogobius newberryi* (Gobiidae) trên hạ lưu sông Amazon. Vi bào tử trùng *K. newberryi* ký sinh trong cơ dưới dạng bào nang, bên trong chứa rất nhiều bào tử hình trứng có chiều dài từ 2,8 x 0,3  $\mu\text{m}$  và chiều rộng từ 1,9x0,4  $\mu\text{m}$ . Sự phát triển của bào tử xảy ra trong tế bào chất của tế bào cơ vật chủ thông qua tiếp xúc trực tiếp. Loài *K. newberryi* sp. được tìm thấy trên loài cá *E. newberryi* với mức độ nhiễm cao, đã gây nên nguy cơ hao hụt rất lớn cho đàn cá (Casal *et al.*, 2010). Kế tiếp, một nghiên cứu khác cũng ghi nhận các trường hợp nhiễm nhóm vi bào tử trùng *Glugea* spp. trên loài cá mú mỡ *Epinephelus tauvina*. Kết quả cho thấy *Glugea* spp. lây nhiễm với tỷ lệ cảm nhiễm đến 90%, chúng tạo ra những khối xenomas lớn trên mô cơ cá và các cơ quan nội tạng như gan, thận, thành bụng (Jithendran *et al.*, 2011).

Nhiều kết quả công bố cho thấy *Spraguea* sp. tấn công vào các tế bào thần kinh của cá với tỷ lệ chết chiếm 75%. Điển hình là nghiên cứu về loài vi bào tử trùng *Spraguea* sp. lây nhiễm và gây bệnh nghiêm trọng trên loài cá *Lophius litulon* ở Nhật Bản. Nhóm cá có chiều dài nằm trong khoảng 403 mm là đối tượng tấn công chủ yếu của mầm bệnh. Ở những cá thể nhỏ hơn thường có tỉ lệ nhiễm thấp. Bào tử có kích thước trung bình khoảng 3,4x1,8  $\mu\text{m}$ . Kết quả quan sát kính hiển vi điện tử (TEM) cho thấy bào tử *Spraguea* sp. chỉ có một chu kỳ phát triển duy nhất và một hình thức ký sinh trong các tế bào. Kết quả giải trình tự gen (SSU) rDNA ghi nhận đây là loài *Spraguea americana* lần đầu tiên được phát hiện lây nhiễm trên các loài cá ở biển Thái Bình Dương (Freeman *et al.*, 2011).

Giống vi bào tử trùng *Pleistophora* cũng được ghi nhận là tác nhân gây bệnh trên loài cá tráp đỏ (*Pagrus pagrus*) ở Ai Cập, có 18% cá bị nhiễm bào nang tròn, trắng đục ở màng bụng và thành ruột. Các kết quả quan sát hình thái

và giải trình tự gen cho biết đây là loài *Pleistophora pagri*. Loài vi bào tử trùng này có kích thước bào tử khoảng 1,5x1,7  $\mu\text{m}$ . Các bào tử có cấu trúc đơn nhân, sợi cực xoắn 5 vòng và gắn với cực nang (Morsy *et al.*, 2012).

### 2.2.2 Việt Nam

Trong những năm gần đây, nghề nuôi cá tra ở ĐBSCL phát triển nhanh chóng. Bên cạnh đó, dịch bệnh ngày càng phổ biến và phức tạp hơn. Trong đó, bệnh gạo trên cá tra từ lâu đã là nỗi lo lắng của nhiều người nuôi cá, tác nhân gây bệnh gạo do vi bào tử trùng Microsporidia trên cá tra đang dần dần được nghiên cứu. Tiêu biểu nhất là nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011) đã khảo sát trên 324 mẫu cá tra thu tại một số tỉnh ở ĐBSCL. Kết quả soi tươi đã phát hiện 133 mẫu cá nhiễm bào nang (bệnh gạo) của vi bào tử trùng ở nhiều mức độ khác nhau. Khi giải phẫu và kiểm tra ký sinh trùng cá, hầu hết các bào nang tồn tại trong cơ ở dạng những túi tròn hay những vệt dài, kích thước dao động từ 0,5-4 mm, bên trong chứa một chất lỏng hơi sệt màu trắng sữa. Đặc biệt là ở những cá nhiễm bệnh nặng, các bào nang gạo thường có xu hướng tập trung nhiều ở phần cơ chính giữa, gần cơ quan đường bên của cá. Các bào nang ký sinh trong cơ cá thường gây ra hiện tượng hoại tử vùng cơ xung quanh bào nang. Các vùng hoại tử này có xu hướng phát triển theo kích cỡ của bào nang và tạo thành khoảng trống bên trong cơ cá.

Năm 2012, nhóm tác giả cũng tiếp tục ghi nhận trên 266 mẫu cá tra giống và thương phẩm ở Thốt Nốt, Cần Thơ cũng nhiễm bào nang (bệnh gạo) với tỷ lệ nhiễm trên cá giống là 72,34%, cá thịt là 92,30%. Kết quả cho thấy có 2 nhóm ký sinh trùng thuộc *Myxozoa* (gồm *Myxobolus*, *Henneguya*) và Microsporidia tạo ra những bào nang màu trắng sữa có đường kính dao động từ 0,5-3 mm ký sinh trong mang, màng treo ruột, ruột, thận, túi mật và cơ của cá. Một số bào nang ký sinh trong cơ cá có chứa Microsporidia và *Myxobolus*, trong khi đó bào nang ở các cơ quan khác chứa *Myxobolus* hoặc *Henneguya*. Số lượng bào nang nhiễm trên cá khác nhau trong từng trường hợp nhiễm giống *Henneguya*, *Myxobolus* hay Microsporidia và phụ thuộc vào cơ quan ký sinh, ngoài ra bào nang nhiễm ở cá thịt nhiều hơn cá giống. Hầu hết các mẫu cá có dấu hiệu xuất



huyết, phù đầu hoặc vàng da thường nhiễm gạo nhiều hơn mẫu cá khỏe. Kết quả mô bệnh học ghi nhận hình dạng bào nang nằm bên trong vùng cơ đã bị hoại tử, ngoài bào nang có một lớp màng mỏng là mô liên kết để bao bọc những bào tử (Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012).

## **2.3 Đặc điểm sinh học của vi bào tử trùng Microsporidia**

### **2.3.1 Phân loại**

Vi bào tử trùng Microsporidia là những nguyên sinh động vật ký sinh nội bào bắt buộc thuộc giới nguyên sinh.

Theo Lom và Dickova (1992), Woo (2006) thì hệ thống phân loại của nhóm vi bào tử trùng gồm:

Giới: Protozoa

Ngành: Microspora

Lớp: Microsporea

Bộ: Microsporida

Họ: Glugeidae

Họ: Incertae sedis

Họ: Pleistophoridae

Họ: Unikaryonidae

Vi bào tử trùng Microsporidia ký sinh trên cá có khoảng 144 giống, 1200 loài, trong đó có 156 loài thuộc 14 giống được ghi nhận là tác nhân gây bệnh trên các đối tượng thủy sản (Lom và Nilsen, 2003; Casal *et al.*, 2010). Vi bào tử trùng Microsporidia thường ký sinh trong tế bào của các tổ chức như tuyến sinh dục, gan, thận, mật, ruột, tổ chức mỡ, da, mang và cơ của cá. Bên cạnh đó, trùng còn ký sinh trên giáp xác (tôm, cua) sống trong môi trường tự nhiên và ao nuôi. Có hơn 30 loài thuộc 3 giống làm ảnh hưởng đến tỷ lệ sống, đặc biệt làm giảm chất lượng sản phẩm thu hoạch. Theo Monagang *et al.* (2009) các giống *Glugea*, *Loma*, *Nucelospora* và *Heterosporis* là 1 trong số tác nhân gây bệnh phổ biến ở các loài cá có giá trị kinh tế. Biểu hiện bệnh lý của cá thay đổi khác nhau theo loài vi bào tử trùng và các cơ quan bị nhiễm bệnh.

### 2.3.2 Hình thái

Nhiều kết quả nghiên cứu về vi giải phẫu, sinh học phân tử của vi bào tử trùng Microsporidia đã ghi nhận hình thái của chúng là các tế bào không có ty thể hoặc bộ máy golgi điển hình, các ribosome của tế bào không tương đồng với các tế bào có nhân điển hình (eukaryotic) nhưng giống với ribosome của các tế bào không có nhân điển hình (prokaryote) (Sprague *et al.*, 1992; Elisa *et al.*, 2001, Woo, 2006). Nhóm vi bào tử trùng Microsporidia có bào tử dạng hình cầu, hình trứng, hầu hết là hình trứng với kích thước nhỏ nhất là 1  $\mu\text{m}$  (loài *E. bieneusi*) đến 40  $\mu\text{m}$  (loài *Bacillidium filiferum*). Trong cùng 1 loài, cấu tạo của bào tử có xu hướng ổn định, tuy nhiên trong từng giai đoạn của chu kỳ sống, chúng sẽ tạo ra các dạng bào tử khác nhau.

Nghiên cứu của Elisa *et al.* (2001) cho rằng đặc điểm để phân biệt bào tử trưởng thành là kích thước từ 2-7  $\mu\text{m}$  đến 1,5-5  $\mu\text{m}$ , thành tế bào dày, sợi cực xoắn nhiều vòng. Thành của bào tử có tính chất cơ học phức tạp nhằm giúp bào tử chống lại những tác nhân từ môi trường và cho phép sự gia tăng áp lực thủy tĩnh gây ra khi phóng các giao tử và sợi cực để xâm nhập vào tế bào chủ. Kết quả quan sát ghi nhận thành bào tử bao gồm lớp màng ngoài trong suốt, kể đến là lớp màng trong có các điện tử dày đặc. Tuy nhiên, ở cuối trước của bào tử, phía trước của đĩa neo, lớp màng trong ít dày hơn, sắp xếp nhiều điện tử dày đặc hơn. Điểm khác biệt này có thể giúp ích cho việc phóng thích sợi cực một cách dễ dàng. Kết quả nghiên cứu siêu cấu trúc của giống vi bào tử trùng *Encephalitozoon* sp. sử dụng phương pháp TEM cho thấy lớp màng ngoài có cấu trúc rất phức tạp, bao gồm ba lớp: một lớp gai bên ngoài, một lớp điện cực trong suốt dạng phiến trung gian và một lớp xơ bên trong. Không bào có cấu trúc như các tiểu cầu có thể phình to trong khi phóng thích sợi cực. Điểm đặc biệt ở nghiên cứu này là sự kết hợp của không bào, mạng lưới nội chất và thể golgi trong việc phóng thích sợi cực xâm nhập vào tế bào vật chủ.

Theo Franzen (2005), cấu tạo của bào tử rất đơn giản, bên ngoài có màng do chất kitin tạo thành gồm 3 lớp: vách ngoài bào (exospore) dày đặc với các điện cực âm, vách nội bào (endospore) trong suốt ở giữa và 1 màng plasma trong

cùng. Cấu tạo bên trong gồm có: cực nang (polaroplast) hình dạng giống như bào tử, bên trong có sợi cực (polar tube) hình ống dạng cuộn tròn như lò xo (số lượng của các cuộn cực này phụ thuộc vào loài và thay đổi từ một vài đến 30 cuộn hoặc nhiều hơn) kết thúc ở phần đỉnh của bào tử là 1 lớp đĩa neo các cuộn sợi cực, nhân tế bào và không bào ở phía sau. Trong tế bào chất có hạch hình tròn và tế bào chất cũng có hình tròn.



**Hình 2.2: Hình thái cấu tạo của Microsporidia (nguồn: Franzen, 2005)**

Đặc điểm hình thái và cấu tạo của mỗi giống loài khác nhau, giai đoạn tế bào giao tử (*Sporont*) hay cấu tạo của các bào nang của từng giống loài cũng khác nhau (Woo, 2006). Đặc điểm nhận dạng một số giống loài vi bào tử trùng thường gặp trên cá được tổng hợp trong Bảng 2.1.

**Bảng 2.1: Đặc điểm hình thái và cấu tạo của một số giống loài Microsporidia**

Loài vi bào tử	Loài cá nhiễm	Cơ quan ký sinh	Kích thước bn (mm)	Số vòng cuộn của sợi cực	Kích thước bào tử (μm)	Hình dạng bào tử	Nguồn tham khảo
<i>Pleistophora macrozoarcidis</i>	<i>Macrozoarces americanus</i>	cơ	nd	nd	3,5 × 5,5 (8)	hình trứng	Sheehy <i>et al.</i> , 1974
<i>Loma branchialis</i>	<i>Gadus aeglefinus</i>	mang	0,5	nd	2,3 × 4,8	hình trứng	Morrison và Sprague, 1981
<i>Glugea anomala</i>	nd	nd	0,8-10	12-14	1,9-2,7 × 3-5,6	nd	Canning <i>et al.</i> , 1982
<i>Glugea cepedianae</i>	<i>Dorosoma cepedianum</i>	thành bụng, cơ quan	10	nd	2,3 × 4,9	hình trứng	Canning và Lom, 1986

		nội tạng						
<i>Microgemma</i> spp	nd	nd	5	7-9	4,2x2,4	nd	Ralps và Matthews, 1986	
<i>Glugea plecoglossi</i>	<i>Plecoglossus altivelis</i>	nd	nd	nd	2,1 × 5,8	hình elip	Figueras <i>et al.</i> , 1992	
<i>Microgemma ovoidea</i>	<i>Motella tricirrata</i> , <i>Cepola rubescens</i> , <i>Mullus barb</i>	gan	nd	nd	1,5 × 2,5	hình trứng	Amigo <i>et al.</i> , 1998	
<i>Glugea caulleryi</i>	nd	nd	0,35-1	7-9	1,2-2,6	nd	Leiro <i>et al.</i> , 1999	
<i>Kabatana seriolae</i>	nd	nd	nd	4-6	3,1-1,9	nd	Lom <i>et al.</i> , 1999	
<i>Loma acerinae</i>	<i>Gymnocephalus cernuus</i> ,	ruột	0,5	nd	2,7 × 4	hình elip	Lom và Pekkarinen, 1999	
<i>Heterosporis anguillarum</i>	<i>Anguilla japonica</i>	cơ	nd	nd	2,4 × 7,8	hình trứng	Lom <i>et al.</i> , 2000	
<i>Kabatana arthuri</i>	<i>Pangasius sutchi</i>	cơ	nd	nd	2,1 × 3,1	hình tròn	Lom và Dykova, 2000	
<i>Kabatana arthuri</i>	nd	nd	nd	4-7	2,8x1,9	nd	Lom <i>et al.</i> , 2001	
<i>Loma salmonae</i>	<i>O. mykiss</i> , <i>O. masou</i> và <i>Oncorhynchus nerka</i>	mang	nd	nd	2,4 × 7,5	dạng tứ diện	Sanchez <i>et al.</i> , 2001	
<i>Microsporidium takedai</i>	nd	nd	nd	3-4	3,3±1,9	nd	Lom <i>et al.</i> , 2001	
<i>Pseudoloma neurophilia</i>	<i>Danio rerio</i>	hệ thần kinh	nd	13-16	5,4 × 2,7	hình trứng	Matthews <i>et al.</i> , 2001	
<i>Nucleospora secunda</i>	<i>Nothobranchius rubripinnis</i>	ruột	nd	4-5	1,6 × 0,8	hình elip	Lom và Dykova, 2002	
<i>Nucleospora secunda</i>	<i>Nothobranchius rubripinnis</i> , <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	ruột, tế bào máu	nd	8-12	1,5 × 2	hình trứng	Lom và Dykova, 2002	
<i>Ovipleistophora mirandellae</i>	<i>Abramis bjoerkna</i> , <i>Abramis brama</i> , <i>B. Barbus</i> , <i>Leuciscus leuciscus</i> , <i>Rutilus rutilus</i>	nd	nd	nd	3,9-6,4 × 7,4-12	hình bầu dục	Lom và Nilsen, 2003	
<i>Microsporidium brevirostris</i>	nd	nd	nd	27-28	2,9×1,6	nd	Matos và Azevedo, 2004	
<i>Microgemma tincae</i>	<i>Symphodus tinca</i>	gan	2	8-9	3,6 x 1,2	hình trứng	Mansour <i>et al.</i> , 2005	

<i>Glugea</i> , <i>Tetramicra</i> , <i>Icht</i> <i>hyosporidium</i> <i>Glugea anomala</i>	<i>Gasterosteus</i> <i>aculeatus</i> , <i>Pungitius</i> <i>pungitius</i> , <i>Nothobranchius</i> sp., <i>Austrolebias</i> sp	cơ quan nội tạng	3-5	nd	1,9-2,7 × 3-6	hình trứng	Woo, 2006
<i>Kabatana</i> <i>takedai</i>	<i>O. mykiss</i> , <i>Oncorhynchus</i> <i>gorbuscha</i> , <i>Oncorhynchus</i> <i>masou</i> , <i>Oncorhynchus</i> <i>keta</i> , <i>Salvelinus</i> <i>leucomaenis</i>	cơ	nd	nd	2 × 3,4	hình trứng	Lom <i>et al.</i> , 2001; Barber <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
<i>Glugea</i> spp.	nd	nd	0,8- 10	6-15	2,4-1,3	nd	Peyghan <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
<i>Pleistophora</i> <i>spp</i>	nd	nd	1-4	20-24	3,2x2,8	nd	Liu, 2011; Alde-Baki <i>et al.</i> , 2012
<i>N. salmonis</i>	<i>Cyclopterus</i> <i>lumpus</i>	Thận, tỳ tạng	nd	nd	3,12 ± 0,15 × 1,30 ± 0,12	hình trứng	Freeman <i>et</i> <i>al.</i> , 2013

*Ghi chú: nd: không có thông tin*

Theo Kyei-Poku (2011), khi quan sát vi bào tử trùng *Cystosporogenes* dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử thấy cấu trúc bào nang có những đặc điểm tương đồng. Các bào tử của nhóm này có dạng hình hạt đậu, lớp màng ngoài có dạng lượn sóng, lớp màng trong dày hơn và trong suốt. Cấu trúc bên trong của bào tử gồm (1) một đĩa neo dạng mái vòm ở cuối phía trước, (2) các sợi cực sắp xếp xung quanh nhân, cuộn 8-10 vòng đơn, kéo dài đến nửa sau của các bào tử, (3) nhân tế bào thon dài, chiếm hơn một phần ba chiều dài của cấu trúc tế bào chất và được bao quanh bởi nhiều lớp lưới nội chất thô, (4) không bào nằm ở phần sau cùng.

### 2.3.3 Vòng đời phát triển

Theo ghi nhận từ công trình nghiên cứu của Franzen (2005), vi bào tử trùng *Microsporidia* gây bệnh trên cá có vòng đời sinh trưởng bao gồm giai đoạn tăng sinh và giai đoạn hình thành bào tử. Cả hai giai đoạn này đều diễn ra trong tế bào của ký chủ. Quá trình phát triển của vi bào tử trùng bắt đầu từ bào tử tự do ngoài môi trường nước, khi gặp điều kiện thích hợp bào tử sẽ xâm nhập vào tế bào chủ bằng 2 cách. Cách thứ nhất là phóng thích ống cực xâm nhập vào màng của tế bào ký chủ 1 cách chủ động (Hình 2.3A: a và b). Sau đó, chúng sẽ

phóng thích các cực nang lây nhiễm vào trong tế bào chất của tế bào ký chủ. Cách thứ hai là xâm nhập vào tế bào 1 cách thụ động, vi bào tử trùng bị tế bào chủ ăn vào (thực bào), tuy nhiên tế bào không thể tiêu hóa được vi bào tử trùng và bị các bào tử ký sinh phát triển trong đó (Hình 2.3B: a và b). Tại đây, giai đoạn tăng sinh bắt đầu diễn ra, các cực nang được giải phóng sẽ phát triển thành các thể phân cắt đơn nhân và được bao quanh bởi một không bào (Hình 2.3A c; 2.3B e). Các thể phân cắt này sinh sản bằng phân hạch và cuối cùng phát triển thành các tế bào giao tử. Các tế bào giao tử được bảo vệ bởi lớp màng dày (Hình 2.3A d; 2.3B f). Tiếp theo, ở giai đoạn hình thành bào tử, các tế bào giao tử phân chia thành các nguyên bào tử bằng cách phân hạch (Hình 2.3A e và f; 2.3B g). Cuối cùng các nguyên bào tử sẽ phát triển thành bào tử trưởng thành được bảo vệ trong các không bào (Hình 2.3A g; 2.3B h) và lây nhiễm sang vùng mô lân cận (Hình 2.3A h).



**Hình 2.3: Vòng đời phát triển của Microsporidia (nguồn: Franzen, 2005)**

Khả năng tăng sinh nhanh chóng của các thể phân cắt đơn nhân và các tế bào giao tử được thực hiện bằng cách phân hạch nhị phân ở các loài thuộc giống *Encephalitozoon*, *Nosema* và *Vittaforma*, hoặc phân hạch đa phân ở các loài

thuộc giống *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*. Giai đoạn tăng sinh (merogony) xảy ra khi cực nang phóng sợi cực vào tế bào vật chủ thích hợp. Các tế bào tăng sinh thành thể phân cắt đơn nhân có dạng hình tròn được bao quanh bởi một lớp màng mỏng. Các thể này có nhân đơn hoặc kép tùy thuộc vào thành phần loài. Tế bào chất kém phát triển, nhiều ribosome tự do trong tế bào chất gắn vào màng nhân. Ngoài ra các thể phân cắt cũng đã hình thành những sợi mỏng có đường kính khoảng 5 nm gắn liền với màng tế bào giúp phát triển các sợi cực trong bào tử trưởng thành (Bigliardi *et al.*, 1999).

Ở các trường hợp cảm nhiễm nặng vi bào tử trùng *Pleistophora* sp. hoặc *Glugea* sp. có thể là do sự lây lan các thể phân cắt đơn nhân ở giai đoạn tăng sinh trong các mô đã bị nhiễm bệnh. Khi bào tử trưởng thành phóng thích cực nang và xâm nhiễm vào các tế bào lân cận, bề mặt và cấu trúc của thể phân cắt đơn nhân cũng thay đổi tùy theo các giống loài vi bào tử trùng. Bên cạnh đó, các bào tử được sản sinh trong giai đoạn hình thành bào tử ở hầu hết các giống loài đều được bao bọc trong bào nang, đặc biệt được hình thành từ màng của tế bào giao tử. Các bào nang có thể được bao quanh bởi một màng dày hoặc mỏng tùy từng loài (Lom và Nilsen, 2003).

Tuy nhiên, loài *Glugea anomala* có một ký chủ là cá trong chu kỳ sống, *G. anomala* xâm nhập vào tế bào biểu mô của vật chủ qua da, đôi khi trong khoang ruột. Khi đã phát triển thành khối tế bào khổng lồ (*xenomias*) chứa đầy các giai đoạn phát triển, khối tế bào này nhô ra bên ngoài da cá làm cản trở hoạt động bơi lội và làm cá tiêu tốn nhiều năng lượng. Loài *G. anomala* chỉ có một ký chủ trong vòng đời, vì vậy để lây nhiễm đến vật chủ kế tiếp thì bào nang cần được thải ra môi trường nước. Điều này có thể xảy ra sau 1-2 năm khi vật chủ chết (Woo, 2006).

### **2.3.4 Sự phân bố và các cơ quan cảm nhiễm**

#### **2.3.4.1 Phân bố**

Vi bào tử trùng Microsporidia có phổ loài cảm nhiễm rất rộng trong môi trường nước ngọt, lợ, mặn và được ghi nhận ký sinh trên nhiều cơ quan của cá. Nghiên cứu của Matthews và Matthews (1980) đã tìm thấy bào nang của loài

*Tetramicra brevifilum* gây bệnh trên cá bon *Scophthalmus maximus* Đại Tây Dương ở Anh. Tỷ lệ chết chiếm 10% đối với giai đoạn cá 1 năm tuổi. Ngoài ra, loài vi bào tử trùng này cũng gây bệnh trên cá bon ở Tây Bắc thuộc Tây Ban Nha, tỷ lệ chết 11,5% và làm giảm quá trình tăng trưởng ở các cá thể còn sống. Khi cường độ cảm nhiễm cao, có thể nhìn thấy các bào nang có dạng hình cầu, đường kính 1 mm ký sinh ở dưới lớp da vùng cơ bụng, mô gan, thận, lá lách và mang cá.

Loài *Glugea cepedianae* (Hoffman và Dunbar, 1965) gây bệnh trên loài cá *Dorosoma cepedianum* nước ngọt ở Ohio, Mỹ. Ở giai đoạn cá giống, loài vi bào tử trùng *G. cepedianae* có thể nhiễm 65% làm cá chết nhiều (Canning và Lom, 1986). Bên cạnh đó, vi bào tử trùng *Glugea plecoglossi* thường gây ra dịch bệnh nguy hiểm trên loài cá *Plecoglossus altivelis* tại Nhật Bản. Sự phát triển của bào nang phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ môi trường nước. Tương tự như loài *Glugea anomala*, các bào nang có kích thước to cũng hình thành dưới lớp mô da, lòi ra bề mặt cơ thể hoặc ẩn trong cơ (Figueras *et al.*, 1992).

Các loài thuộc giống *Glugea*, *Tetramicra* và *Ichthyosporidium* gây bệnh khá phổ biến trên nhiều cơ quan nội tạng của cá, đặc biệt là ở những tế bào mô liên kết. Loài *G. anomala* (Moniez, 1887) là loài gây bệnh phổ biến nhất, bào nang thường được tìm thấy trên các loài cá *Gasterosteus aculeatus* và *Pungitius pungitius* và một số loài cá cảnh *Nothobranchius* sp., *Austrolebias* sp. ở châu Âu, châu Á, Bắc Mỹ. Bào nang thường có kích thước to, có thể nhìn thấy bào nang nằm dưới lớp mô da cá ở dạng lòi hoặc ẩn trong cơ cá hay trong các mô của cơ quan khác (Woo, 2006).

#### **2.3.4.2 Các cơ quan cảm nhiễm với vi bào tử trùng *Microsporidia***

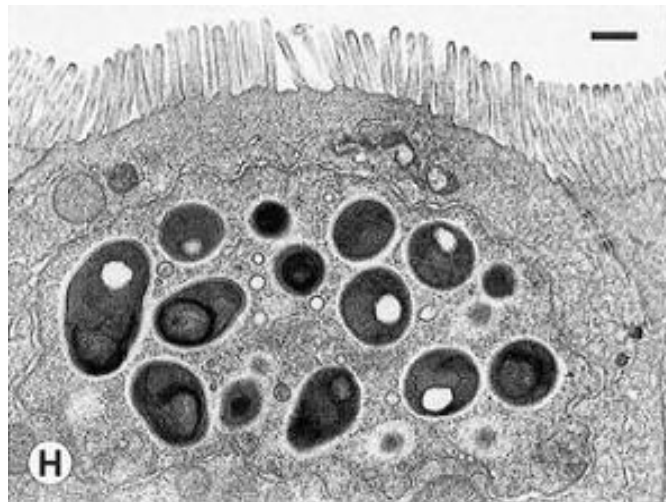
##### **a. Cảm nhiễm trong ruột**

Vi bào tử trùng *Glugea hertwigi* và *Glugea stephani* nhiễm trong ruột của cá và gây bệnh. Nghiên cứu cho biết phần ruột trước của cá bị nhiễm bệnh là phần bị ảnh hưởng nghiêm trọng nhất, thành ruột có thể bị phá hủy hoàn toàn dẫn đến nhiễm trùng và có thể làm hao hụt quần đàn. Hơn nữa, nghiên cứu cũng ghi nhận mức độ gây bệnh và độc lực của 2 loài ký sinh trùng này phụ thuộc



vào mùa vụ. Tỷ lệ chết của cá rất cao vào cuối mùa xuân và giảm dần trong các mùa khác (Nepszy và Dechtiar, 1972).

Loài *Loma acerinae* (Jirovec, 1930) là một trong những loài hình thành bào nang nhỏ, gây bệnh trong ruột của loài cá *Gymnocephalus cernuus* ở Trung Âu. Loài *L. acerinae* thường tấn công các mô liên kết ở ruột. Tuy nhiên, chúng chỉ gây ra thay đổi bệnh lý nhẹ trong hệ tiêu hóa (Lom và Pekkarinen, 1999). Tương tự, loài *Loma myrophis* nhiễm trong ruột giữa của loài cá *Myrophis platyrhynchus* (Azevedo và Matos, 2002) trên sông Amazon. Kế tiếp, Lom và Dykova (2002) ghi nhận loài *Nucleospora secunda* lây nhiễm trong nhân của tế bào ruột cá cảnh *Nothobranchius rubripinnis* (Hình 2.4).



**Hình 2.4:** Bào tử *N. secunda* phát triển trong nhân tế bào ruột của loài cá *N. Rubripinis* (nguồn: Lom và Dykova, 2002)

#### **b. Cắm nhiễm trong gan**

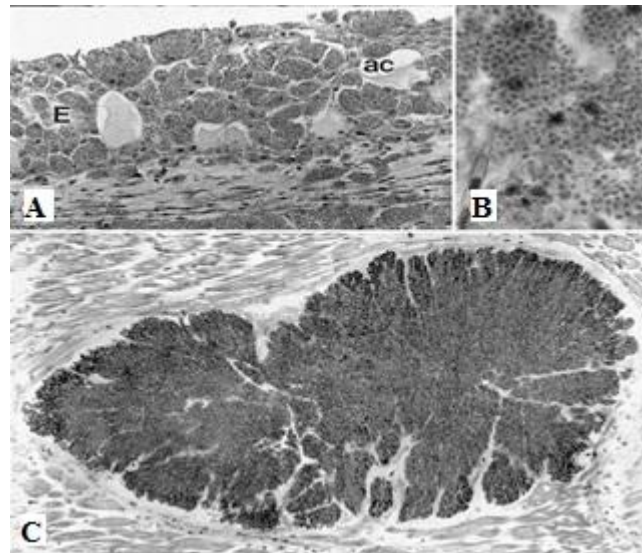
Năm 1977, nghiên cứu của Sprague ghi nhận loài *Glugea machari* (Jirovec, 1934) gây bệnh nghiêm trọng trong gan của loài cá *Dentex dentex* ở Adriatic. Các bào nang có kích thước lớn, khoảng 4 mm và thường xuất hiện gần các mạch máu trong gan.

Loài vi bào tử trùng *Microgemma ovoidea* (Thelohan, 1895) nhiễm trong gan của các loài cá da trơn *Motella tricirrata*, *Cepola rubescens* và *Mullus barbatus* ở Pháp (Amigo *et al.*, 1998). Kết quả nghiên cứu của Mansour *et al.* (2005) đã ghi nhận loài *Microgemma tincae* tấn công vào nhu mô gan, các bào

nang nằm lẫn trong mô gan của loài cá *Symphodus tinca* ở Châu Âu. Loài *M. tincae* gây bệnh với tỷ lệ nhiễm khá cao (72%) trong quần thể cá. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Woo (2006) cũng đã ghi nhận khả năng lây nhiễm của Microsporidia trong các nhu mô gan. Tiêu biểu và phổ biến nhất là các loài thuộc giống *Glugea*, *Microgemma*, *Microsporidium* thường ký sinh trên các loài cá biển.

### c. *Cảm nhiễm trong cơ*

Các loài vi bào tử trùng Microsporidia thường lây nhiễm trong các mô cơ của cá thuộc giống *Pleistophora*, *Heterosporis*, *Kabatana* và *Microsporidium*. Loài *Pleistophora macrozoarcidis* lây nhiễm với tỉ lệ nhiễm từ 70-80% trong cơ của loài cá *Macrozoarces americanus* ở phía tây bắc Đại Tây Dương. Tỉ lệ nhiễm thường tăng theo tuổi và kích cỡ của cá. Các bào nang thường ký sinh trong cơ dọc theo cơ quan đường bên của cá (Sheehy *et al.*, 1974).



**Hình 2.5:** Loài *K. arthuri* ký sinh trong cơ của loài cá *P. sutchi*

A: Các đại thực bào chứa đầy bào tử trong sợi cơ. Các đại thực bào trong lớp biểu bì (E); B: Các bào tử chứa các đại thực bào; C: Mặt cắt dọc cơ bụng với khối lượng lớn bào tử *K. arthuri* (nguồn: Lom và Dykova, 2000)

Loài vi bào tử trùng *Kabatana arthuri* xâm nhiễm trong các cơ vân của cá da trơn *Pangasius sutchi* ở Thái Lan. Bên cạnh đó, loài *Heterosporis anguillarum* (Hoshina, 1951) cũng được phân lập từ cá chình *Anguilla japonica* ở Nhật Bản và Đài Loan. *H. anguillarum* được xem là tác nhân gây bệnh nghiêm

trọng cho nghề nuôi cá chình. Các biểu hiện lâm sàng thường thấy là các dấu hiệu dị tật trên cơ thể và những điểm màu trắng dưới da cá (Hình 2.5) (Lom và Dykova, 2000).

Loài *Kabatana takedai* (Awakura, 1974) là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng cho nghề nuôi cá tại Nhật Bản và các loài cá biển Đại Tây Dương. Chúng được phân lập từ tám loài cá hồi ở Nhật Bản. Tỷ lệ nhiễm có thể lên đến 100% đối với loài cá *Oncorhynchus mykiss* và *O. gorbuscha*, tỷ lệ nhiễm từ 86-93% ở loài cá *Oncorhynchus masou*, *Oncorhynchus keta* và *Salvelinus leucomaenis*. Kết quả nghiên cứu cũng ghi nhận sự lây nhiễm phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ môi trường. Vi bào tử trùng phát triển tốt ở 18°C và ngừng phát triển ở 8°C (Lom *et al.*, 2001; Barber *et al.*, 2009).

#### **d. Cảm nhiễm trong mang**

Các loài vi bào tử trùng thuộc giống *Loma* thường ký sinh trên mang của cá. Hình thái của *Loma* rất giống nhau nên khó phân biệt. Morrison và Sprague (1981) đã phân lập được loài *Loma branchialis* (Nemeczek, 1911) từ loài cá *Gadus aeglefinus* và các loài cá khác ở Bắc Đại Tây Dương. Tỷ lệ cảm nhiễm dao động từ 10-60%. Bào nang màu trắng đục, kích thước khoảng 0,5 mm ký sinh trên các sợi tơ mang ở phiến mang thứ cấp của cá. Các bào nang này làm biến dạng các sợi mang, làm vỡ các mạch máu trên các cung mang, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến cá thể nhiễm bệnh (Woo, 2006). Kết quả nghiên cứu của Sanchez *et al.* (2001) cũng phân lập được loài *L. salmonae* gây bệnh khá phổ biến ở các loài cá hồi nuôi và cá hồi tự nhiên (*Oncorhynchus nerka*, *O. Mykiss* và *O. masou*) khắp Bắc Mỹ và Nhật Bản.

#### **e. Cảm nhiễm trong các cơ quan khác**

Vi bào tử trùng *Microsporidia* còn nhiễm ở một số cơ quan nội tạng khác của cá. Theo kết quả nghiên cứu trên loài cá ngựa *Danio rerio* của Matthews *et al.*, (2001), loài *Pseudoloma neurophilia* ký sinh trong hệ thống thần kinh trung ương của cá. Một số giống *Ovipleistophora* và *Microsporidium* được phân lập từ cơ quan sinh dục của cá. Hầu hết các giống này thường gây bệnh trên buồng trứng của cá. Loài *Nucleospora secunda* không chỉ lây nhiễm tế bào ruột cá

cảnh *Nothobranchius rubripinnis* mà còn lây nhiễm trong các tế bào máu, các bạch cầu và tế bào lympho trong thận, tỳ tạng của cá hồi *Oncorhynchus tshawytscha*, phía Tây Bắc Hoa Kỳ. Chúng cũng là tác nhân gây nhiễm trùng cơ quan tạo máu ở loài cá hồi *O. mykiss* ở Anh, Columbia, Canada và Pháp (Lom và Dykova, 2002). Loài *Ovipleistophora mirandellae* ký sinh và gây bệnh trên thận của các loài cá *Abramis bjoerkna*, *Abramis brama*, *B. Barbus*, *Leuciscus leuciscus*, *Rutilus rutilus* và cá chép ở châu Âu (Lom và Dykova, 2002). Loài *N. salmonis* cũng được phân lập trên các loài cá *Cyclopterus lumpus* ở Canada. Loài này được phát hiện gây bệnh là lây nhiễm trong các tế bào lympho trong thận, tỳ tạng của cá. Biểu hiện của bệnh là sự xuất hiện của các chấm đỏ li ti trên thận và tỳ tạng (Freeman *et al.*, 2013).

### **2.3.5 Phương thức lan truyền vi bào tử *Microsporidia* vào mô vật chủ**

Các nghiên cứu sự tương tác giữa *Microsporidia* với tế bào của vật chủ đã được thực hiện phổ biến trên nhiều loài cá nuôi lẫn cá tự nhiên. Kết quả ban đầu đã ghi nhận mối quan hệ tương tác giữa ký chủ cá và *Microsporidia* trong trường hợp thí nghiệm gây cảm nhiễm (Dykova và Lom, 1980; Rodriguez-Tovar *et al.*, 2002, 2004; Franzen, 2005; Monagang *et al.*, 2009). Bào tử của các loài thuộc giống *Glugea* lây nhiễm sang các cá thể mới trong quần đàn thông qua đường miệng, chúng lây nhiễm sang các tế bào di trú như các đại thực bào và các mô bào. Tại đây, vi bào tử trùng làm biến đổi các tế bào chủ và gây ra sự phì đại tế bào, tạo thành một cấu trúc dạng bào nang. Các bào nang có kích thước lớn dần làm gián đoạn các quá trình vật lý của mô, dẫn đến viêm nhiễm và cuối cùng phá hủy tế bào mô và giải phóng bào tử trưởng thành (Dykova *et al.*, 1980; Canning *et al.*, 1982).

Để xâm nhiễm vào các tế bào chủ, vi bào tử trùng *Encephalitozoon hellem* sẽ phát triển một quy trình rất chặt chẽ và nhanh chóng phóng thích các bào tử nhỏ vào trong tế bào chủ chỉ trong thời gian 2 giây. Tuy nhiên, bào tử nảy mầm là một quá trình rất phức tạp và vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Đầu tiên, khi gặp tác nhân kích thích, bào tử sẽ phóng thích sợi cực xuyên qua màng tế bào chủ. Tiếp theo là sự phá hủy ngay lập tức vách ngăn của túi chứa bào tử, cùng

với quá trình tăng áp suất thẩm thấu do việc tăng kích thước của cực nang, ống cực được phóng thích vào trong tế bào chất của tế bào chủ và các bào tử nhỏ được phóng thích vào tế bào chất của tế bào chủ. Ống cực có thành dày và khá đàn hồi, các bào tử nhỏ được phóng thích vào tế bào chất của tế bào chủ và được bao bọc bởi một màng tế bào hình thành bào nang (Frixione *et al.*, 1992).

Loài *Glugea anomala* xâm nhập vào tế bào biểu mô của vật chủ qua da, đôi khi xảy ra trong khoang ruột. Khi đã phát triển thành khối tế bào khổng lồ (*xenomias*) chứa đầy các giai đoạn phát triển của bào tử, khối tế bào này nhô ra bên ngoài da và vây làm cản trở hoạt động bơi lội của cá, dẫn đến tiêu tốn nhiều năng lượng. Loài *G. anomala* chỉ có một ký chủ trong vòng đời, vì vậy dễ lây nhiễm đến vật chủ kế tiếp thì bào nang cần được phóng thích ra môi trường nước. Quá trình lây nhiễm sang ký chủ khác có thể xảy ra (1-2 năm) sau khi cá chết. Sự phát triển của vi bào tử trùng bên trong vật chủ phụ thuộc vào nhiều yếu tố môi trường, trong đó nhiệt độ môi trường nước có tác động lớn nhất (Lom và Dykova, 1992).

Tương tự, bào tử của các loài thuộc giống *Pleistophora* cũng được ghi nhận gây bệnh trong ruột nhưng phổ biến nhất vẫn là mô cơ của cá. Bào nang được hình thành trong cơ, các thể phân cắt đơn nhân được sản sinh trong túi bào tử. Hầu hết các loài thuộc giống *Pleistophora* có phương thức lan truyền bệnh theo chiều ngang. Tuy nhiên, một số loài như *P. mirandellae*, *P. oolytica*, *P. ovariae* và *P. sulci* được phát hiện ký sinh trong buồng trứng. Riêng loài *P. ovariae* có rất nhiều đặc tính biểu hiện sự lây truyền theo chiều dọc. Tuy nhiên, các cá thể thường có sức đề kháng cao đối với loài vi bào tử này. Chúng thường được tìm thấy trong buồng trứng và chiếm 6% trong phôi cá (Dunn và Smith, 2001).

Vi bào tử trùng Microsporidia có chu kỳ sống trực tiếp, gây bệnh trên cá và lan truyền bệnh theo chiều ngang khá phổ biến. Các loài thuộc giống *Glugea* và *Pleistophora* có những khác biệt đáng kể về hình thái và các biểu hiện bệnh lý, tuy nhiên chúng có những điểm tương đồng trong kiểu gen và khả năng lan truyền dịch bệnh trong quần thể cá nuôi. Vị trí và hình thái của bào nang thay

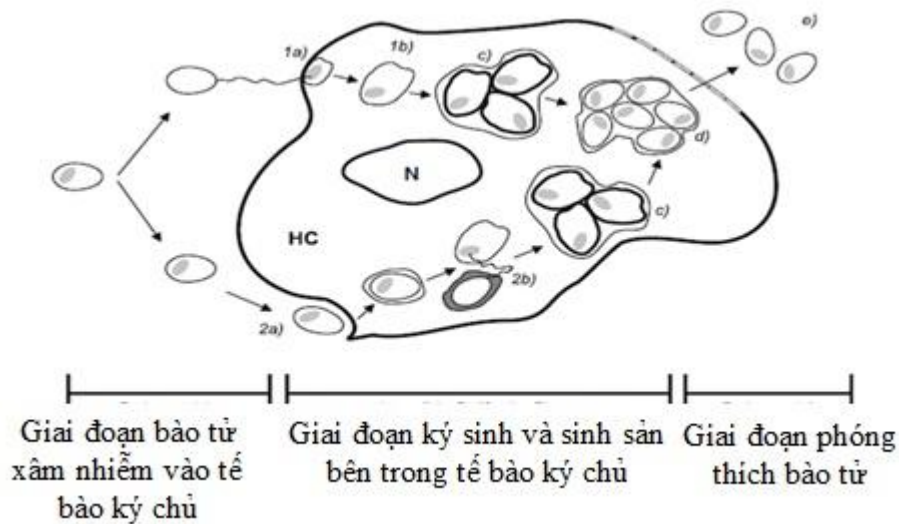
đổi tùy theo loài vi bào tử trùng. Bào nang thường hình thành đầu tiên ở các mô liên kết ruột và sau đó lây nhiễm đến các mô cơ, da và mang của cá. Phương thức lây nhiễm theo chiều ngang là phương thức phổ biến nhất của các loài thuộc giống *Glugea* sp. Tuy nhiên, phương thức lan truyền theo chiều dọc cũng đã có nhiều giả thuyết đề cập đến, điển hình là các loài *G. anomola*, *G. atherinae* và *G. hertwigi* đã được phát hiện trong buồng trứng của cá. Đặc tính này được xem như là một dạng gây bệnh mãn tính, bào nang thường phát triển chậm và cá có thể tồn tại trong nhiều năm (Dunn và Smith, 2001).

Nhiều công trình nghiên cứu khác đã chứng minh sự phát triển lây nhiễm của vi bào tử trùng Microsporidia trong các cá thể nhiễm bệnh và phụ thuộc rất nhiều vào các yếu tố môi trường, đặc biệt là nhiệt độ. Tiêu biểu là sự phát triển của *Glugea plecoglossi* diễn ra cực kỳ chậm ở nhiệt độ dưới 16°C và các thí nghiệm cảm nhiễm loài vi bào tử trùng *G. Stephani* không thành công khi nhiệt độ môi trường nước dưới 15°C. Loài *Microsporidium takedai* không phát triển ở nhiệt độ dưới 15°C, tuy nhiên chúng vẫn có khả năng lây nhiễm cho các cá thể khác trong đàn. Khi nhiệt độ được trên 15°C thì bào tử tiếp tục phát triển bình thường. Kết quả nghiên cứu trên cá hồi vân cũng ghi nhận sự lan truyền loài vi bào tử trùng này phụ thuộc vào nhiệt độ. Cá giống nhiễm *M. takedai* ở 18°C, khi chuyển sang môi trường có nhiệt độ thấp hơn 8°C thì khả năng lây nhiễm và bộc phát bệnh đã giảm đáng kể. Nghiên cứu cũng cho thấy tất cả các loài thuộc giống *Microsporidium* nhiễm trực tiếp qua đường miệng của cá (Andreadis và Vossbrinck, 2002; Lom và Nilsen, 2003).

Sự xâm nhập của Microsporidia vào tế bào vật chủ đã được nghiên cứu, phổ loài cảm nhiễm của chúng rất rộng. Bằng những thí nghiệm thực nghiệm, Monagan *et al.* (2009) cho biết có 2 cách thức để Microsporidia xâm nhập vào tế bào vật chủ:

**Cách thứ 1:** Bào tử trùng được phóng thích từ vùng mô nhiễm bệnh là dạng bào tử có khả năng đề kháng cao; (a) trong điều kiện thích hợp, ống cực của bào tử sẽ xuyên qua lớp đĩa neo ở phía trước bào tử và xâm nhập vào tế bào mới; (b) Bào tử trưởng thành bơm các bào tử nhỏ của chúng vào tế bào vật chủ

qua ống cực nhỏ; (c) Bên trong tế bào ký chủ các bào tử nhỏ phân chia để phát triển tạo thành dạng bào tử trưởng thành; (d) Trong thời gian tăng sinh để trở thành bào tử trưởng thành, một lớp vỏ dày được hình thành bao bọc giúp bào tử có khả năng đề kháng cao; (e) Bào tử trưởng thành đã gia tăng số lượng và phá vỡ màng tế bào vật chủ thoát ra ngoài và xâm nhiễm vào các tế bào chung quanh để tiếp tục một chu kỳ sinh sản mới (Hình 2.6).



**Hình 2.6: Phương thức lây nhiễm của Microsporidia vào tế bào ký chủ**  
(nguồn: Monagan et al., 2009)

**Cách thứ 2:** (a) Bào tử Microsporidia sẽ xâm nhập vào tế bào chủ thông qua khả năng thực bào của tế bào chủ. (b) Khi vào trong tế bào chủ, các vi bào tử bơm các bào tử nhỏ (sporoplasm) của chúng vào tế bào chất của tế bào chủ qua ống cực nhỏ. (c) Bên trong tế bào ký chủ các bào tử nhỏ phân chia để phát triển tạo thành dạng bào tử trưởng thành. (d) Trong thời gian tăng sinh để trở thành bào tử trưởng thành, một lớp vỏ dày được hình thành bao bọc giúp bào tử có khả năng đề kháng cao. (e) Bào tử trưởng thành đã gia tăng số lượng và phá vỡ màng tế bào vật chủ thoát ra ngoài và xâm nhiễm vào các tế bào xung quanh để tiếp tục một chu kỳ sinh sản mới.

Những nghiên cứu về sự truyền nhiễm đã chứng minh rằng tế bào máu vận chuyển thể phân cắt đơn nhân của bào tử trùng đến mang và cơ của cá. Bào nang phát triển trong các tế bào mang và cơ làm tế bào chủ trương to, bên trong chứa

đầy bào tử, cuối cùng bào nang vỡ ra dẫn đến viêm nhiễm nghiêm trọng, các bào tử tự do được tìm thấy trong các đại thực bào. Microsporidia là tác nhân lây nhiễm sớm nhất dẫn đến viêm mạch và gây ra các bệnh nghiêm trọng khác. Mặc khác, tác giả cho thấy sự lây nhiễm bào tử ban đầu còn xảy ra trong ruột giáp xác, sau đó bào nang được phát hiện trong cơ thể cá. Một vài giai đoạn tiền bào tử của ký sinh trùng được tìm thấy trong nội mô tim trước khi hình thành bào nang trong cá (Woo, 2006).

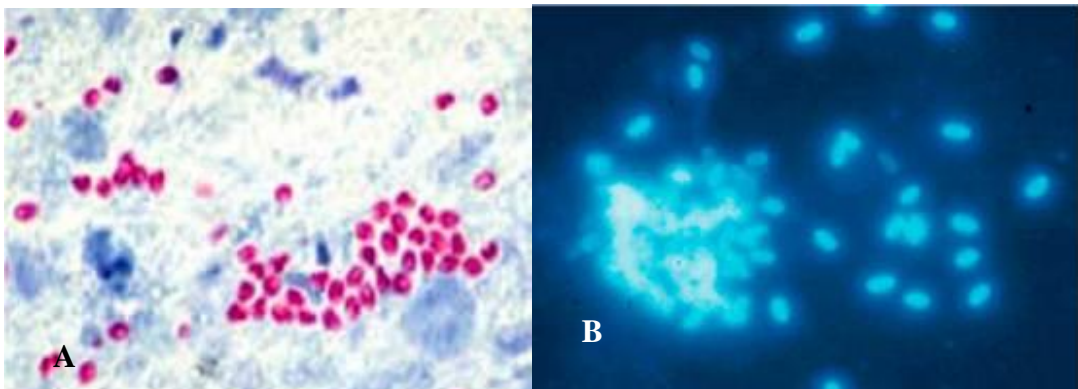
Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy vi bào tử trùng có tính đặc hữu rất cao khi ký sinh vào tế bào ký chủ. Mỗi loài vi bào tử trùng xâm nhiễm vào từng loại tế bào riêng biệt. Nguyên nhân có thể là do loại tế bào đó thích hợp cho sự phát triển của các bào tử hoặc có các yếu tố kích thích sự nảy mầm của bào tử. Tiêu biểu là loài *Scophthalmus lophii* chỉ phát triển trong các tế bào thần kinh, loài *Oncorhynchus mirandellae* chỉ phát triển trong tế bào trứng, loài *Pleistophora* sp. chỉ phát triển trong tế bào cơ. Ở một số loài thuộc giống *Loma* thì thường được tìm thấy trong các bạch cầu trung tính (Woo, 2006). Các loại tế bào chủ rất khó để nhận ra sau khi bị vi bào tử trùng xâm nhiễm và phát triển thành bào nang có kích thước rất lớn. Trong trường hợp vi bào tử trùng lây nhiễm và tạo thành các bào nang thì sự tiến triển của bệnh diễn ra nhanh hơn. Biểu hiện đầu tiên là sự phì đại nhanh chóng về kích thước của tế bào bị nhiễm và sau đó nhân tế bào chủ bị phân chia. Đối với trường hợp vi bào tử trùng lây nhiễm không tạo thành các bào nang thì biểu hiện của tế bào bệnh có sự thoái hóa về kích thước cũng như chức năng. Tuy nhiên, kết quả cuối cùng đối với các tế bào nhiễm bệnh là như nhau. Các tế bào chủ sẽ được thay thế bằng bào tử trưởng thành và cuối cùng tế bào chủ bị phá hủy hoàn toàn. Về khía cạnh mô học, cả hai trường hợp đều có những biểu hiện tổn thương như nhau, biểu hiện suy thoái tế bào như teo tế bào và hoại tử chiếm ưu thế trong giai đoạn cuối cùng. Mức độ thay đổi theo hướng suy thoái chức năng được ghi nhận có liên quan đến cường độ nhiễm. Khi thể tích của cơ quan hoặc mô giảm thì các chức năng quan trọng của các cơ quan hoặc mô này có thể bị suy giảm nghiêm trọng (Woo, 2006).



## 2.4 Các phương pháp phát hiện vi bào tử trùng *Microsporidia*

### 2.4.1 Nhuộm mẫu

Phương pháp nhuộm mẫu tươi được phát triển nhằm chẩn đoán nhanh các trường hợp nhiễm bệnh do vi bào tử trùng *Microsporidia* gây ra. Bởi vì các vi bào tử trùng có kích thước rất nhỏ nên khó xác định giống loài vi bào tử trùng nhiễm trong các mẫu tươi không nhuộm (mẫu không có màu sắc). Vì vậy, một số kỹ thuật nhuộm được phát triển để có thể nhận ra được các trường hợp nhiễm ngay trên mẫu phết tươi. Hai kỹ thuật nhuộm phổ biến nhất đó là nhuộm Weber's trichromic (Weber, 1994) và nhuộm Fluorochrome (Rooijen, và Nieuwmegen, 1978). Trong đó nhuộm Weber's trichromic thường được sử dụng phổ biến để xác định vi bào tử trùng. Trong phương pháp nhuộm này, các bào tử được nhận biết bởi dạng hình trứng màu hồng trong suốt và không bào bắt màu đậm hơn trên màu nền là màu xanh lam hay xanh lá tùy theo thuốc nhuộm nền là Fast Green, malachite green hay aniline blue (Hình 2.7A). Trong nhiều trường hợp, màu của thuốc nhuộm sẽ hấp thu mạnh ở các sợi cực, vì vậy có thể quan sát thấy các sợi cực xoắn rõ ràng hơn (Anane và Attouchi, 2010).



**Hình 2.7: (A) Mẫu bệnh phẩm nhuộm với Weber's trichromic (100x); (B) Mẫu bệnh phẩm nhuộm với Fluorochrome Uvitex 2B (100x)**  
(nguồn: Anane và Attouchi, 2010)

Đối với phương pháp nhuộm Fluorochrome, các thành phần chitin cấu trúc nên thành bào tử sẽ được đánh dấu huỳnh quang và nhận ra khi quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang, trong khi đó các bào tử bắt màu trắng hoặc màu xanh

ngọc. Các thuốc nhuộm huỳnh quang được sử dụng phổ biến là Calcofluor trắng M2R và Uvitex 2B (Hình 2.7B).

Bên cạnh đó, nghiên cứu về bệnh gạo trên các tra ở Đồng bằng Cửu Long của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011) ghi nhận nhiều trường hợp nhiễm Microsporidia và *Myxobolus* trong cơ cá tra thông qua phương pháp nhuộm Giemsa và nitrat bạc ( $\text{AgNO}_3$ ). Khi nhuộm tiêu bản mẫu bào nang bệnh gạo bằng thuốc nhuộm Giemsa và quan sát dưới kính hiển vi nhận thấy các bào tử bắt màu xanh của thuốc nhuộm ở phần cực nang. Khi nhuộm với thuốc nhuộm nitrat bạc các bào tử bắt màu nâu nhạt.

#### 2.4.2 Mô học

Nghiên cứu đặc điểm mô học trên cá da trơn *Pangasius sutchi* tại Thái Lan được thực hiện bởi Dykova và Lom (2000), nhằm khảo sát những biến đổi về cấu trúc của tế bào và các sợi cơ khi vi bào tử trùng xâm nhập và tạo bào nang trong cơ. Để mô tả vị trí và mức độ tổn thương của vi bào tử trùng trong mô, các mẫu cá (chiều dài 3,5 cm) sẽ được cố định trong dung dịch Davidson, sau đó xử lý với Histoplast-S. Phần mô học được nhuộm thường qui với haematoxylin và eosin (H-E), Trichrome và Giemsa. Kết quả cho thấy những thay đổi mô học do vi bào tử trùng *Kabatana arthuri* bên trong các vùng cơ lưng và cơ bụng của cá. Hầu hết các khối cơ bên chứa đầy các bào nang với hàng nghìn bào tử trưởng thành và tiền trưởng thành. Sự hoại tử được tìm thấy xung quanh vùng cơ bị nhiễm các bào nang của loài *K. arthuri*. Ngoài ra, hoạt động của các đại thực bào để cơ thể chống lại sự nhiễm trùng này cũng được ghi nhận. Sự viêm nhiễm xảy ra khắp các vùng cơ có chứa bào nang và các đại thực bào chứa đầy các bào tử của loài *K. arthuri* cũng được tìm thấy ở các cấu trúc mô và các cơ quan khác nhau (Dykova và Lom, 2000).

Các biểu hiện mô học của các cơ quan nhiễm Microsporidia là sự cô lập và loại bỏ các bào tử khỏi tế bào. Có hai biểu hiện chính là (1) vi bào tử trùng khu trú trong các bào nang hoặc (2) các bào tử lan tỏa khắp các khu vực trong mô khi mới bắt đầu nhiễm bệnh. Biểu hiện đầu tiên thường được ghi nhận ở các loài thuộc giống *Glugea* sp., bao gồm ba giai đoạn liên tiếp để cuối cùng hình

thành các bào nang phá hủy vùng mô nhiễm bệnh của ký chủ. Biểu hiện thứ hai được ghi nhận ở các loài thuộc giống *Pleistophora* sp. thường lây nhiễm ở mô cơ. Tuy nhiên, biểu hiện tổn thương các mô liên kết được ghi nhận là không nghiêm trọng (Woo, 2006).

Nghiên cứu bệnh gạo trên các tra ở ĐBSCL của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011) cũng ghi nhận các thay đổi cấu trúc mô học trên cơ cá tra. Các mẫu cơ cá tra nhiễm bào nang của Microsporidia cố định trong Formaline 10%. Sau đó tiến hành rửa mẫu dưới vòi nước trong thời gian 5 phút, chuyển mẫu sang dung dịch ethanol 70% cho đến khi phân tích mô học. Mẫu được cắt với độ dày từ 5-7  $\mu\text{m}$  và xử lý qua các giai đoạn: loại nước, làm trong mẫu và tẩm paraffin. Sau đó mẫu được đúc khối, cắt và dán lên lame rồi nhuộm Haematoxylin và Eosin. Kết quả phân tích mô bệnh học ghi nhận được hình dạng bào nang và bên trong là vùng cơ đã bị hoại tử, ngoài bào nang có một lớp màng mỏng mô liên kết để bao bọc những bào tử. Những thay đổi chính về mô học gây ra bởi Microsporidia được tìm thấy ở cơ bên, cơ lưng, cơ bụng. Hầu hết các khối cơ bên bị che kín bởi các bào tử. Những thay đổi nghiêm trọng về cấu trúc trong mô cơ đi kèm với sự nhân lên của Microsporidia và sự lây nhiễm chiếm ưu thế trong các mẫu quan sát trên kính hiển vi. Thêm vào đó sự thay đổi về cấu trúc của những sợi cơ đặc trưng làm hoại tử vùng cơ, cấu trúc này được quan sát ở tất cả các giai đoạn phát triển cũng như ở ngoại vi thay vào đó tập hợp các bào tử khổng lồ và tổng thể này lớn nhanh và tăng kích thước.

#### **2.4.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Nhóm vi bào tử trùng Microsporidia là nhóm sinh vật đơn bào, hầu hết là hình trứng với kích thước rất nhỏ, dao động từ 1-40  $\mu\text{m}$ . Trong cùng 1 loài, cấu tạo của bào tử có xu hướng ổn định, tuy nhiên trong từng giai đoạn của chu kỳ sống, chúng sẽ tạo ra các dạng bào tử khác nhau. Vì vậy, những phương pháp nhận dạng, phân loại định danh dựa vào các kỹ thuật kính hiển vi, mô bệnh học thường rất khó xác định và độ chính xác thấp. Với bước tiến của công nghệ sinh học hiện nay thì kỹ thuật PCR có vai trò rất quan trọng trong việc chẩn đoán và

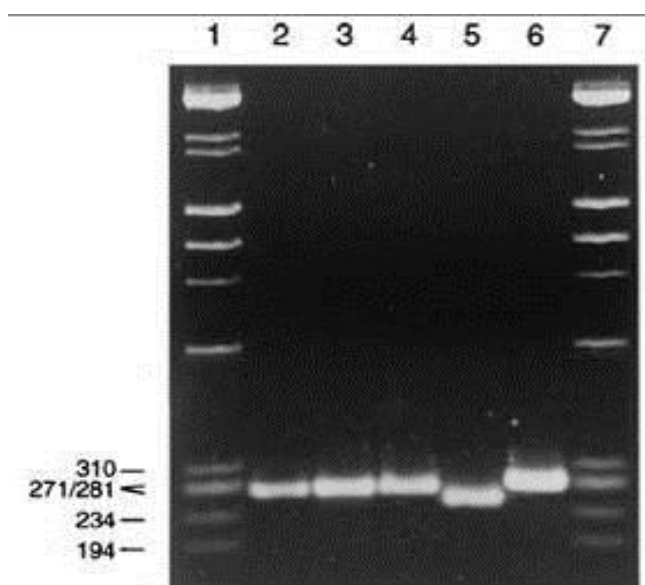
định danh nhanh, chính xác các loài Microsporidia gây bệnh trên các đối tượng thủy sản có giá trị kinh tế.

Kết quả PCR có thể phát hiện sớm vi bào tử trùng Microsporidia trong các mẫu bệnh. Một cặp môi duy nhất bổ sung cho trình tự của rRNA tiểu đơn vị nhỏ cho phép khuếch đại DNA từ bốn tác nhân gây bệnh Microsporidia là: *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozoon bieneusi* và *Septata intestinalis*. Phản ứng sử dụng hai môi có trình tự: PMP2 (5'-CCTCTCCGGAACCAAACCCTG-3') và PMP2b (5'-CCTCTCCGGAATCAAACCCCG-3') (Fedorko *et al.*, 1995).

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng 2,5 ml của DNA với bộ kit GenAmp (Perkin-Elmer Cetus, USA) và máy PCR Perkin-Elmer 9600 thermocycler. Phản ứng PCR được thực hiện trong 35 chu kỳ nhiệt với các khoảng nhiệt độ như sau: 94°C trong 30s, 60°C trong 30s, 72°C trong 30s và 72°C trong 10 phút cho sự bắt cặp của môi. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng phương pháp điện di trên gel agarose và thuốc nhuộm ethidium bromide. Kết quả đã xác định 4 tác nhân Microsporidia trên được phát hiện bằng vạch DNA với trọng lượng phân tử từ 271-281 bp. Cụ thể là *E. bieneusi*: 250 bp, *E. cuniculi*: 268 bp, *S. intestinalis*: 270 bp và *E. hellem*: 279 bp (Hình 2.8).

Nghiên cứu của Pomport-Castillon *et al.* (2000) cũng sử dụng kỹ thuật PCR, sau đó giải trình tự gen để nhận biết và so sánh kiểu gen của 3 loài *Glugea anomala*, *G. stephani*, *G. americanus* và loài *Spraguea lophii*. Phản ứng PCR được thực hiện với 2 môi xuôi và ngược có trình tự là 5'-GGTTG-ATTCTGCCTGACGT-3' và 5' GACGGGCGGTGTGTACAAAG- 3' hoặc 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'. Phản ứng PCR được thực hiện trong 30 chu kỳ nhiệt với các khoảng nhiệt độ gồm: 94°C trong 1 phút, 55°C trong 1,5 phút và 72°C trong 2 phút, sử dụng enzym *Taq* polymerase. Kết quả giải trình tự gen cho thấy 3 loài *G. Anomala* (1.165bp), *G. Stephani* (1.165bp), *G. Americanus* (1.174bp) có những trình tự gen gần như tương đồng với nhau và cũng tương đồng với loài *Spraguea lophii*. Từ kết nghiên cứu tác giả cho rằng thực tế 3 loài

*Glugea* chỉ là 1 loài duy nhất và cũng có thể hỗ trợ cho việc phân loại các loài *Glugea* spp. thuộc giống *Spraguea*.



**Hình 2.8: Kết quả điện di sản phẩm PCR (nguồn: Fedorko et al., 1995)**

Giếng: 1 và 7, thang trọng lượng phân tử *HaeIII* *fX174* (Bethesda Research Laboratories); 2: *E. cuniculi* từ mẫu tinh sạch; 3: *S. intestinalis* từ mẫu tinh sạch; 4: *S. intestinalis* từ mẫu tươi; 5: *E. bieneusi* từ mẫu tươi; 6: *E. hellem* từ mẫu tinh sạch

Nghiên cứu của Mansour *et al.* (2005) sử dụng quy trình PCR và giải trình tự gen SSU-rDNA để phát hiện và định danh loài vi bào tử trùng *Microgemma tincae*, *Tetramicra brevifilum* gây bệnh trên loài cá *Symphodus tinca*. Nghiên cứu đã sử dụng hai đoạn mồi là SF4m (5' CACCAGGTTGATYCTGCCTRD 3') và SR1147m (5' TGTRGTRAICYTCCGYCAATY 3'). Kết quả tác nhân *M. tincae*, *T. brevifilum* trên được phát hiện và định danh với tỷ lệ chính xác trên 90%.

Nghiên cứu của Abdel-Ghaffar *et al.* (2011) thực hiện trên 103 mẫu cá *Saurida tumbil* nhiễm Microsporidia. Phân tích phân tử dựa trên trình tự gen của tiểu đơn vị nhỏ rDNA đã được thực hiện để xác định vị trí phát sinh loài của các loài *Pleistophora*. Kết quả so sánh cho thấy 8 loài *Pleistophora* có mức độ tương đồng trong kiểu gen trên 92%. So sánh các trình tự nucleotide cho thấy các trình tự của *Microsporidium* tương tự như của *Pleistophora anguillarum* (nhận dạng đến 99,8%). Vì vậy, các loài *Microsporidium* hiện nay được ghi nhận và phân loại như là một loài mới của giống *Pleistophora*.

## **2.5 Kỹ thuật nuôi cấy vi bào tử trùng Microsporidia**

### **2.5.1 Những nguyên lý trong kỹ thuật nuôi cấy tế bào**

Nếu đặt câu hỏi: “Công cụ nghiên cứu nào đóng vai trò quan trọng trong phòng thí nghiệm? thì có thể dễ dàng tìm thấy câu trả lời từ những nhà nghiên cứu sinh học, y học và công nghệ sinh học là nghiên cứu tế bào và nuôi cấy tế bào là vấn đề quan trọng hầu như không thể thiếu trong các nghiên cứu chuyên sâu. Thật sự không thể kể hết thành công của tế bào và kỹ thuật nuôi cấy tế bào trong nghiên cứu y sinh công nghệ sinh học ngày nay. Những kỹ thuật nuôi tế bào động vật đã được phát triển nhanh chóng và hiệu quả cho các nghiên cứu chuyên sâu trên cả người và động vật.

Tế bào động vật tách từ mô có thể được nuôi cấy trên các loại môi trường dinh dưỡng tổng hợp bên ngoài cơ thể, chúng sẽ sinh trưởng bằng cách tăng số lượng và kích thước tế bào. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật đã tạo cơ hội cho nghiên cứu về đặc điểm bệnh học của các bệnh do ký sinh trùng, virus, kháng nguyên, kháng thể được tiến hành một cách tối ưu nhất. Ngoài ra, chúng còn giúp phát triển các mô hình thực nghiệm để khảo sát tác động của hóa chất, xác định sự tương hợp của mô trong nuôi cấy ghép và nghiên cứu các tế bào đặc biệt cùng sự tương tác của chúng (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).

Các tế bào động vật là tế bào nhân thực (eukaryote), chúng được liên kết với nhau bởi các nguyên liệu gian bào để tạo thành mô. Mô động vật thường được phân chia theo 4 nhóm là biểu mô (epithelium), mô liên kết (connectivetissue), mô cơ (muscle) và mô thần kinh (nerve). Hầu hết các tế bào động vật bình thường là các tế bào dính bám, vì thế chúng cần có bề mặt để gắn vào và sinh trưởng. Trong các ứng dụng người ta sử dụng rộng rãi các loại tế bào dính bám là tế bào biểu mô và nguyên bào sợi (fibroblast). Các tế bào dính bám cần có một bề mặt ẩm để sinh trưởng như là thủy tinh hoặc plastic. Dụng cụ trong phòng thí nghiệm như đĩa petri hoặc các chai trực lẫn thường được sử dụng rộng rãi nhất (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006). Nhiều nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào để nuôi nhóm ký sinh trùng Microsporidia trong môi trường nhân tạo đã thành công. Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy quá trình nuôi vi bào tử

trùng cần phải có tế bào sống của động vật trong môi trường nhân tạo để làm ký chủ cho chúng ký sinh và phát triển (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).

### 2.5.2 Môi trường nuôi cấy

Vấn đề quan trọng nhất trong nuôi cấy tế bào động vật là môi trường nuôi cấy. Môi trường này phải có đủ chất dinh dưỡng, nhân tố sinh trưởng, độ pH và nồng độ muối ổn định, đồng thời phải có hệ thống thải bỏ các sản phẩm trao đổi chất độc hại để tế bào có thể sống và phát triển được. Nhu cầu dinh dưỡng của các tế bào động vật lớn hơn vi sinh vật, tế bào động vật không trao đổi chất nitrogen vô cơ như vi sinh vật. Vì vậy, amino acid và vitamin cần phải được bổ sung rất nhiều vào môi trường. Môi trường đặc trưng dùng trong nuôi cấy tế bào động vật bao gồm các amino acid, vitamin, hormone, nhân tố sinh trưởng, muối khoáng và glucose. Ngoài ra, môi trường cần được cung cấp từ 2-20% (theo thể tích) huyết tương của động vật có vú. Mặc dù huyết thanh có thành phần chưa được xác định đầy đủ, nhưng nhiều nghiên cứu đã cho thấy nó rất cần thiết cho sự phát triển và tồn tại của tế bào trong nuôi cấy (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).

Để tế bào có thể sống và phát triển thì môi trường nuôi cấy cần có các thành phần như sau:

- **Môi trường hóa chất:** được sáng chế từ những năm 1950 đã thay thế hoàn toàn cho các dịch sinh học như dịch chiết từ phôi gà, huyết tương... Môi trường hóa chất được điều chế hàng loạt, cất giữ được lâu, dễ thay thế, thêm hoặc bớt các chất cần thiết và ít bị lây nhiễm... Môi trường nuôi cấy có chứa đủ các chất dinh dưỡng như Cacbonhydrat, acid amin, vitamin, nguyên tố vi lượng, hormon, nhân tố sinh trưởng. Hiện nay, người ta dùng một số môi trường nuôi cấy như môi trường Eagle, môi trường Dulbecco (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).
- **Các nhân tố sinh trưởng:** nếu không có nhân tố sinh trưởng thì tế bào động vật sẽ không phát triển. Người ta thường phải bổ sung huyết thanh bê (10-15%) vào môi trường nuôi cấy vì trong huyết thanh có chứa nhân tố sinh trưởng. Tuy nhiên, dùng huyết thanh vừa đắt tiền lại vừa dễ bị nhiễm khuẩn cho nên hiện nay người ta thường dùng các chất bổ trợ như

insulin, transferin, ethanolamin... hoặc sử dụng lớp tế bào nuôi để thay thế cho huyết thanh (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).

- **Các chất kháng sinh:** penicillin, streptomycin hoặc amphotericin B thường được bổ sung vào môi trường nhân tạo nhằm chống nhiễm khuẩn cho mẻ cấy. Tuy nhiên, các chất kháng sinh thường độc hại nên phải dùng với liều lượng thích hợp và phải kết hợp với quy trình tiệt trùng tốt (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).

### 2.5.3 Các phương thức nuôi cấy

Trong môi trường nuôi cấy nhân tạo, các tế bào tự do thường ở dạng huyền phù, còn tế bào mô thường bám vào đáy bình thành từng lớp. Người ta sử dụng buồng đếm hoặc máy đếm tự động để tính toán số lượng tế bào theo từng giai đoạn phát triển. Phương thức nuôi cấy đơn giản nhất là nuôi cấy theo mẻ (batch culture), trong đó tế bào được nuôi vài ngày cho tới khi sinh trưởng thì dừng lại. Đây là hệ thống nuôi cấy khép kín, vì trong quá trình nuôi không cho thêm bất kỳ chất khác vào và cũng không thải sản phẩm trao đổi chất ra ngoài môi trường. Ở điều kiện chuẩn thì mật độ tế bào trong môi trường là  $10^5/\text{cm}^3$ , nuôi trong 3 ngày cho tới khi mật độ tế bào đạt  $10^6/\text{cm}^3$ . Quá trình nuôi cấy cần phải khuấy lắc đều để huyền phù tế bào và chất dinh dưỡng được phân bố đều trong môi trường. Tuy nhiên, môi trường sẽ nghèo dần chất dinh dưỡng và tích lũy nhiều chất độc (sản phẩm chuyển hóa của tế bào) do đó tế bào sẽ bị thoái hóa và chết. Người ta có thể kéo dài thời gian nuôi cấy bằng cách bổ sung thêm chất dinh dưỡng vào môi trường nuôi cấy theo thời gian để tế bào tiếp tục tăng sinh, nhưng đến một thời gian nhất định, sinh trưởng sẽ dừng lại vì môi trường đã tích lũy quá nhiều chất độc như amoniac hay lactat (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).

Để giải quyết vấn đề trên người ta tiến hành phương thức nuôi cấy liên tục (continuous culture), trong đó môi trường luôn được đổi mới làm các chất độc luôn được loại bỏ. Có hai cách nuôi cấy liên tục: (1) dùng hệ thống tiếp liệu chất dinh dưỡng nhưng vẫn duy trì tế bào trong mẻ cấy cho đến khi số lượng tế bào đạt  $10^7/\text{cm}^3$  hoặc (2) đồng thời có thêm hệ thống rút bớt môi trường cùng với tế bào ra khỏi mẻ cấy, như vậy hệ số tăng trưởng tế bào sẽ tỷ lệ với hệ số đổi mới



dòng chảy vào và chảy ra ngoài. Một hệ cân bằng như vậy được gọi là hệ ổn định (chemostat), một dạng nuôi cấy liên tục để nuôi cấy liên tục (Nguyễn Hoàng Lộc, 2006).

#### **2.5.4 Các nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi vi bào tử trùng**

Việc nuôi cấy tế bào động vật được dùng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu quá trình phát triển của Microsporidia trên côn trùng, động vật có vú và cá đã được công bố phổ biến. Nghiên cứu phát triển hệ thống nuôi cấy dòng tế bào biểu mô của cá chình để xác định khả năng gây bệnh và tác động của loài vi bào tử trùng *Heterosporia anguillarum* lên tế bào vật chủ (Kou *et al.*, 1995). Tế bào dòng EP-1 (tế bào biểu mô) được phát triển và nuôi cấy 12 ngày trước khi cho cảm nhiễm liên tục vi bào tử của *H. anguillarum*. Kết quả cho thấy sau 220 lần cho nhiễm liên tục với bào tử của *H. anguillarum*, các tế bào dòng EP-1 vẫn không bị hủy hoại và vẫn phát triển bình thường. Tuy nhiên, khi các tế bào này được cho nhiễm ở lần thứ 240 và sau đó cấy vào cá chình khỏe thì chúng bắt đầu bị nhiễm bệnh trên các lớp mô cơ. Điều này chứng tỏ cơ chế gây bệnh của nhóm vi bào tử trùng rất phức tạp.

Ngoài ra, có thể sử dụng hệ thống nuôi cấy tế bào bạch cầu của cá hồi Thái Bình Dương để chứng minh khả năng gây bệnh và độc lực cao của loài vi bào tử *Nucleospora salmonis*. Theo kết quả nghiên cứu, các chất chiết dùng trong tiêm chủng (inocula) được nuôi dưỡng vẫn có thể gây bệnh với các dấu hiệu bệnh lý giống như dịch bệnh trên cá hồi Thái Bình Dương ngoài tự nhiên. Các tế bào bạch cầu được nuôi cấy nhân tạo và cho cảm nhiễm với vi bào tử *N. salmonis* đã được lưu giữ trong nitơ lỏng -70°C. Các bào tử này vẫn có khả năng xâm nhập và phá hủy tế bào bạch cầu của cá hồi. Điều này cho thấy Microsporidia có khả năng chịu đựng cao với môi trường bất lợi và khả năng gây bệnh trên nhiều loài cá khác nhau, gây tổn thất nghiêm trọng cho nghề nuôi (Wongtavatchai *et al.*, 1995).

Các phương pháp nuôi cấy sơ cấp và ngắn hạn cũng được sử dụng để nghiên cứu sự tương tác của bào tử với các tế bào của hệ thống miễn dịch bẩm sinh là đại thực bào và bạch cầu trung tính. Các mẻ nuôi cấy thường được sử

dụng trong vòng 48 giờ và tập trung nghiên cứu khả năng phá vỡ của đại thực bào. Nghiên cứu của Kim *et al.* (1999) đã sử dụng phương pháp này để nuôi cấy và nghiên cứu khả năng thực bào của đại thực bào thận cá hương (*Plecoglossus altivelis*) đối với bào tử *Glugea plecoglossi* thông qua nghiên cứu phản ứng A-reactive glycoproteins trên bề mặt của bào tử này. Kết quả cho thấy loài *G. plecoglossi* đã ức chế sản xuất ion  $O^-$  của đại thực bào của cá hương (*Plecoglossus altivelis*) bởi sự kích thích với zymosan.

Nghiên cứu của Shaw *et al.* (2001), thực hiện nuôi cấy đại thực bào của cá hồi Thái Bình Dương và cá hồi Đại Tây Dương để so sánh khả năng thực bào của loài vi bào tử trùng *Loma salmonae*. Kết quả của nghiên cứu cho thấy khả năng thực bào của đại thực bào ở các hồi Đại Tây Dương cao hơn loài cá hồi Thái Bình Dương. Từ cơ sở tế bào học cho thấy sức đề kháng của cá hồi Đại Tây Dương với vi bào tử trùng Microsporidia cao hơn sức đề kháng của cá hồi Thái Bình Dương.

Thành công nhất có thể kể đến là hệ thống nuôi tế bào bạch cầu trên cá hồi (salmonid) để phục vụ cho các nghiên cứu loài vi bào tử *Nucleospora salmonis*. Đặc biệt, hệ thống cũng có thể hỗ trợ sự phát triển của tác nhân lây nhiễm trên động vật có vú *Enterocytozoon bienusi*. Ngoài ra, các nhà khoa học đã đạt được một số thành công nhất định trong nuôi cấy loài *Pseudoloma neurophilia* trên các dòng tế bào của một số loài cá khác nhau. Các dòng tế bào cá chình EP-1 cũng được phát triển thành công để phục vụ cho các nghiên cứu bệnh học của loài *Heterosporis anguillarum*. Những phương pháp tiếp cận nuôi cấy tế bào có thể nâng cao tầm hiểu biết của khoa học về việc phòng trị Microsporidia trên cá (Monagang *et al.*, 2009).

Tiếp theo, Monagang *et al.* (2010) đã phát triển hệ thống nuôi cấy tế bào thận và tuyến sinh dục của thỏ để nghiên cứu sự phát triển và xâm nhập của loài *Anncaliia algerae*. Các dòng tế bào được nuôi trong môi trường Grace's Insect Culture Medium (HyClone) với 2 mM L-Glutamine; 500 mg/L Calcium Chloride; 2,800 mg/L Potassium Chloride; 3,330 mg/L Lactalbumin Hydrolysate; 3,330 mg/L Yeastolate và 10% FBS (10% heat-inactivated fetal

bovine serum). Quá trình nuôi cấy có bổ sung thêm penicillin/streptomycin với nồng độ là 100 IU/ml. Kết quả thử nghiệm cho thấy *A. algerae* có khả năng xâm nhiễm và gây bệnh đối với các dòng tế bào của cá vàng và một số loài cá nước ngọt khác.

## 2.6 Một số nghiên cứu thử nghiệm điều trị vi bào tử trùng Microsporidia

### 2.6.1 Ảnh hưởng của hóa chất đến vi bào tử trùng Microsporidia

Nhiều nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các loại hóa chất lên vi bào tử trùng gây bệnh trên cá. Một số nhóm hóa chất đang được sử dụng phổ biến được trình bày trong Bảng 2.2.

**Bảng 2.2: Một số loại hóa chất và nồng độ thường được sử dụng tiêu diệt vi bào tử trùng**

Nhóm hóa chất	Hóa chất	Nồng độ	Vi bào tử trùng	Nguồn tham khảo
Ion dương	Chlorhexidine Benzalkonium chloride	0,005%	<i>A. polyphagacysts</i>	Thomas, 2013
		0,1%	<i>E. cuniculi</i>	Waller, 1980
		0,2%	<i>E. intestinalis</i>	Santillana-Hayat <i>et al.</i> , 2002
Halogen	Chlorine	1 ppm	<i>E. intestinalis</i>	John <i>et al.</i> , 2005
		2,5 ppm	<i>E. cuniculi</i> , <i>E. hellem</i>	Johnson <i>et al.</i> , 2003
Oxy hóa	Chlorine dioxide	4,1 mg/ml	<i>E. intestinalis</i>	Ortega <i>et al.</i> , 2008
Aldehyde	Formalin	15 mg/ml	<i>Nosema bombycis</i>	Zhengyoung <i>et al.</i> , 2010
		62 ppm	<i>Glugea</i> sp.	Iglesias <i>et al.</i> , 2002
Rượu	Ethanol	1%	<i>E. cuniculi</i>	Waller, 1980
		70%	<i>E. intestinalis</i>	Santillana-Hayat <i>et al.</i> , 2002
			<i>G. stephani</i>	Li and Fayer, 2006

#### 2.6.1.1 Nhóm ion dương

Trong nhóm hợp chất này còn có các hóa chất Amoni bậc bốn (QACs), điển hình nhất là Benzalkonium Chloride (BKC) cũng được sử dụng rộng rãi như là chất tiêu diệt vi sinh vật bề mặt có hiệu quả cao. Hoạt động của Benzalkonium Chloride phụ thuộc vào độ pH của môi trường (thích hợp nhất là pH từ 4-7). Ngoài ra, nhiệt độ cao và thời gian tiếp xúc càng dài càng gia tăng hiệu quả của hoạt chất này. Đối với Microsporidia, một số nghiên cứu đã ghi nhận tính hiệu quả của hoạt chất này trong môi trường thí nghiệm. Điển hình là,

BKC ở nồng độ 0,1% có hiệu quả tiêu diệt vi bào tử trùng *E. cuniculi* lên đến 80% trong thời gian 30 phút. Ngoài ra, khi thử nghiệm cảm nhiễm thực tế với loại thuốc thương mại Brolene chứa 0,01% BKC, hoạt chất này cũng cho những kết quả tương tự (Waller, 1980). Từ đó cho thấy BKC có hiệu quả tiêu diệt vi bào tử trùng. Mặc khác, kết quả nghiên cứu khác cho thấy BKC với nồng độ  $5 \times 10^{-5}\%$  không có khả năng gây ức chế các bào tử của *E. cuniculi*. Bằng chứng là các bào tử vẫn tồn tại đến 75% sau khi tiếp xúc trong thời gian 30 phút trong môi trường ống nghiệm. Dù vậy, hoạt chất này lại cho hiệu quả khả quan hơn khi kết hợp cùng với fumagillin, thiabendazole, oxibendazole hoặc albendazole với nồng độ tương tự ( $5 \times 10^{-5}\%$ ). Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt chất này có hiệu quả khác nhau trên các loài vi bào tử trùng khác nhau và phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ của hóa chất (Franssen *et al.*, 1995).

Hiệu quả tương tự của BKC trong quá trình thử nghiệm với vi bào tử trùng *Encephalitozoon intestinalis*. Ở liều lượng 0,2%, BKC đã tiêu diệt đến 100% các bào tử sau 30 phút (Santillana-Hayat *et al.*, 2002). Tương tự, Ortega *et al.* (2007) tiến hành thử nghiệm nhiều loại hóa chất khác nhau lên vi bào tử trùng gây bệnh. Kết quả ghi nhận khả năng tiêu diệt loài vi bào tử trùng *Enterocytozoon bieneusi* và *Encephalitozoon intestinalis* của hoạt chất amoni bậc bốn này. Liều lượng thử nghiệm của hoạt chất này cao hơn so với nghiên cứu trước đây. Với liều từ 200-400 ppm, BKC đã ức chế hoàn toàn bào tử trong thời gian từ 5-15 phút.

Hợp chất ion dương chlorhexidine có hiệu quả tiêu diệt một số mầm bệnh ký sinh trùng tạo bào nang như Acanthamoeba và Microsporidia. Với nồng độ thấp từ 0,005-0,006%, hợp chất này đã diệt mầm bệnh đang ở giai đoạn động bào tử rất hiệu quả. Đối với giai đoạn bào nang, do màng cellulose dày, các hợp chất thuộc nhóm QACs không thể tác động phá hủy tế bào nhưng chlorhexidine cho hiệu quả tác động rất tốt. Tuy nhiên, hiệu quả của chất này còn phụ thuộc vào cách phối trộn theo từng công thức khác nhau. Do đó nhiều trường hợp điều trị hiệu quả không giống nhau (Thomas, 2013).

Loài *A. polyphagacysts* vẫn có thể tồn tại khi tiếp xúc với chlorhexidine trong 2 ngày (Penley *et al.*, 1989). Trong khi đó Silvany *et al.* (1990) cho rằng hợp chất chứa chlorhexidine vẫn có thể tác động phá hủy tế bào loài ký sinh trùng này ngay cả trong thời gian tiếp xúc ngắn (5-10 giờ). Những khác biệt này có thể là sự khác nhau trong công thức. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận công thức phối hợp giữa chlorhexidine 0,005% với thimerosal 0,001% (một hợp chất Organomercury) hoặc Ethylenediamine axit Tetraacetic (EDTA) 0,1% cho hiệu quả điều trị với các bào nang (Thomas, 2013).

Ngoài ra, hợp chất Polyhexamethylene Biguanid (PHMB) cũng được ghi nhận điều trị bệnh có hiệu quả do các loài ký sinh trùng tạo bào nang *Acanthamoeba* và *Microsporidia* gây ra. Tuy nhiên, công thức kết hợp giữa Polyhexamethylene Biguanid nồng độ thấp (0,00005%) và Amoni bậc bốn Polyquaternium-1 (0,055-0,001%) cho kết quả điều trị khả quan hơn với các loại hóa chất khác trong cùng nhóm (Thomas, 2013).

#### **2.6.1.2 Nhóm Halogen**

Đối với hợp chất halogen, nhiều nghiên cứu ghi nhận chlorine cho hiệu quả tiêu diệt vi sinh vật rất tốt. Kết quả khảo sát cho thấy tất cả các nồng độ chlorine đều cho hiệu quả tác động tiêu diệt bào tử trùng. Ở nồng độ 2 ppm, chlorine cho hiệu quả tiêu diệt nhanh và thích hợp nhất, ức chế bào tử *E. intestinalis* lên đến 99,9% trong 16 phút tiếp xúc với chlorine (Worlk *et al.*, 2000).

Kết quả khảo sát hiệu quả tác động của chlorine lên 3 loài vi bào tử trùng *E. cuniculi*, *E. hellem* và *E. intestinalis* cho thấy chlorine có thể kiểm soát các bào tử trong môi trường nước. Kết quả đếm số lượng bào tử tồn tại trước và sau khi tiếp xúc với chlorine cho thấy số lượng các bào tử tồn tại khá cao (50-90%) sau khi tiếp xúc với chlorine 2,5 ppm trong 4 phút. Sau 5 phút, các bào tử của cả 3 loài đã giảm đáng kể, chỉ còn khoảng 20-40%. Sau 8 phút tiếp xúc với chlorine ở nồng độ 2,5 ppm thì các bào tử đã bị tiêu diệt hoàn toàn (Johnson *et al.*, 2003).

Kết quả ghi nhận tác động phá hủy các bào tử *E. intestinalis* của Chlorine ở nồng độ 1ppm trong điều kiện pH = 6 là 99%. Khi pH càng tăng cao thì hiệu quả tiêu diệt bào tử của chlorine càng giảm và ở pH = 8 tỷ lệ tiêu diệt bào tử *E. intestinalis* chỉ còn 68,8%. Các nghiên cứu ghi nhận giá trị nồng độ Chlorine rất khác nhau phụ thuộc vào loài và giá trị pH của môi trường (John *et al.*, 2005).

Nghiên cứu của Ferguson *et al.* (2007) đã xác định nồng độ chlorine ở 5 ppm tiêu diệt 100% bào tử của loài *E. cuniculi*. Tuy nhiên, đối với 2 loài vi bào tử trùng *Pseudoloma neurophilia* và *Glugea anomala* được phân lập từ trứng của cá vằn (*Danio rerio*) thì giá trị nồng độ chlorine ở mức rất cao, từ 100-150 ppm mới có thể tiêu diệt trên 95% bào tử của 2 loài này. Có thể nói quá trình khử trùng trứng của loài cá cảnh với nồng độ chlorine thấp trong thời gian dài tạo điều kiện gia tăng sức đề kháng cho các bào tử *P. neurophilia* và *G. anomala*. Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận phác đồ điều trị lặp lại sau 5-7 ngày với chlorine nồng độ 100 ppm và điều chỉnh pH = 7 sẽ cho hiệu quả tiêu diệt hơn 99%.

Ngoài ra, kích thước của các bào tử động *Acanthamoeba* đã giảm đáng kể khi tiếp xúc với 5 mg/ml chlorine và có hơn 90% các tế bào bị hoại tử. Quan sát mẫu dưới kính hiển vi điện tử cho thấy các tế bào này xảy ra sự ngưng tụ và mất dần các bào quan (ty thể, nhân). Liều lượng chlorine khoảng 1-7 ppm có thể diệt hiệu quả các nhóm ký sinh trùng tạo bào nang trong 5-30 phút (Mogoa *et al.*, 2010).

Với hóa chất iodine, những ứng dụng trong việc tiêu diệt vi bào tử trùng rất hạn chế. Nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng iodine có thể ức chế sự tăng trưởng của các bào tử trùng, đối với các bào nang thì tác động rất hạn chế; nồng độ ức chế tối thiểu 50% dao động từ 90-370 ppm iodine đơn chất hoặc từ 60-195 ppm iodine hợp chất. Iodine là một chất khử trùng hiệu quả cho hầu hết các tác nhân gây bệnh và đã được áp dụng rộng rãi trong ngành nuôi trồng thủy sản. Việc điều trị bằng iodine với nồng độ 100-200 ppm trong 25 phút có thể ngăn chặn sự xâm nhiễm của vi bào tử trùng *Loma salmonae* cho cá hồi Thái Bình Dương (*O. tshawytscha* Walbaum), tỉ lệ nhiễm giảm đến 90%. Tuy nhiên,

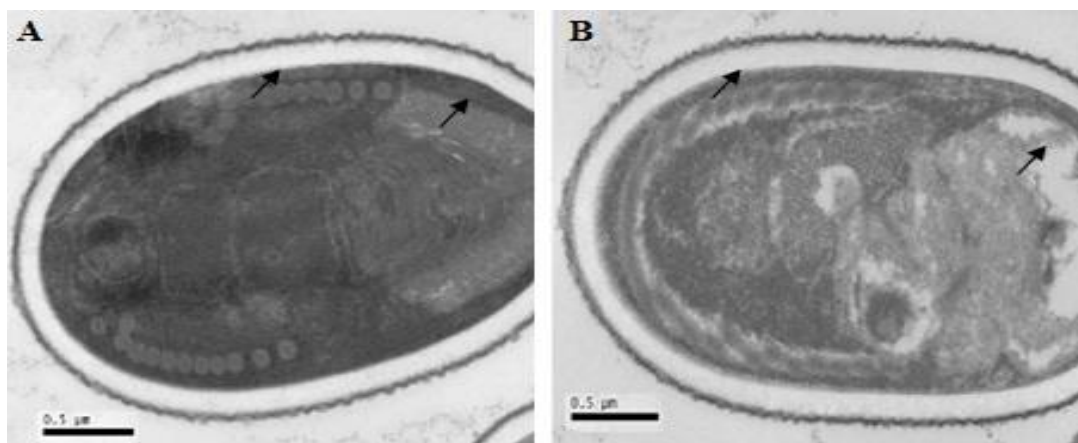
một số bào tử vẫn còn tồn tại ngay cả khi nồng độ cao, từ đó có thể xâm nhiễm trở lại và bộc phát bệnh. Độc tính của iodine khá cao ( $LC_{50}=30$  mg/kg), thay đổi theo loài, pH môi trường và giai đoạn phát triển của cá thể (Athanasopoulou *et al.*, 2009).

### 2.6.1.3 Nhóm hợp chất oxy hóa

Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy hợp chất Chlorine dioxide ( $ClO_2$ ) có khả năng làm bất hoạt virus, vi khuẩn, nấm và Microsporidia (Lu *et al.*, 1992; Foschino *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; Zhengyong *et al.*, 2010).

Điển hình là nghiên cứu của Ortega *et al.* (2008), ghi nhận khả năng diệt vi bào tử trùng hữu hiệu của  $ClO_2$ . Nghiên cứu được thực hiện trên loài vi bào tử trùng *Encephalitozoon intestinalis* phân lập từ trong đất và nước. Kết quả cho thấy điều trị với nồng độ 4,1 mg/ml,  $ClO_2$  đã tiêu diệt hoàn toàn bào tử trong thời gian 20 phút. Những biến đổi trong cấu trúc của vi bào tử trùng được ghi nhận gồm sự phá hủy cấu trúc của sợi cực, cực nang và các không bào. Ngoài ra, lớp màng của bào tử đã bị phá hủy cấu trúc dẫn đến sự hoại tử của các bào quan bên trong.

Chlorine dioxide ( $ClO_2$ ) là một chất khử trùng có phổ diệt trùng rất rộng và được ứng dụng nhiều trong thực tiễn. Hợp chất này tác dụng nhanh và hiệu quả hơn các chất khử trùng khác. Ngoài ra,  $ClO_2$  còn có chức năng khử mùi, tẩy trắng, diệt tảo, sát trùng, diệt virus, bảo quản và tẩy màu. Nghiên cứu của Zhengyong *et al.* (2010) khảo sát ảnh hưởng của  $ClO_2$  lên vi bào tử trùng *Nosema bombycis*. Nồng độ của  $ClO_2$  sử dụng là 5, 10 và 15 mg/ml. Các kết quả ghi nhận cho thấy ở nồng độ 15 mg/ml,  $ClO_2$  cho hiệu quả tiêu diệt các bào tử tốt nhất (100%) trong thời gian 30 phút. Ngoài ra, kết quả quan sát dưới kính hiển vi điện tử cho thấy tác động của  $ClO_2$  lên cấu trúc của bào tử *N. bombycis*. Theo đó, một loạt các thay đổi sinh học quan trọng được ghi nhận như một số lượng lớn các bào quan của bào tử bị phá hủy bao gồm Protein, DNA, Polysaccharide,  $K^+$ , và  $Ca^{2+}$  trong một thời gian ngắn. Ngoài ra, quá trình tổng hợp lipid của bào tử bị gián đoạn và hoạt động của enzym ATPase bị ức chế, dẫn đến phá hủy cấu trúc bên trong của các bào tử *N. bombycis*.



**Hình 2.9: Cấu trúc của bào tử *N. bombycis* (A): bào tử *N. bombycis* sau khi xử lý với chlorine dioxide 15 mg/ml; (B): cấu trúc của các sợi cực và không bào bị phá hủy hoàn toàn (nguồn: Zhengyoung *et al.*, 2010)**

Một số kết quả nghiên cứu khác cho thấy  $\text{ClO}_2$  có hiệu quả cao, độc tính thấp và an toàn cho môi trường. Vì vậy,  $\text{ClO}_2$  có khả năng thay thế cho các chất khử trùng mạnh, có tính ăn mòn và gây độc như formaldehyde, clo hữu cơ hoặc clo vô cơ (Chen *et al.*, 2002; Thomas, 2013).

Bên cạnh đó, hydrogen peroxide (oxy già), một hoạt chất khác trong nhóm hóa chất này cũng được sử dụng diệt vi bào tử trùng hiệu quả. Theo Waller (1980), kết quả khảo sát tác dụng của 11 loại hóa chất lên bào tử của vi bào tử trùng *E. cunicul* đã có 9 loại có hiệu quả tiêu diệt hoàn toàn các bào tử. Trong đó, với nồng độ 1%, oxy già tiêu diệt hoàn toàn (100%) bào tử *E. cuniculi* trong thời gian 30 phút.

Nghiên cứu của Ortega *et al.* (2007) chứng minh tác dụng của oxy già tiêu diệt bào tử của vi bào tử trùng. Nghiên cứu tiến hành thử nghiệm trên bào tử *E. intestinalis* được nuôi bằng dòng tế bào RK-23 đối với 4 loại hóa chất trong thời gian 1, 5 và 15 phút. Kết quả cho thấy oxy già có nồng độ và thời gian tiêu diệt vi bào tử trùng hiệu quả nhất ở 0,5% trong thời gian 1 phút.

Chế phẩm thương mại của axit peracetic có tên là Tsunami được thử nghiệm khảo sát tính nhạy của vi bào tử trùng này. Sau 5-15 phút, toàn bộ bào tử *E. intestinalis* đã bị tiêu diệt ở nồng độ 40 µg/ml. Ngoài ra, trong nhóm chất

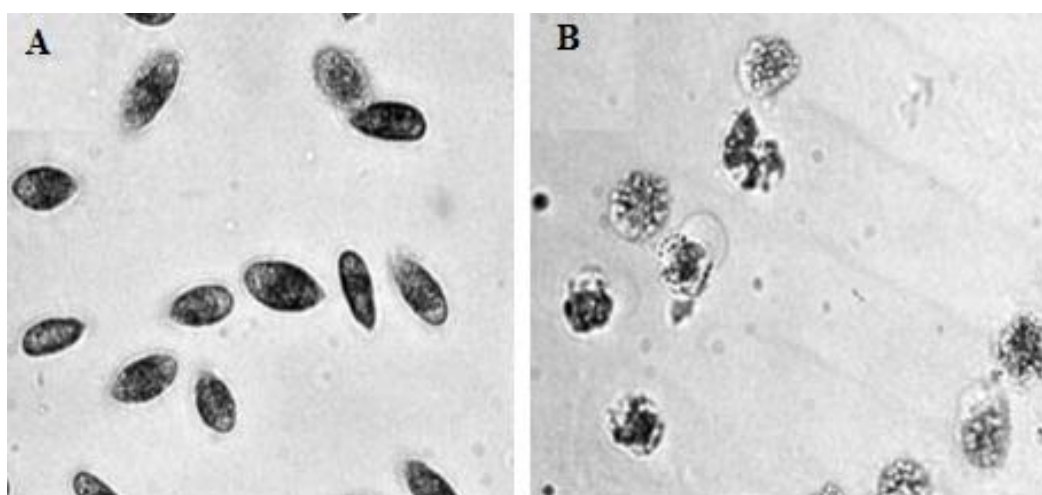


oxy hóa còn có axit Peracetic (PAA), đây là hoạt chất đã được chứng minh có khả năng diệt vi sinh vật nhanh chóng, phổ tác dụng rộng ở nồng độ thấp. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của axit Peracetic trên nhiều loài bào tử trùng thuộc giống *Acanthamoeba* sp. và *Cryptosporidium* sp. với nồng độ 0,2-5% trong thời gian 10-30 phút (Ortega *et al.*, 2007; Thomas, 2013).

Thông qua các kết quả của nhiều nghiên cứu trước đây, có thể thấy nhóm chất oxy hóa đã chứng minh được hiệu quả và tính an toàn trong việc tiêu diệt mầm bệnh do Microsporidia gây ra trong thủy sản nói riêng và ngành chăn nuôi nói chung.

#### 2.6.1.4 Nhóm hợp chất aldehyde

Những nghiên cứu về tác dụng của formalin đối với vi bào tử trùng Microsporidia còn khá hạn chế. Nghiên cứu của Waller (1980), khảo sát ảnh hưởng của 11 hóa chất khác nhau lên bào tử của vi bào tử trùng *E. cuniculi*. Hai nghiệm thức formalin 1% và 0,3% được thử nghiệm tiếp xúc với dung dịch bào tử *E. cuniculi* trong 30 phút. Sau thời gian thử nghiệm, dung dịch bào tử được ly trích và quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả quan sát dung dịch này cho thấy các bào tử *E. cuniculi* đã bị phá hủy hoàn toàn (100%).



**Hình 2.10: Cấu trúc của bào tử *Glugea* sp. (A) Bào tử *Glugea* sp. sau khi xử lý với formalin 62 ppm; (B) các sợi cực và không bào bị phá hủy hoàn toàn (nguồn: Iglesias *et al.*, 2002)**

Formalin được khảo sát ở các nồng độ 250, 125, 62, 31, 16, 8, 4 và 2 ppm trong dung dịch chứa bào tử của loài *Glugea* sp. phân lập từ cá chêm (*Dicentrarchus labrax*). Các kết quả cho thấy nồng độ tiêu diệt thấp nhất của formalin trong các thí nghiệm là 62 ppm sau 2 giờ cảm nhiễm. Kết quả quan sát bào tử trên kính hiển vi cho thấy formalin làm biến đổi tế bào chất, các không bào co lại và vỡ ra dẫn đến tế bào bị phá hủy (Hình 2.10) (Iglesias *et al.*, 2002).

Một nghiên cứu khác ghi nhận formalin điều trị bệnh do vi bào tử trùng bằng phương pháp tắm với nồng độ khá cao. Theo Athanassopoulou *et al.* (2009), trong nhiều loại hóa chất thường dùng điều trị vi bào tử trùng trên cá thì formalin được ứng dụng rộng rãi nhất bằng phương pháp tắm. Đối với trường hợp cần diệt vi bào tử trùng và các nhóm ngoại ký sinh gây bệnh trong môi trường nước thì formalin được khuyến cáo sử dụng ở nồng độ 200 ppm trong 1 giờ để phòng bệnh trước khi thả giống. Nghiên cứu này cũng ghi nhận độc lực của formalin sẽ gia tăng theo sự gia tăng của nhiệt độ. Ngoài ra, cần thận trọng sử dụng trên cá hồi vì formalin khá độc đối với cá hồi.

#### **2.6.1.5 Nhóm hợp chất rượu**

Ảnh hưởng của ethanol lên vi bào tử trùng *E. intestinalis* đã được chứng minh tính hiệu quả. Sau 5 phút tiếp xúc với ethanol 70%, dung dịch bào tử *E. intestinalis* được ly trích và quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả ghi nhận bào tử có hiện tượng thoái hóa và vỡ màng tế bào, các nội bào bị phân hủy cho đến khi bào tử bị tiêu diệt (Santillana-Hayat *et al.*, 2002).

Thử nghiệm tác dụng của ethanol 70% đối với các loài vi bào trùng *E. intestinalis* và 3 loài khác là *E. cuniculi*, *E. hellem* và *Glugea stephani*. Dung dịch bào tử mật độ  $15 \times 10^4$  bào tử/ml được ủ với dung dịch ethanol 70% trong thời gian 5, 10, 20 phút ở 22°C. Kết quả cho thấy mức độ ảnh hưởng khác nhau của ethanol lên các loài vi bào tử trùng khác nhau. Theo đó, bào tử của hai loài *E. cuniculi*, *E. intestinalis* và *G. stephani* đã bị phá hủy hoàn toàn sau 5 phút thử nghiệm. Riêng bào tử của loài *E. hellem* sau 20 phút thử nghiệm mới có thể tiêu diệt hoàn toàn (Li và Fayer, 2006).

Ngoài ra ethanol được thử nghiệm tiếp xúc với dung dịch bào tử *E. cuniculi* trong 10 phút ở 4°C. Sau đó, các bào tử được ly trích và cho cảm nhiễm với dòng tế bào thận thỏ. Kết quả thí nghiệm cho thấy ethanol đã tiêu diệt hoàn toàn (100%) vi bào tử trùng, các tế bào thận thỏ không bị tấn công và xâm nhiễm bởi loài vi bào tử trùng *E. cuniculi* (Jordan *et al.*, 2006).

Tóm lại: Qua những thông tin khảo sát từ các nghiên cứu cho thấy hóa chất được sử dụng khá rộng rãi và hiệu quả trong quá trình tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh trong thủy sản. Với liều lượng thích hợp tùy theo từng loại hóa chất, từng loài gây bệnh mà nồng độ và thời gian tác dụng hiệu quả của hóa chất sẽ khác nhau. Sử dụng đúng liều lượng và thời gian đã mang đến khả năng tiêu diệt vi bào tử trùng gây bệnh trên cá hữu hiệu nhất, góp phần phòng và điều trị bệnh do vi bào tử trùng hiệu quả.

### **2.6.2 Các nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc kháng ký sinh trùng đến vi bào tử Microsporidia**

Bên cạnh các nghiên cứu sử dụng hóa chất phòng trị vi bào tử trùng thì cũng có nhiều nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các loại thuốc lên vi bào tử trùng Microsporidia.

Nghiên cứu *in vivo* thử nghiệm các loại thuốc khác nhau để điều trị bệnh do nhóm vi bào tử trùng gây ra. Loài vi bào tử trùng *Encephalitozoon cuniculi* gây bệnh khá phổ biến được thực hiện cảm nhiễm vào tế bào thận thỏ RK-13. Tế bào thận thỏ và bào tử trùng *E. cuniculi* được chuẩn bị trong phòng thí nghiệm và được nuôi giữ trong môi trường nuôi cấy mô M199 có muối. Thí nghiệm cảm nhiễm *E. cuniculi* với mật độ là 2,5 bào tử/1 tế bào thận. Các loại thuốc điều trị được sử dụng với các nồng độ từ 1-5 mg/ml. Môi trường nuôi cấy được thay mới 3 lần/tuần. Kết quả nồng độ ức chế 50% của các loại thuốc đã được xác định (Bảng 2.3) (Franssen *et al.*, 1995).

Kết quả ghi nhận ở các nghiệm thức điều trị với fumagillin, thiabendazole, albendazole, oxibendazole và propamidine isethionat thì không có bào tử nào hình thành sau 3 tuần điều trị tại nồng độ 5 mg/ml. Tuy nhiên, ở những nghiệm thức cho nhiễm *E. cuniculi* trước 8 ngày vào tế bào rồi sau đó mới điều trị thuốc

thì cho kết quả ngược lại. Kết quả phân tích cho thấy thuốc không có tác dụng tiêu diệt hoàn toàn *E. cuniculi* và không thể ngăn chặn sự hình thành bào tử trong các nghiệm thức. Vì vậy, 5 loại thuốc gồm itraconazole, toltrazuril, metronidazole, ronidazole, và ganciclovir không có hiệu quả trong điều trị.

**Bảng 2.3: Nồng độ ức chế 50% của các loại thuốc với *E. Cuniculi* (nguồn: Franssen et al., 1995)**

Thuốc	IC50 (µg/ml)
Fumagillin	0,00086 ± 0,00015
Itraconazole	> 5
Ronidazole	> 5
Metronidazole	> 5
Toltrazuril	> 5
Thiabendazole	0,30 ± 0,04
Albendazole	0,0044 ± 0,0008
Oxibendazole	0,0015 ± 0,00015
Ganciclovir	> 5
Propamidine isethionate	± 5

Tương tự, nghiên cứu thực hiện thử nghiệm điều trị vi bào tử *Glugea anomala* trên cá gai (*Gasterosteus aculeatus*), sử dụng một dẫn xuất của triazine có tên là HOE 092V. Cá được điều trị bằng phương pháp ngâm ở các nồng độ thuốc 2,5; 5 và 10 mg/ml lần lượt trong 2; 3; 4 giờ ở 22°C. Kết quả thí nghiệm cho thấy ở nồng độ 2,5 mg/ml, thuốc phá hủy phần lớn các tế bào giai đoạn meronts, sporogon và sporoblasts. Ở nồng độ 5 mg/ml trong 3 giờ thì các tế bào giai đoạn meronts và sporogon đã không còn hiện diện, ngoại trừ các bào tử trưởng thành vẫn còn tồn tại với số lượng thấp. Ở nồng độ cao 10 mg/ml trong 4 giờ, tế bào ở các giai đoạn bị phá hủy hoàn toàn. Tuy nhiên, bào tử trưởng thành còn tồn tại với số lượng thấp vẫn không bị ảnh hưởng. Kết quả cho thấy có thể sử dụng HOE 092V thành công bằng phương pháp ngâm để điều trị vi bào tử *Glugea anomala* ở các giai đoạn bào tử mới hình thành (Schmahl và Senaud, 1996).

Tiếp theo đó là nghiên cứu thử nghiệm *in vitro* tác dụng của thuốc albendazole, fumagillin và TNP-470 đối với 2 loài *Encephalitozoon intestinalis*

và *Vittaforma corneae* (Didier, 1997). Tương tự như nghiên cứu trên dòng tế thận thỏ RK-13 đã xác định giá trị MIC<sub>50</sub> của các thuốc điều trị *E. intestinalis* và *V. corneae* (Bảng 2.4).

**Bảng 2.4: Giá trị MIC của 3 loại thuốc với *E. intestinalis* và *V. corneae* (nguồn: Franssen *et al.*, 1995; Didier, 1997)**

Thuốc	MIC <sub>50</sub> (ng/ml)	
	<i>E. intestinalis</i>	<i>V. corneae</i>
Albendazole	8,0 ± 4,23	55,0 ± 7,07
Fumagillin	0,515 ± 0,002	0,81 ± 0,014
TNP-470	0,35 ± 0,212	0,375 ± 0,106

Bảng kết quả cho thấy albendazole và fumagillin có giá trị MIC<sub>50</sub> đối với *V. corneae* cao hơn đáng kể so với *E. intestinalis*. Không có sự khác biệt ở giá trị MIC<sub>50</sub> của TNP-470 đối với *E. intestinalis* và *V. corneae*. Từ những kết quả ghi nhận, nghiên cứu đưa đến kết luận TNP-470 có thể là một thuốc mới đầy hứa hẹn cho việc điều trị các *Microsporidia*. Do TNP-470 có tác dụng tiêu diệt cả hai loài *E. intestinalis* và *V. corneae* và TNP-470 đã được chứng minh là ít độc hại đối với cơ thể sinh vật nhất (Franssen *et al.*, 1995).

Nghiên cứu khác cũng cho thấy sự hiệu quả của albendazole trong điều trị bệnh do *Glugea anomala* nhiễm tự nhiên trên các loài cá gai (*Gasterosteidae* sp.). Khảo sát cho thấy trong các nghiệm thức điều trị các loại thuốc gồm fumagillin và albendazole thì nghiệm thức điều trị bằng albendazole qua phương pháp cho cá ăn có hiệu quả ức chế sự hình thành các tế bào khổng lồ (xenomas) của *G. anomala* (Schmahl và Benini, 1998).

Hiệu quả tác động của albendazole, albendazole-sulfoxide, albendazole-sulfone thuộc nhóm benzimidazoles đối với các loài *Encephalitozoon* spp. ở mức độ tế bào cũng được ghi nhận. Thí nghiệm khảo sát ở nhiều nồng độ thuốc khác nhau từ 10<sup>0</sup>-10<sup>-4</sup> µg/ml. Kết quả cho thấy hiệu quả của albendazole, albendazole-sulfoxide và albendazole-sulfone ức chế sự phát triển của *Encephalitozoon* spp. ở nồng độ >10<sup>-3</sup> µg/ml. Ở nồng độ <10<sup>-2</sup> µg/ml benzimidazoles có hiệu quả ức chế đối với loài *E. cuniculi* và *E. hellem* so với loài *E. intestinalis*. Kết quả mở ra một hướng mới trong việc điều trị có hiệu quả

bệnh do các loài thuộc nhóm Microsporidia gây ra trên cá nuôi (Ridoux và Drancourt, 1998).

Một nghiên cứu khác kiểm tra khả năng điều trị của 6 loại thuốc trên cá hồi vân nhiễm *Loma salmonae*. Sáu nghiệm thức thử tác dụng của 6 loại thuốc gồm fumagillin (liều cao), albendazole, amprolium, fumagillin (liều thấp), metronidazole và pyrimethamine+Sulphaquinoxaline. Kết quả cho thấy fumagillin (liều cao), pyrimethamine + sulphaquinoxaline, albendazole, amprolium và fumagillin (liều thấp) có tác dụng kiềm chế sự hình thành và phát triển các bào nang. Riêng loại thuốc metronidazole không có tác dụng ức chế các xenomas. Trong khi đó fumagillin (liều cao hoặc thấp) và albendazole đều làm giảm số lượng các bào nang đáng kể trong 10 tuần điều trị ( $p < 0,01$ ). Từ kết quả trên, nghiên cứu cho rằng cả hai loại thuốc fumagillin và albendazole có thể có giá trị tiềm năng trong việc kiểm soát *L. salmonae* gây bệnh trên cá hồi (Speare *et al.*, 1999).

### **2.6.3 Các nghiên cứu ảnh hưởng của thảo dược đến vi bào tử trùng Microsporidia**

Nhiều loại thảo dược đã được chứng minh có tác dụng ức chế sự phát triển và lây nhiễm của vi bào tử trùng. Tiêu biểu là Quinine hydrochloride, đây là một chất alkaloid tự nhiên được chiết xuất từ vỏ của cây Cinchona (tên tiếng việt), một loại cây ở vùng Nam Mỹ. Chất này được sử dụng phổ biến bởi các thổ dân da đỏ và được tổng hợp lần đầu tiên từ thế kỷ 17. Nghiên cứu cho thấy Quinine hydrochloride có những ảnh hưởng nhất định lên vi bào tử trùng gây bệnh trên cá. Kết quả thí nghiệm cho thấy ở nghiệm thức đối chứng có 90% mẫu cá bị nhiễm *L. salmonae*, trong khi đó ở nghiệm thức điều trị bằng quinine hydrochloride 61 mg/kg/ngày thì tỷ lệ nhiễm là 18,2% ở tuần thứ 6. Sau 8 tuần điều trị, 100% cá đối chứng có bào nang của *L. salmonae*, còn nghiệm thức điều trị thì chỉ có 57,5% cá có bào nang *L. salmonae*. Tuy nhiên, sau 10 tuần thì cá ở cả hai nghiệm thức đều nhiễm bào tử trùng. Từ kết quả khảo sát cho thấy quinine hydrochloride không tiêu diệt hoàn mà chỉ có tác dụng ức chế *L. salmonae* gây bệnh trên cá hồi (Speare *et al.*, 1998).

Resveratrol là một chất được nhiều loại cây trồng tiết ra có khả năng chống lại mầm bệnh của vi khuẩn và nấm. Phổ biến nhất là Resveratrol chứa trong vỏ của trái nho đỏ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả phòng và chữa bệnh của resveratrol. Tuy nhiên, cơ chế cụ thể của Resveratrol thì vẫn chưa được khám phá. Nghiên cứu gần đây cho thấy, tế bào biểu mô thận nhiễm bào tử *E. cuniculi* khi điều trị bằng Resveratrol nồng độ 10  $\mu\text{M}$  và 50  $\mu\text{M}$  trong 7 ngày cho các kết quả tích cực. Resveratrol ở nồng độ 10  $\mu\text{M}$  đã bảo vệ 35% tế bào chủ không bị xâm nhiễm. Ở nồng độ 50  $\mu\text{M}$ , khoảng 50% tế bào được bảo vệ chống lại sự xâm nhiễm của *E. cuniculi*. Ngoài ra, thí nghiệm cũng xác định ảnh hưởng của resveratrol lên tăng trưởng của bào tử *E. cuniculi*. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu 50% của Resveratrol có giá trị rất thấp (8,7  $\mu\text{M}$ ). Hơn nữa, nghiên cứu này cũng xác định Resveratrol không gây độc với tế bào chủ. Các kết quả ghi nhận cho thấy khả năng điều trị bệnh do vi bào tử trùng hiệu quả bằng thảo dược (Leiro *et al.*, 2004).

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của 2 loại thảo dược là Thymol và Resveratrol cũng đã chứng minh khả năng điều trị bệnh do vi bào tử trùng. Thymol là một dẫn xuất Phenol tự nhiên được chiết xuất từ tinh dầu cỏ xạ hương hoặc cây húng tây. Thymol có mùi thơm dễ chịu và tính chất sát trùng mạnh. Nghiên cứu đã sử dụng thymol nồng độ 2,5 mg/g và Resveratrol nồng độ 0,01 mg/g. Kết quả theo dõi sau 25 ngày cảm nhiễm và điều trị bằng thảo dược cho thấy thymol và Resveratrol tác dụng ức chế 68% sự phát triển của mầm bệnh và không gây độc hại đối với tế bào chủ. Kết quả này 1 lần nữa cho thấy khả năng điều trị bệnh do vi bào tử trùng bằng thảo dược (Maistrello *et al.*, 2008).

Ngoài ra, tinh dầu của cây Oregano đang được phát triển và nghiên cứu điều trị bệnh do ký sinh trùng tạo bào tử gây ra rất khả quan. Cây Oregano có tên là kinh giới cay, tên khoa học là *Origanum vulgare*. Tinh dầu từ Oregano được xác định có tính chất dược liệu cao gồm các thành phần:  $\gamma$ -terpinene, p-cymene, Carvacrol và Thymol (Daferera *et al.*, 2000). Các thành phần này có tác dụng ức chế các vi sinh vật (Athanasopoulou *et al.*, 2009) đặc biệt là thành bào tử sinh vật (Sivropoulou *et al.*, 1996; Mejiholm và Dalgaard, 2002; Costa *et al.*, 2012). Một số nghiên cứu đã ghi nhận tác động ức chế bào tử của các loài

ký sinh trùng như *Trypanosoma cruzi* (Santoro *et al.*, 2007), *Eimeria tenella* (Giannenas *et al.*, 2003). Tuy nhiên, các nghiên cứu về ảnh hưởng của tinh dầu Oregano lên vi bào tử trùng vẫn chưa được công bố chính thức.

Tóm lại, từ những thông tin trên có thể thấy nhóm vi bào tử trùng Microsporidia có phổ loài cảm nhiễm rất rộng, với nhiều loài gây bệnh nghiêm trọng trên cá. Hơn nữa, với kích thước nhỏ, vỏ bảo vệ bền vững, khả năng thay đổi hình dạng bào tử qua các giai đoạn và tạo các bào nang trong cơ của cá cho thấy các loài vi bào tử trùng là tác nhân gây bệnh rất phức tạp và nguy hiểm. Hiện nay, việc điều trị bệnh do vi bào tử trùng gây ra trên cá còn khá hạn chế, hầu như chưa có thông tin về loại thuốc và hóa chất điều trị hữu hiệu nhất trên cá mà chủ yếu áp dụng các biện pháp ngăn chặn sự lây nhiễm trong ao đang nhiễm bệnh và phòng bệnh trong quá trình nuôi (Stoskopf, 1993; Woo, 2006; Noga, 2010). Vì vậy việc triển khai ứng dụng các kỹ thuật di truyền, các kỹ thuật tế bào vào những nghiên cứu chuyên sâu về bệnh học và điều trị bệnh sẽ góp phần cho việc đề xuất biện pháp điều trị và phòng chống một cách có hiệu quả nhất. Góp phần vào sự phát triển bền vững nghề nuôi thủy sản hiện nay.



## **Chương 3**

### **VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **3.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Thời gian nghiên cứu: từ 04/2013 - 12/2015.

Khu vực thu mẫu: Cần Thơ, Vĩnh Long, An Giang.

Địa điểm phân tích mẫu: Bộ môn Bệnh học Thủy sản - Khoa Thủy sản - Trường Đại học Cần Thơ.

#### **3.2 Đối tượng nghiên cứu**

Vi bào tử trùng Microsporidia nhiễm trên cá tra ở các giai đoạn khác nhau.

#### **3.3 Vật liệu nghiên cứu**

##### **3.3.1 Dụng cụ**

Bộ tiểu phẫu, lame, lamên, đĩa petri, cân, thước, khay đựng mẫu, cốc đót, đĩa 24 giếng, đĩa 6 giếng, chai nhựa nuôi tế bào, ống eppendorf 1,5 ml và 0,5 ml, đầu pipet, các loại pipet, ống fancol 15ml, ống fancol 50ml, buồng đếm hồng cầu Neubauer, khuôn inox, khuôn nhựa.

Kính hiển vi soi nổi, kính hiển vi quang học, chậu tải mẫu, máy nung paraffin, máy đúc khối, máy cắt lát mỏng, tủ hút, tủ lạnh, tủ sấy, máy chu k nhiệt, máy so màu quang phổ, máy ủ, máy ly tâm, máy vortex, máy lắc, máy PCR, lò vi sóng, bộ điện di, bàn đọc UV, đồng hồ bấm giây Casio HS-30W.

##### **3.3.2 Hóa chất phân tích mẫu**

Wright, Giemsa, cồn tuyệt đối, cồn 70°, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Dung dịch formalin 10%, xylen, paraffin, enterlan, dung dịch Mayer's albumin, dung dịch Harris's haematocilin và eosin (H&E), potassium acetate.

Lysis buffer, SDS, proteinase K, isopropanol, RNase, chloroform - isoamyl (24:1), phenol - chloroform - Isoamyl (25:24:1), TE buffer, thuốc gây mê, L-15 medium, penicillin-streptomycin, dung dịch Hank's Balanced Salt, Percoll (Sigma-aldrich).

Sodium dodecyl sulfate, FBS (fetal bovine serum-huyết thanh thai bò), L-glutamine, Tris-buffered saline (TBS), Tween 20, Glycerol, DMSO.

Thuốc nhuộm: SYTO 16 (SG) và Propidium iodide (PI) (Sigma- aldrich).

### **3.3.3 Thuốc và hóa chất thử nghiệm tác dụng với vi bào tử trùng**

Thuốc kháng sinh (Sigma- aldrich): Albendazole ( $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ ), Fumagillin (Bicycloheximide Fumagillin -Sanofi Sante' Animale -  $C_{26}H_{34}O_7$ ) và dẫn suất của Fumagillin: TNP-470 [O-(Chloroacetyl-carbamoyl) Fumagillol -  $C_{19}H_{28}ClNO_6$ ).

Hóa chất (Merck): Ethanol, Formalin 37%, Chlorine, Iodine, Chlorine dioxide, Hydrogen peroxide.

## **3.4 Phương pháp nghiên cứu**

### **3.4.1 Phương pháp thu và bảo quản mẫu cá**

Thu mẫu cá tra còn sống hoặc vừa mới chết. Đối với cá giống thu ngẫu nhiên 30 con/ao, cá thịt thu ngẫu nhiên 10-15 con/ao. Mỗi địa điểm thu 8 ao, tổng cộng thu 24 ao. Mẫu cá được thu từ những ao đã được chọn lọc, có biểu hiện bệnh gạo. Cá được vận chuyển sống về phòng thí nghiệm trong các thùng xốp có chứa ít nước và sục khí. Trường hợp cá chết sau khi thu mẫu thì ướp mẫu trong nước đá và phân tích ngay trong ngày.

Mẫu được ký hiệu theo qui tắc chung là: M-P-S-F trong đó M: là bệnh gạo, P: là số ao (1-24), S: là đợt thu mẫu (1-10), F: là cá (1-30). Đối với cá nhiễm gạo thì ngoài bào nang còn trữ thêm cơ vùng không có bào nang và được kí hiệu C (cơ).

### **3.4.2 Phương pháp phân tích mẫu**

#### **3.4.2.1 Soi tươi**

Mẫu cá trước khi phân tích được cân trọng lượng và đo chiều dài. Đối với mẫu cá nhiễm bào nang gạo trong cơ, dùng dao thái những miếng cơ thành lát cắt mỏng (1mm), sau đó ép lát cơ giữa hai đĩa thủy tinh và quan sát dưới dưới ánh sáng đèn neon hoặc ánh sáng mặt trời để xác định cường độ nhiễm bào

nang trong cơ. Quan sát toàn bộ các vùng cơ trên thân cá. Mức độ nhiễm ký sinh trùng được tính theo phương pháp của Margollis *et al.* (1982).

$$I(\%) = \frac{Nn \times 100\%}{Nk}$$

Trong đó:  $I(\%)$  là tỷ lệ nhiễm, tính bằng %;

$Nn$  là số mẫu nhiễm

$Nk$  là số mẫu kiểm tra

Cường độ nhiễm = Tổng số bào nang/tổng số cá thể nhiễm

#### **3.4.2.2 Phương pháp phết kính và nhuộm tiêu bản**

Phết mẫu và kiểm tra vi bào tử trùng Microsporidia trong bào nang gạo dưới kính hiển vi quang học theo phương pháp của Tonguthai *et al.* (1999). Nhuộm Giemsa tiêu bản mẫu theo phương pháp của Garcia (2002). Định danh bào tử trùng theo khóa phân loại của Lom và Dykova (1992); Lom và Dykova (2005), Woo (2006) và Barber *et al.* (2009).

#### **Các bước tiến hành như sau**

Thu bào nang ký sinh ở các vùng cơ bị nhiễm bệnh để lên lame sạch. Dùng kim nhọn chọc thủng bào nang. Phết mẫu rồi để tiêu bản khô ở nhiệt độ phòng. Cố định mẫu với methanol trong 1 phút. Cho lame mẫu vào dung dịch Wright trong 3-5 phút. Chuyển mẫu sang dung dịch pH 6,2-6,5 từ 5-6 phút. Sau đó cho vào dung dịch Giemsa trong 20-30 phút. Cho mẫu vào dung dịch pH 6,2 từ 15-30 phút. Rửa sạch mẫu bằng nước cất, để khô tự nhiên. Quan sát kết quả dưới kính hiển vi ở vật kính 10x, 40x, 100x (có dầu soi kính).

#### **3.4.2.3 Phương pháp đo kích thước bào nang và bào tử**

Các bào nang ký sinh trong cơ cá tra được tách ra khỏi phần cơ thịt của cá. Sau đó rửa sạch bằng nước muối sinh lý và đặt lên lame sạch. Bào nang được quan sát dưới kính hiển vi và đo bằng thước đo trên vật kính của kính hiển vi. Kích thước của các bào tử được xác định thông qua phương pháp chụp bằng kính hiển vi điện tử SEM.

#### **3.4.2.4 Phương pháp mô bệnh học**

Cắt phần cơ có chứa bào nang cố định trong formalin trung tính 10% (tỉ lệ formalin: cơ là 10:1) trong 24 giờ. Tiến hành rửa và trữ mẫu trong dung dịch ethanol 70% cho đến khi phân tích mô học. Mẫu được xử lý qua 3 giai đoạn (loại nước, làm trong mẫu, tẩm Paraffin), mẫu được đúc khối và cắt lát với độ dày từ 5-7 $\mu$ m rồi nhuộm theo phương pháp Mayer's với Hematoxyline và Eosin (Robert, 1989).

*Đọc kết quả:* Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10x để quan sát tổng quát, những tiêu bản đạt yêu cầu là tiêu bản có nhân bắt màu tím của Hematocyclin, phần còn lại bắt màu hồng của Eosin. Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi lần lượt ở độ phóng đại 40x, 100x và chụp hình những tiêu bản đặc trưng.

#### **3.4.2.4 Phản ứng PCR**

Mẫu cơ cá khỏe và mẫu cơ cá nhiễm bào nang gạo được trữ trong ethanol 100% để chiết tách DNA dùng cho phân tích PCR.

##### **Chiết tách DNA từ mô cá**

DNA từ mô cá được chiết tách theo phương pháp của Taggart *et al.* (1992), có chỉnh sửa. Cơ cá trữ trong ống eppendorf 1,5 ml, loại bỏ ethanol, sau đó nghiền phần cơ trong 600 $\mu$ l dung dịch Lysis buffer (0,5M NaCl, 0,001 EDTA, 1% SDS, 0,8 Triton, 0,1M Tris-HCl, 40 $\mu$ l SDS 10% và 2,5 $\mu$ l Proteinase K (40 mg/ml). Chuyển động đảo ngược ống 25 lần. Ủ mẫu 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó cho vào 2,5 $\mu$ l RNase (2mg/ml). Chuyển động đảo ngược ống eppendorf 25 lần. Ủ dung dịch ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút.

Cho tiếp 600 $\mu$ l Chloroform - Isoamyl (24:1) đảo đều và ly tâm 13.000 vòng trong 15 phút ở 4°C protein sẽ lắng xuống thành 1 lớp nhỏ giữa 2 pha. Caret thận hút dung dịch phía trên cho vào ống eppendorf 1,5ml khác. Kế tiếp cho thêm 600 $\mu$ l Phenol - Chloroform-Isoamyl (25:24:1) và đảo ngược ống để rửa DNA. Ly tâm 13.000 vòng trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C.

Cẩn thận hút dung dịch phía trên cho vào ống 1,5ml khác rồi cho vào 600 $\mu$ l Isopropanol lạnh. Ly tâm 13.000 vòng trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. DNA lắng đáy ống eppendorf, nhẹ nhàng loại bỏ dung dịch phía trên và cho vào 600 $\mu$ l cồn 70% lạnh. Dùng tay đánh nhẹ để rửa DNA. Nhẹ nhàng loại bỏ cồn phía trên. Lặp lại bước trên thêm 1 lần nữa (dùng micropipet loại bỏ cồn). Lật ngược và phơi ống trong vài giờ ở nhiệt độ phòng rồi cho 50 $\mu$ l TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, có pH=7) vào eppendorf chứa DNA, bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

### **Xác định hàm lượng DNA**

Hàm lượng DNA của mẫu được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 260 nm. Đầu tiên sử dụng 500 $\mu$ l nước cất để tạo mẫu Blank. Đo mẫu DNA đã được pha loãng 100 lần (1 $\mu$ l DNA + 99 $\mu$ l nước cất), với thể tích đo là 500 $\mu$ l. Hàm lượng DNA được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Giá trị đo ở } 260 \text{ nm} \times 50 \times \text{độ pha loãng}$$

### **Qui trình thực hiện phản ứng PCR**

Tổng thể tích phản ứng PCR là 50 $\mu$ lvới thành phần và hàm lượng hóa chất được trình bày ở Bảng 3.1.

**Bảng 3.1 Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại gen của vi bào tử trùng**

<b>Thành phần hóa chất</b>	<b>Hàm lượng</b>
Dung dịch đệm	1 X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	100 $\mu$ M
Taq DNA polymerase	1,25 U
Mồi HG4F	0,1 $\mu$ M
Mồi HG4R	0,1 $\mu$ M
DNA khuôn	500 ng
Nước cất tiệt trùng	-

Trình tự 2 đoạn mồi (Gatehouse và Malone, 1998)

- Mồi HG4F: 5'-CGGCTTAATTTGACTCAAC-3'
- Mồi HG4R: 5'-TCTCCTTGGTCCGTGTTTCAA-3'

Điều kiện phản ứng PCR: chu kỳ nhiệt trong phản ứng PCR gồm 3 bước:

- Bước 1 (1 chu kỳ): DNA được biến tính ở 94°C trong 5 phút.
- Bước 2 (35 chu kỳ): Giai đoạn gắn mồi ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, 50°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút.
- Bước 3 (1 chu kỳ): 72°C trong 10 phút.

Phản ứng PCR kèm theo 2 phản ứng đối chứng: đối chứng (-) là nước cất, đối chứng (+) là mẫu dương tính với Microsporidia (nguồn đối chứng dương từ phòng thí nghiệm Thú y - Đại học Arizona - Hoa Kỳ)

Thực hiện phản ứng khuếch đại trên máy luân nhiệt, sau đó sản phẩm PCR được chạy điện di và đọc kết quả.

### **Chạy điện di**

Quá trình điện di được thực hiện với dung dịch TAE 0,5X và bản thạch chứa 1% agarose và Ethidium bromide (0,5 µg/ml). Sử dụng thang DNA cho từng gel để xác định trọng lượng phân tử của sản phẩm PCR. Dùng pipette hút 10µl mẫu cần phân tích trộn với một giọt dung dịch nạp mẫu (loading dye 6X) cho vào từng giếng. Khi đã cho mẫu cần phân tích vào các giếng còn lại, kết nối bồn điện di với nguồn điện. Sử dụng dòng điện 100V (không vượt quá 150V) để chạy gel. Ngừng điện di khi màu xanh đậm di chuyển khoảng 1/2 đến 2/3 gel. Sau đó tiến hành đọc kết quả.

### **Đọc kết quả**

Đặt gel lên bàn UV để đọc kết quả. Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel Biorad. Căn cứ vào thang DNA kb plus để xác định trọng lượng phân tử của đoạn DNA đã khuếch đại. Mẫu hiện lên vạch tương ứng với vạch 1100 bp thì mẫu dương tính với Microsporidia.

#### **3.4.2.5 Giải trình tự gen và định danh vi bào tử trùng**

Phương pháp giải trình tự DNA trực tiếp thông qua hệ thống giải trình tự mao quản tự động (CEQ 8000, Beckman Coulter) được thực hiện tại Phòng xét nghiệm NK-Biotek (GP số: 41G8005341, ISO 15189), Công ty sinh học Nam Khoa, Thành phố Hồ Chí Minh. Trình tự DNA của vi bào tử trùng *Microsporidia* (ITS- Internal Transcribed Spacer - đặc hiệu của *Microsporidia*) trong bào nang gạo nhiễm trong cơ cá tra được so sánh với trình tự DNA của các loài *Microsporidia* đã được công bố trên ngân hàng gen bằng chương trình BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

#### **3.4.3 Thí nghiệm nuôi cấy tế bào thận và sợi cơ cá tra**

Thực hiện theo phương pháp của Seeley *et al.*, 1990 (có bổ sung): Gây mê cá thí nghiệm và lau khô mẫu bằng khăn giấy. Đặt cá lên khay, khử trùng mặt ngoài cơ thể cá bằng cồn 70°. Giải phẫu cá: (1) cắt lấy thận trước cho vào đĩa petri vô trùng có chứa môi trường L-15 (5% FCS) và giữ lạnh ngay lập tức; (2) cắt lấy phần cơ cá (kích cỡ 5x5x5mm) cho vào đĩa petri vô trùng có chứa ít dung dịch PBS và giữ lạnh.

##### **3.4.3.1 Nuôi tế bào thận cá**

Hút 7ml L-15 (5% FCS) cho vào 1 đĩa petri vô trùng khác. Đặt lưới lọc (đã được tiệt trùng) có mắt lưới 100µm vào đĩa petri, dùng nhíp chuyển mẫu thận cá đang giữ lạnh và nghiền qua lưới lọc.

Hút lấy dịch huyền phù (7ml) vào ống ficol 50ml. Cho thêm 8ml L-15 (5% FCS) và giữ lạnh mẫu. Cân thận chuyển mẫu vào ống ficol có chứa 3,5ml Percoll 34% và 3,5ml Percoll 60%. Mỗi mẫu lặp lại 2 lần. Ly tâm mẫu ở 3500 vòng, nhiệt độ 4°C, thời gian 35 phút.

Hút chuyển tế bào thận trong mẫu thận cá sang ống ficol mới. Thêm 2ml L-15 (5% FCS), ly tâm 2000 vòng, nhiệt độ 4°C, trong 5 phút. Thu lấy phần viên, sau đó thêm L-15 (0,1% FCS) và trộn đều mẫu.

Xác định số lượng tế bào thận cá bằng cách trộn 10 $\mu$ l dung dịch mẫu với 90 $\mu$ l thuốc nhuộm Trypan blue và quan sát trên buồng đếm hồng cầu ở vật kính 10-40x.

Đọc kết quả: Tế bào sống sẽ không bắt màu thuốc nhuộm Trypan blue, ngược lại những tế bào chết sẽ bắt màu xanh đậm của thuốc nhuộm.

Điều chỉnh mật độ tế bào đạt 10<sup>7</sup> tb/ml. Cho dung dịch mẫu vào đĩa 24 giếng, mỗi giếng chứa 1ml dung dịch mẫu và hỗn hợp kháng sinh penicillin/streptomycin, liều lượng lần lượt là 100 UI/ml và 100  $\mu$ g/ml, lặp lại 3 lần. Ủ mẫu ở nhiệt độ 28°C. Quan sát dưới kính hiển vi từ 10-40x ở thời điểm 6, 12, 18, 24, 36, 48 giờ theo dõi quá trình sống sót của các tế bào thận.

#### **3.4.3.2 Nuôi cấy sợi cơ cá**

Chuyển mẫu cơ cá vào ống eppendorf có chứa 1ml PBS. Nghiền mẫu bằng que nhựa tiệt trùng (dùng để nghiền mẫu) trong PBS. Ly tâm mẫu ở 1000 vòng, nhiệt độ 4°C, thời gian 10 phút. Thu lấy phần lắng, thêm môi trường L-15 (0,1% FCS) và trộn đều mẫu. Quan sát cơ cá dưới kính hiển vi ở vật kính 10-40x. Xác định mật độ sợi cơ 80 sợi/ml.

Cho dung dịch mẫu cơ cá vào đĩa 24 giếng, mỗi giếng 2ml dung dịch mẫu và hỗn hợp kháng sinh penicillin/streptomycin, liều lượng lần lượt là 100 UI/ml và 100  $\mu$ g/ml, lặp lại 3 lần. Ủ mẫu ở nhiệt độ 28°C. Quan sát mẫu dưới kính hiển vi (10x) ở thời điểm 6, 12, 18, 24, 36, 48 giờ để xác định sự thay đổi và tồn tại của sợi cơ.

#### **3.4.4 Thí nghiệm gây cảm nhiễm vi bào tử trùng với tế bào thận và sợi cơ cá tra**

##### **3.4.4.1 Thu mẫu, xác định mật độ và tỉ lệ sống của vi bào tử trùng *Microsporidia***

##### **Thu vi bào tử trùng *Microsporidia* trong mô bệnh phẩm**

Sử dụng phương pháp ly tâm tách lớp của Monaghan (2011)

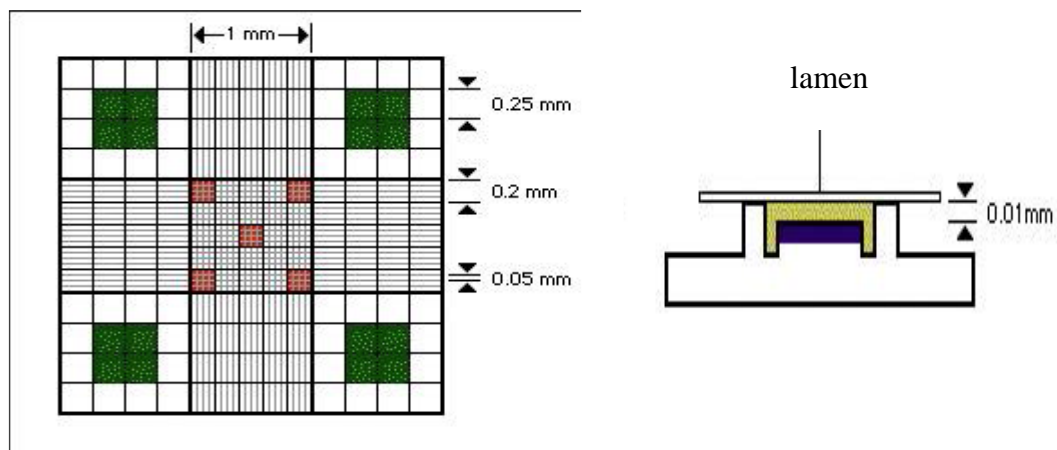
Tách bào nang gạo ra khỏi cơ cá tra. Cho bào nang vào ống eppendorf chứa 1ml nước cất tiệt trùng. Dùng chày nhựa tiệt trùng nghiền mẫu. Cho dung



dịch qua lưới lọc (kích thước lưới  $\leq 40\mu\text{m}$ ). Ly tâm dung dịch mẫu ở 2000 vòng/phút, nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$  trong thời gian 30 phút. Giữ phần viên và loại bỏ phần trong bên trên. Phần viên được hòa tan với 1ml nước cất tiệt trùng, sử dụng máy vortex trộn mẫu trong 5 phút. Bơm phần dung dịch mẫu qua ống tiêm 25G hai lần. Sau đó phần dung dịch mẫu được trộn với 50% Percoll, vortex nhẹ trong 5 giây và ly tâm ở 2000 vòng/phút, nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$  trong 30 phút. Giữ lại phần viên và hòa tan với nước cất tiệt trùng để có được 1 dung dịch các bào tử tinh sạch, không lẫn tạp chất.

### Xác định mật độ vi bào tử trùng *Microsporidia*

Xác định mật độ bào tử tinh sạch bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer ở vật kính 40x. Đếm 4 ô lớn màu đỏ (1 ô lớn có 16 ô nhỏ) ở 4 góc của vùng đếm hồng cầu và 1 ô lớn màu đỏ ở trung tâm buồng đếm. Mỗi mẫu lặp lại 3 lần. Pha loãng mật độ vi bào tử trùng: nồng độ dung dịch bào tử ban đầu là  $10^0$ . Lấy 0,1 ml dung dịch bào tử cho vào ống eppendorf chứa sẵn 0,9 ml nước cất tiệt trùng, thu được dung dịch có nồng độ  $10^{-1}$ , trộn đều mẫu. Tiếp tục lấy 0,1 ml dung dịch bào tử ở nồng độ  $10^{-1}$  cho vào ống eppendorf khác chứa sẵn 0,9 ml nước cất tiệt trùng, thu được dung dịch có nồng độ  $10^{-2}$ , trộn đều mẫu.



**Hình 3.1 : Buồng đếm Neubauer, vùng đếm hồng cầu có màu đỏ**

### Công thức tính

$$R = C \times 10 \times 5 \times \text{ĐPL}$$

Trong đó: R: Mật độ bào tử (bt/mm<sup>3</sup>)

C: Tổng số bào tử trên 5 vùng đếm

10: Khoảng cách giữa lamelle và buồng đếm là 1/10 mm

5: Diện tích của mỗi vùng đếm là 1/5 mm<sup>2</sup>

ĐPL: Độ pha loãng

### **Xác định tỉ lệ sống của vi bào tử trùng Microsporidia**

Theo phương pháp của Yan Peng *et al.* (2013). Dung dịch bào tử trùng được nhuộm để xác định tỉ lệ bào tử sống và chết trước khi gây cảm nhiễm.

Mẫu đối chứng: xử lý dung dịch vi bào tử trùng ở 100°C trong 15 phút. Sau đó hút 1µl dung dịch mẫu đã tiệt trùng (bào tử chết) nhuộm với dung dịch nhuộm gồm 1ml nước cất tiệt trùng và 5µl PI (2,4mM) trong 30 phút. Bào tử được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (20x). Vi bào tử chết sẽ bắt màu đỏ của thuốc nhuộm PI.

Mẫu dung dịch bào tử sống: Lấy 1ml dung dịch mẫu chứa vi bào tử cho vào thuốc nhuộm SG và PI theo tỉ lệ 5:2,4 µM. Đặt mẫu trong nước đá và ủ 30 phút trong bóng tối, sau đó ly tâm mẫu ở 20800 vòng trong 5 phút ở 21°C. Loại bỏ 680 µl phần dịch nổi bên trên và giữ lại 320 µl phần viên còn lại. Hút 5 µl dung dịch bào tử quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Các bào tử sẽ bắt màu thuốc nhuộm, bào tử sống bắt màu xanh của thuốc nhuộm SG, bào tử chết bắt màu đỏ của thuốc nhuộm PI.

Xác định tỉ lệ sống của bào tử theo công thức sau:

$$S(\%) = \frac{N_s \times 100\%}{N_o}$$

Trong đó: S (%) là tỷ lệ sống, tính bằng %;

$N_s$  là số lượng vi bào tử sống;

$N_o$  là số lượng vi bào tử đếm được

#### **3.4.4.2 Thí nghiệm gây cảm nhiễm**

**Chuẩn bị dung dịch bào tử Microsporidia:** Dung dịch bào tử Microsporidia chuẩn bị thí nghiệm với gây cảm nhiễm được tinh sạch, mật độ 10<sup>7</sup> bào tử/ml. Riêng mẫu dung dịch bào tử Microsporidia dùng làm đối chứng được tiệt trùng ở 100°C trong 15 phút.

**Chuẩn bị tế bào thận/cơ cá tra:** Tế bào thận và sợi cơ cá được nuôi cấy trong môi trường L-15 (0,1% FCS). Mật độ tế bào thận:  $10^7$  tb/ml; mật độ sợi cơ: 80 sợi cơ/giếng.

### **Tiến hành thí nghiệm**

Cho dịch huyền phù tế bào thận (1ml) vào đĩa 6 giếng, sau đó cho dung dịch bào tử vào các giếng theo tỉ lệ 1:1, bổ sung thêm hỗn hợp kháng sinh penicillin/streptomycin, liều lượng lần lượt là 100 UI/ml và 100  $\mu$ g/ml. Thí nghiệm tương tự với sợi cơ cá. Ủ mẫu ở nhiệt độ 28°C.

Mỗi nghiệm thức có 1 giếng đối chứng (gồm tế bào thận/sợi cơ cá và dung dịch bào tử đã tiệt trùng). Mỗi nghiệm thức lập lại 3 lần.

Các nghiệm thức gây cảm nhiễm với vi bào tử trùng được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10-40x ở thời gian 1, 2, 4, 6, 8, 12 giờ. Ghi nhận kết quả tác động của vi bào tử trùng *Microsporidia* với tế bào thận/sợi cơ cá.

### **3.4.5 Thí nghiệm *in vitro* vi bào tử trùng với hóa chất và thuốc**

Thí nghiệm *in vitro* vi bào tử trùng với hóa chất và thuốc được thực hiện theo phương pháp của Thomas (2013).

### **Chuẩn bị dung dịch bào tử *Microsporidia***

Dung dịch bào tử chuẩn bị thử nghiệm với thuốc và hóa chất được xác định mật độ bằng cách đếm số lượng bào tử trong buồng đếm hồng cầu. Sau đó pha loãng mẫu với nước cất để được các mật độ thí nghiệm là  $10^7$  bào tử/ml. Quan sát vi bào tử trùng dưới kính hiển vi ở vật kính 100x để kiểm tra độ tinh sạch trước khi bắt đầu thí nghiệm.

### **Chuẩn bị hóa chất**

Các loại hóa chất được hòa tan theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Pha loãng dung dịch hóa chất bằng nước cất về các nồng độ cần thiết để thí nghiệm.

### **Chuẩn bị thuốc**

Albendazole ( $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ ), fumagillin ( $C_{26}H_{34}O_7$ ) và TNP-470 ( $C_{19}H_{28}ClNO_6$ ) được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO - Prolabo) và ethanol ở nồng độ gốc là 10 mg/ml.

### **Tiến hành thí nghiệm**

Cho dung dịch bào tử đã được tinh sạch vào các đĩa 24 giếng, sau đó cho dung dịch thuốc hoặc hóa chất khác nhau vào từng giếng gồm thể tích thuốc/hóa chất với thể tích dung dịch bào tử sao cho đạt nồng độ cần thử nghiệm. Dung dịch hóa chất theo các nồng độ: 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70% đối với ethanol và formalin. Pha ở nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7% đối với chlorine, iodine, chlorine dioxide, oxy già. Các nồng độ thuốc được dùng trong thí nghiệm gồm 7 nồng độ: 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; và 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Mỗi nghiệm thức có 1 giếng đối chứng (chỉ có dung dịch bào tử), các giếng có nồng độ thuốc hoặc hóa chất được lặp lại 3 lần cho mỗi nồng độ thử nghiệm. Kiểm tra tác động ảnh hưởng của hoá chất lên bào tử sau 1 phút và tác động của thuốc kháng sinh lên bào tử sau 30 phút.

Các nghiệm thức đánh giá thuốc và hóa chất làm bất hoạt hoàn toàn bào tử trùng được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100-200x và kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Kết quả ghi nhận thời gian bất hoạt bào tử được thể hiện bằng đơn vị phút đối với hóa chất và đơn vị giờ đối với thuốc. Các giá trị này được thể hiện bằng số thập phân để phân trình bày ngắn gọn hơn và tiện cho việc tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và so sánh ý nghĩa thống kê. Ví dụ: 3,45 phút có ý nghĩa là 3 phút và 0,45 phút, chuyển sang đơn vị: ...phút...giây theo công thức: 3 phút 0,45x60 giây, tương đương 3 phút 27 giây. Tương tự cách quy đổi cho đơn vị giờ.

#### **3.4.6 Thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế của thuốc lên vi bào tử trùng *Microsporidia* gây cảm nhiễm trong tế bào thận và sợi cơ cá tra**

Thực hiện theo phương pháp của Beauvais *et al.* (1994)

Chuẩn bị dung dịch vi bào tử Microsporidia (mật độ  $10^7$  bào tử/ml, tỷ lệ sống 100%), tế bào thận cá tra (mật độ  $10^7$  tế bào /ml) và sợi cơ cá tra (80 sợi/giếng).

Chuẩn bị thuốc albendazole và fumagillin ở nồng độ 5  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$  dựa vào kết quả thí nghiệm ở mục 3.4.5.

Thí nghiệm được bố trí trong đĩa 24 giếng với 3 nghiệm thức (NT), mỗi nghiệm thức lập lại 3 lần, gồm có: (NT3) 0,5ml tế bào thận/cơ cá, 0,5ml vi bào tử trùng *Kabatana* sp. và 0,5ml dung dịch thuốc albendazole/fumagillin (3  $\mu\text{g/ml}$ ); (NT2) 0,5ml tế bào thận cá/cơ, 0,5ml vi bào tử trùng *Kabatana* sp. và 0,5ml dung dịch thuốc albendazole/fumagillin (4  $\mu\text{g/ml}$ ) và (NT1) 0,5ml tế bào thận cá/cơ, 0,5ml vi bào tử trùng *Kabatana* sp. và 0,5ml dung dịch thuốc albendazole/fumagillin (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Ủ mẫu tế bào thận và sợi cơ ở nhiệt độ 28°C.

Mỗi nghiệm thức có 4 giếng đối chứng (ĐC) gồm: ĐC1: tế bào thận/cơ cá + thuốc albendazole/fumagillin, ĐC2: tế bào thận/cơ cá + môi trường L-15, ĐC3: môi trường L-15; ĐC4: tế bào thận/cơ cá + vi bào tử trùng *Kabatana* sp.

Các nghiệm thức được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10-40x ở thời gian 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 giờ. Ghi nhận kết quả tác động của albendazole và fumagillin đến vi bào tử trùng Microsporidia cảm nhiễm với tế bào thận/cơ cá tra.

### 3.4.7 Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được chuyển đổi về dạng số thập phân. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được xác định thông qua phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA), phép thử LSD, bằng phần mềm SPSS 16.0, ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

## Chương 4

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 4.1 Đặc điểm bệnh học của vi bào tử trùng *Microsporidia* nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)

##### 4.1.1 Thông tin về ao nuôi và mẫu cá tra

Tổng cộng có 578 mẫu cá tra được thu từ 24 ao ương/nuôi ở 3 tỉnh Cần Thơ, Vĩnh Long và An Giang. Chiều dài và trọng lượng cá được cân đo để xác định giai đoạn cá. Kích cỡ cá hương là  $3,5 \pm 0,1$  cm; chiều dài và khối lượng của cá giống dao động từ 11,4-14,1 cm và 21,5-35,3 g. Đối với cá thịt, chiều dài dao động từ 26,7-51,6 cm và khối lượng từ 345-424,6 g (Bảng 4.1).

**Bảng 4.1: Thông tin về số lượng, chiều dài và trọng lượng của các mẫu cá**

Tỉnh	Giai đoạn	Số ao	Tổng số mẫu	Số mẫu nhiễm	Số mẫu mô	Số mẫu PCR	Chiều dài (cm)	Trọng lượng (g)
Cần Thơ	Cá hương	1	30	28	0	9	$3,5 \pm 0,1$	-
	Cá giống	5	138	107	46	46	$14,1 \pm 7,3$	$24,6 \pm 6,3$
	Cá thịt	3	45	35	12	12	$36,3 \pm 7,3$	$372,0 \pm 204,4$
Vĩnh Long	Cá giống	5	140	121	44	44	$12,9 \pm 2,2$	$35,3 \pm 20,2$
	Cá thịt	3	45	22	9	9	$51,6 \pm 3,0$	$424,6 \pm 63,0$
An Giang	Cá giống	5	150	139	75	75	$11,4 \pm 1,8$	$21,5 \pm 10,2$
	Cá thịt	2	30	20	9	9	$26,7 \pm 7,8$	$345,0 \pm 226,2$
<b>Tổng</b>		<b>24</b>	<b>578</b>	<b>472</b>	<b>195</b>	<b>204</b>		

(Ghi chú: dấu - là mẫu không xác định)

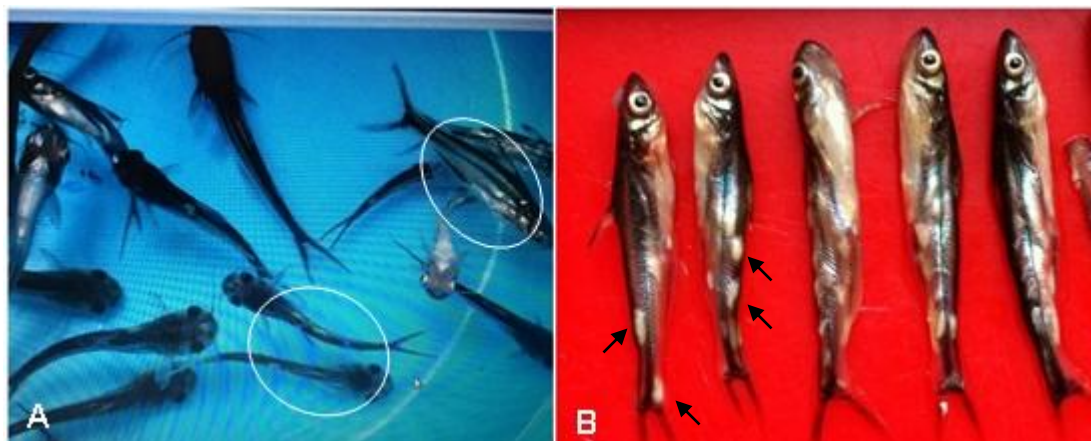
Các ao nuôi ở Cần Thơ có diện tích 8.000 m<sup>2</sup>, kích cỡ cá giống thả là 12 g/con với mật độ thả từ 60-120 con/m<sup>2</sup>, nguồn cá giống được cung cấp từ các công ty sản xuất cá giống ở Ô Môn. Các ao ở Vĩnh Long có diện tích dao động từ 4.000-6.000 m<sup>2</sup>, cá giống có kích cỡ từ 20-80 g/con thả với mật độ 50-160 con/m<sup>2</sup>, nguồn cá giống có nguồn gốc từ Hồng Ngự. Các ao ở An Giang đều thả cùng một cỡ giống 80 g/con, mật độ thả từ 30-60 con/m<sup>2</sup>, diện tích ao nuôi từ 3.500-6.500 m<sup>2</sup>, nguồn cá giống từ Ô Môn. Nhìn chung, tùy thuộc vào diện tích ao nuôi cũng như nguồn giống mà mỗi vùng nuôi thả cá với mật độ khác nhau. Số lượng mẫu cá bệnh thu được phụ thuộc vào giai đoạn cá hương, cá giống

hoặc cá thịt. Chọn ngẫu nhiên các mẫu cá bệnh để phân tích mô học và PCR theo tỉ lệ mẫu nhiễm bệnh.

#### **4.1.2 Dấu hiệu bệnh lý của cá tra nhiễm vi bào tử trùng *Microsporidia***

##### **4.1.2.1 Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài**

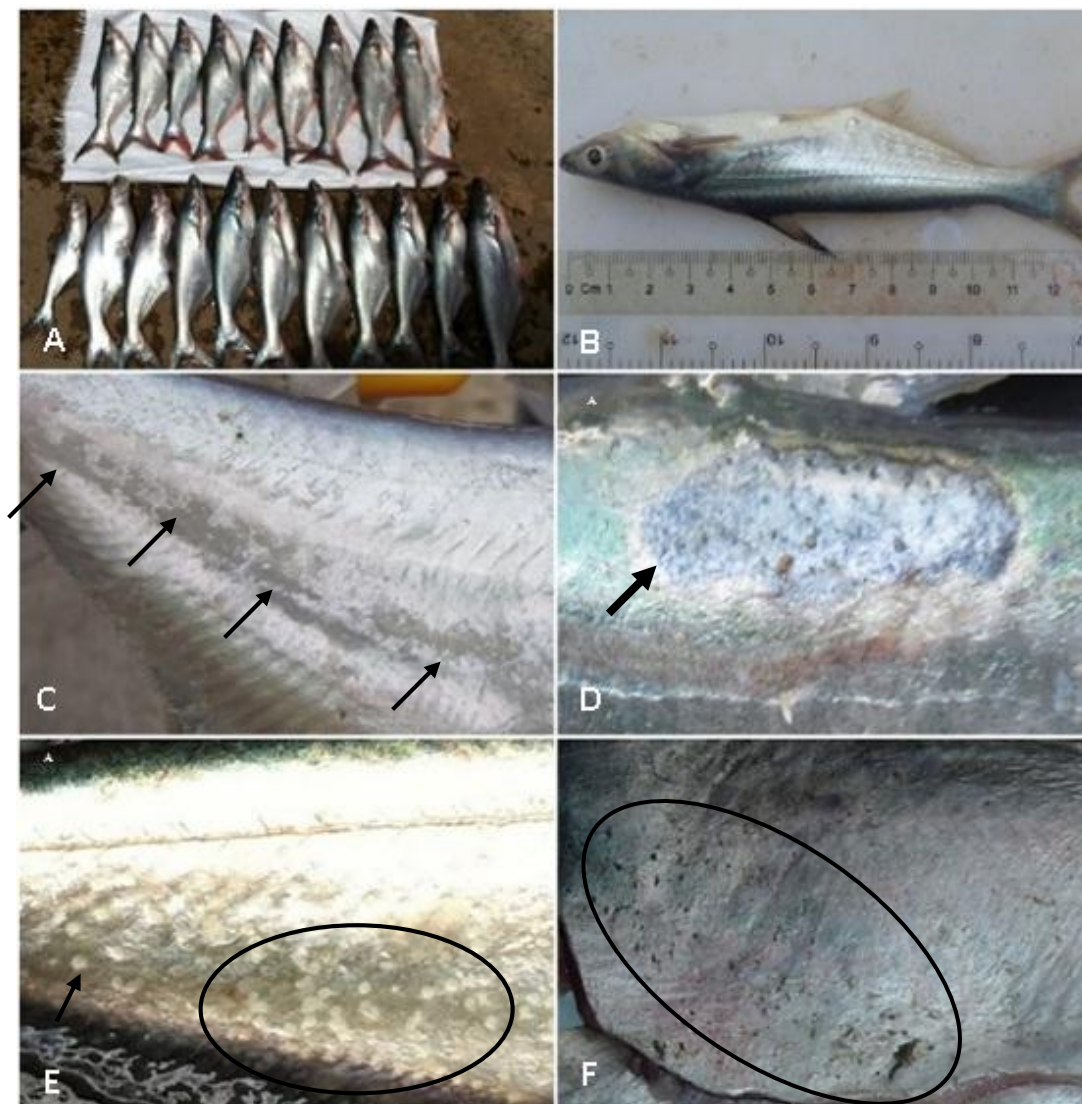
Quan sát dấu hiệu lâm sàng của 578 mẫu cá tra nhiễm bệnh gạo do vi bào tử trùng *Microsporidia* thấy có sự khác biệt giữa 3 nhóm cá hương (30 mẫu), cá giống (428 mẫu) và cá thịt (120 mẫu). Giai đoạn cá hương có kích thước nhỏ, cơ thịt trong suốt nên có thể nhìn thấy rõ các bào nang gạo màu trắng sữa nhỏ hoặc rất to ký sinh bên trong cơ cá. Cá hương nhiễm gạo vẫn hoạt động bơi lội, nhưng do các bào nang gạo ký sinh làm cản trở quá trình vận động của cá, cá thường bơi lội chậm chạp và bắt mồi kém, những mẫu cá nhiễm nặng có dấu hiệu bơi lơ lơ hoặc bơi ngửa bụng trên mặt nước hoặc bơi quay vòng tròn. Đây là nguyên nhân làm cá chết trong thời gian 2-3 ngày sau khi nhiễm bệnh (Hình 4.1A và B).



**Hình 4.1: (A) cá tra ở giai đoạn cá hương nhiễm bệnh gạo (khoanh tròn); (B) Bào nang gạo nằm trong thân cá (mũi tên)**

Đối với mẫu cá giống nhiễm gạo, biểu hiện bệnh lý bên ngoài bình thường, không nhìn thấy rõ các bào nang gạo như ở cá hương. Do kích cỡ cá giống lớn hơn, phần cơ thịt nhiều hơn nên bào nang gạo thường nằm ẩn bên trong cơ cá. Tuy nhiên, một số dấu hiệu bệnh lý được thấy rõ bên ngoài ở các mẫu cá giống nhiễm gạo như màu sắc nhợt nhạt (Hình 4.2A và B), một số mẫu cá có vùng da bị mất nhớt (Hình 4.2C và D). Một số trường hợp khác có thể thấy trên da có nhiều đốm trắng nhỏ (Hình 4.2E) hoặc những đốm nhỏ li ti tập

trung vùng bụng, vùng đuôi hoặc có vài vết trầy xước nhỏ hoặc to trên da cá (Hình 4.2F).



**Hình 4.2: (A-F) Biểu hiện bệnh lý bên ngoài của cá tra giống nhiễm bào nang gạo (vùng khoanh tròn hoặc mũi tên)**

Ở mẫu cá thịt nhiễm gạo nặng thì dấu hiệu bệnh lý bên ngoài rất đặc trưng, trên da có vài đến rất nhiều nốt sần đỏ (Hình 4.3A), các góc vi thường bị xuất huyết (Hình 4.3B). Đặc biệt là trên da có nhiều chỗ phồng rộp (Hình 4.3C) và sau cùng vùng da này bong tróc tạo ra những lỗ ăn sâu vào cơ cá, các lỗ này có nhiều kích cỡ và mức độ lõm sâu vào cơ khác nhau (Hình 4.3D và E). Theo kết quả đề tài nghiên cứu bước đầu về bệnh gạo ở cá tra năm 2011, đề tài chỉ thu mẫu định kỳ hàng tháng trong ao nuôi cá tra ở một số vùng nuôi trọng điểm. Do vậy, hầu hết cá nhiễm bệnh gạo không có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng, một



số trường hợp có dấu hiệu như da cá xuất hiện những vết nhỏ li ti hoặc có một vài đến rất nhiều vết hoại tử tròn lõm sâu vào trong cơ của cá.



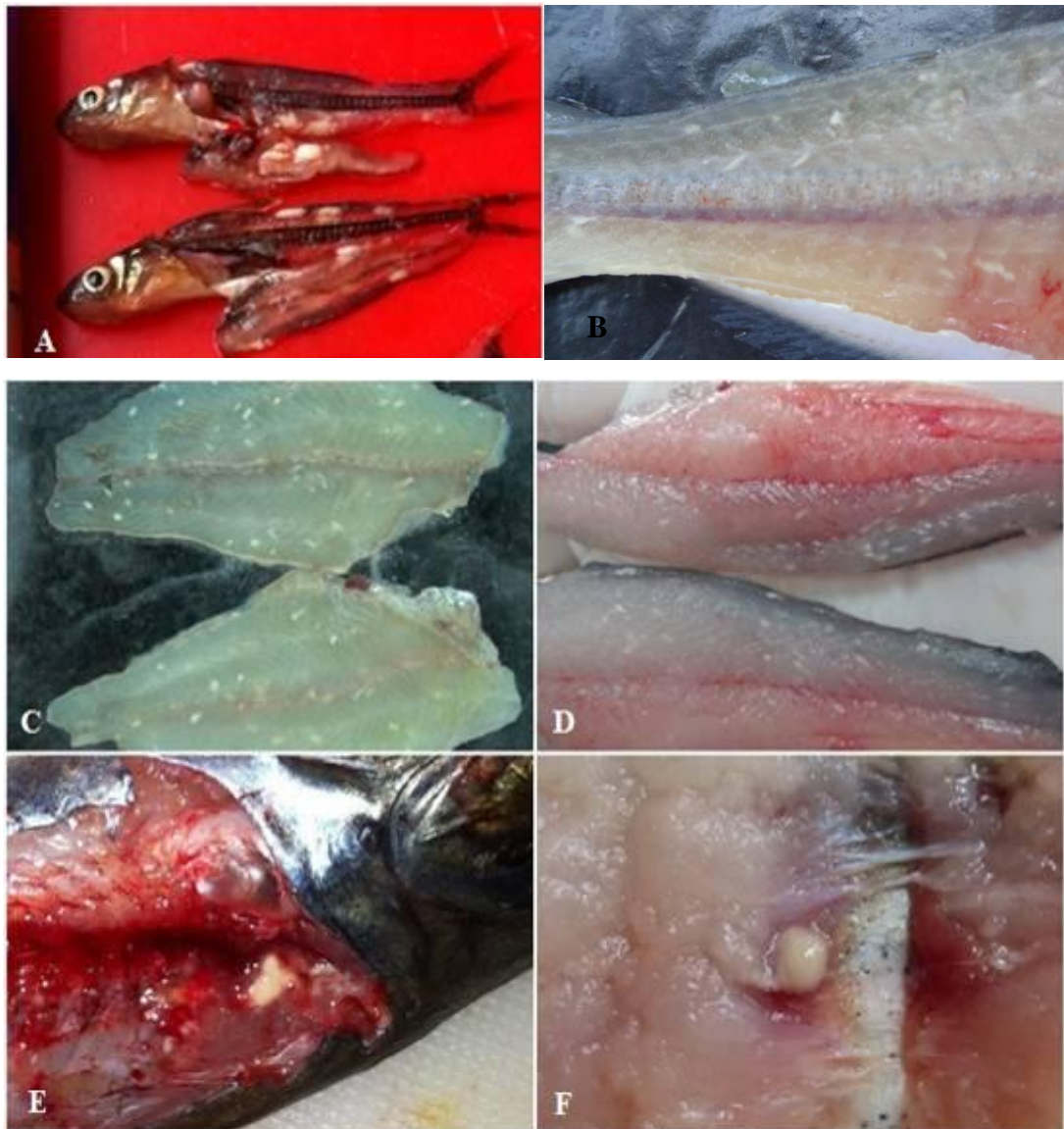
**Hình 4.3: (A-E) Biểu hiện bệnh lý bên ngoài của cá tra thịt nhiễm bệnh gao; (F) vết loét trên da cá đã được tái tạo (vùng khoanh tròn hoặc mũi tên)**

Kết quả khảo sát dấu hiệu bệnh lý của cá tra nhiễm gao thu từ thời điểm 04/2013 đến tháng 11/2014 trong đề tài này cho thấy hầu hết mẫu cá bị nhiễm bệnh gao có những dấu hiệu đặc trưng như mô tả bên trên. Đặc biệt là ở những mẫu cá có dấu hiệu bệnh lý có mức độ tổn thương tang dần trên da (từ phỏng rộp da đến vết lõ sâu vào cơ) như Hình 4.3C, D và E. Khi mổ cá kiểm tra, 100% mẫu nhiễm bào nang gao. Sự khác biệt rõ rệt này là do đề tài chỉ tập trung thu

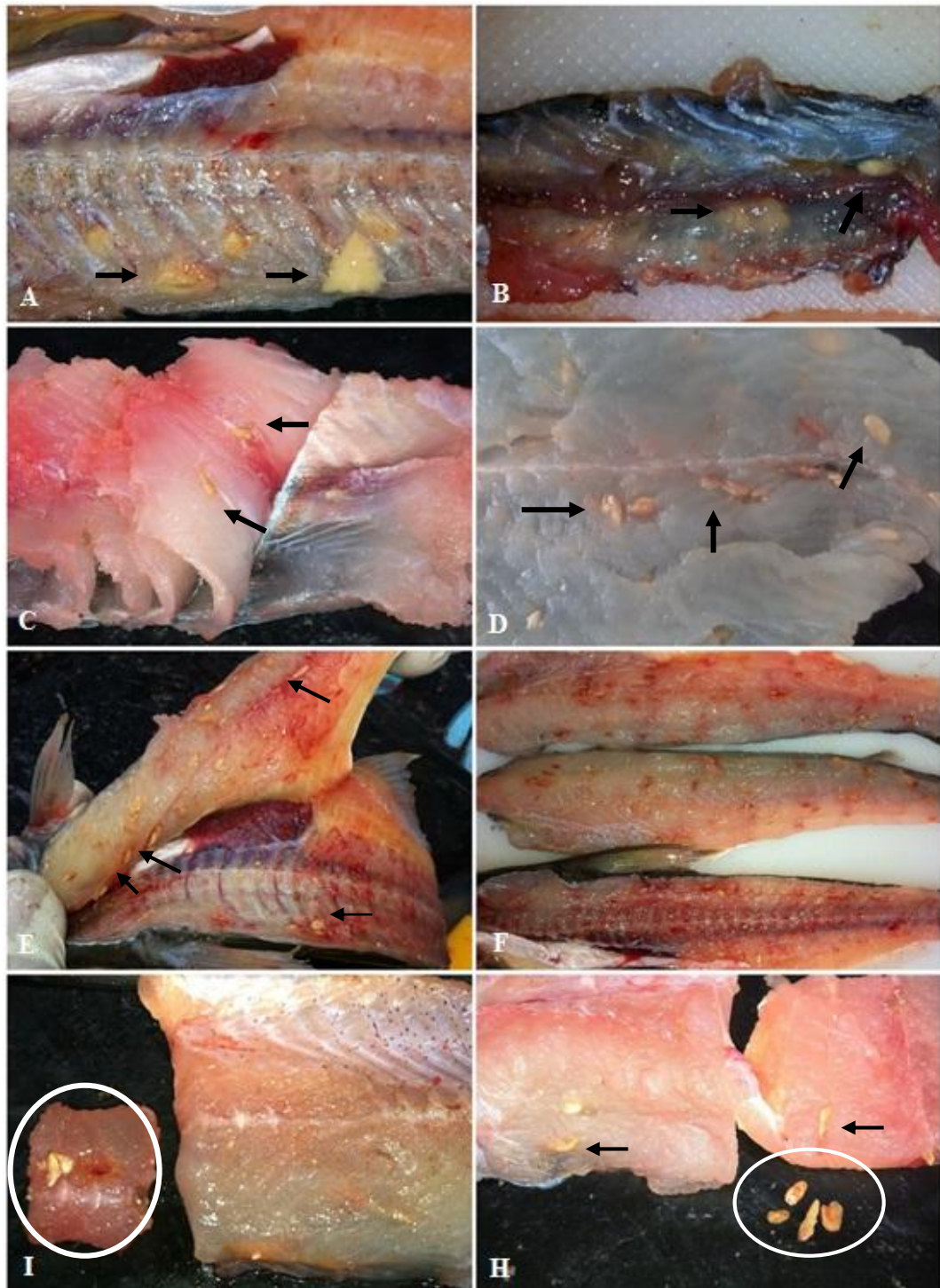
mẫu ở những ao cá tra bị nhiễm bệnh nặng. Một vài trường hợp đặc biệt cho thấy vùng da cá bị bong tróc có thể được tái tạo lại (Hình 4.3F). Nguyên nhân có thể là do hộ nuôi đã xử lý một số loại thuốc điều trị vi bào tử trùng *Micropodidia* nên da cá có thể phục hồi trở lại, tuy nhiên điều này chưa có cơ sở khoa học, chỉ được ghi nhận qua thông tin cung cấp từ người nuôi cá.

#### 4.1.2.2 Dấu hiệu bệnh lý bên trong

Kết quả mổ khám 30 mẫu cá hương, 428 mẫu cá giống và 120 mẫu cá thịt cho thấy bào nang gạo ký sinh trong cơ cá tra rất đa dạng. Ở cá hương, bào nang có màu trắng sữa, kích thước tương đối to, thành bào nang rất ổn định. Khi mổ cá để quan sát, các bào nang này khó vỡ ngoại trừ dùng lực tác động vào thì bào nang mới vỡ ra (Hình 4.4A).



**Hình 4.4: (A) cá hương nhiễm gạo; (B-D) cá giống nhiễm gạo; (E-F) cá thịt nhiễm bào nang**



**Hình 4.5: Dấu hiệu nhiễm gạo trong cơ cá tra; (A-H) cá thịt nhiễm gạo, bào nang xơ cứng thành mảng (vùng khoanh tròn hoặc mũi tên)**

Đối với mẫu cá giống nhiễm gạo thì kích thước bào nang nhỏ hơn rất nhiều, bào nang có dạng tròn hoặc vệt dài nằm gần phần xương cá hoặc nằm khắp phần cơ của cá hoặc tập trung ở vùng cơ trên thân cá (Hình 4.4B, C và D).

Ngược lại, đối với mẫu cá thịt nhiễm gạo thì kích thước bào nang khá to, tuy nhiên màu sắc bào nang có thể trắng đục (Hình 4.4E và F).

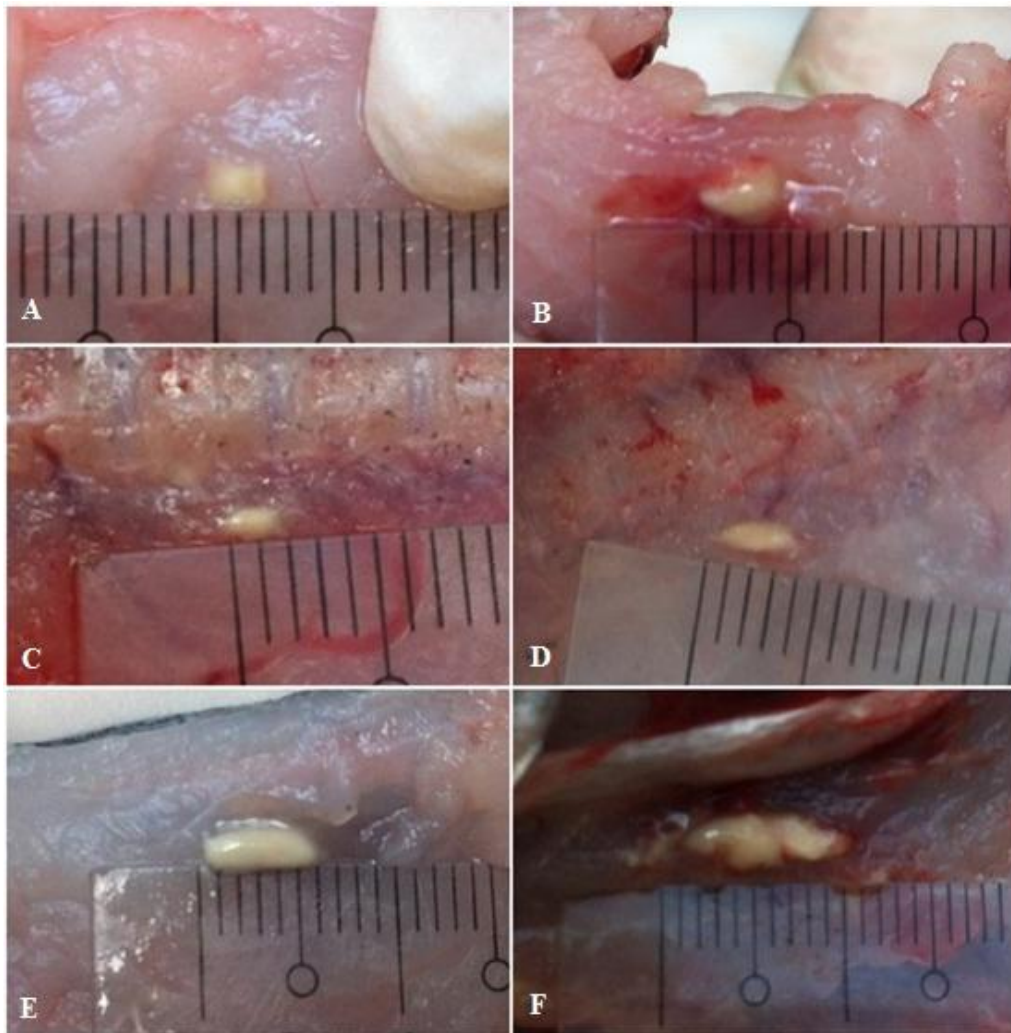
Đặc biệt, ở một số mẫu cá thịt nhiễm gạo trong thời gian dài, nang gạo có thể chuyển sang vàng kem, sau cùng bào nang đông vón thành mảng màu nâu rất cứng nằm trong cơ cá. Có thể gấp lấy bào nang ra khỏi cơ, phần cơ thịt sẽ bị lõm sâu (Hình 4.5I, 4.5A-H).



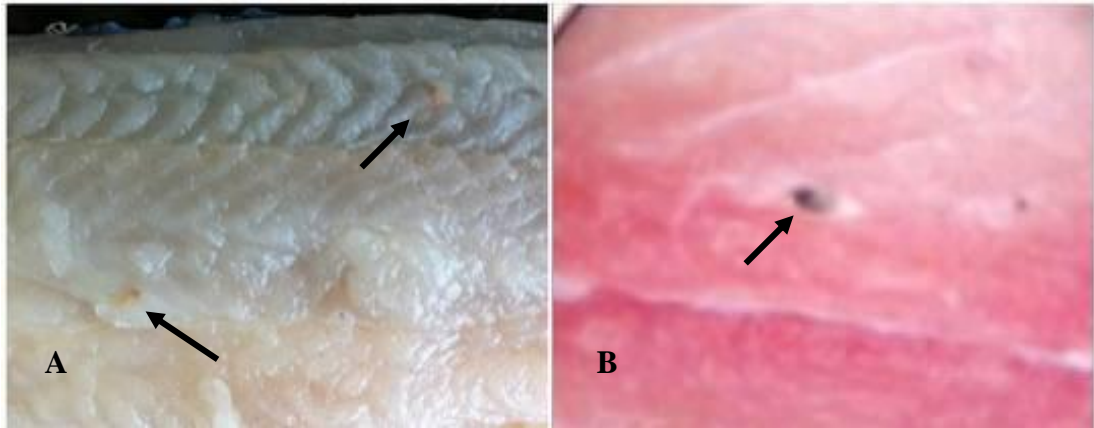
**Hình 4.6: Cá giống bị dị hình nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia; A: dấu hiệu bên ngoài; B: bào nang gạo trong cơ cá (vùng khoanh tròn)**

Bên cạnh đó, nghiên cứu còn phát hiện ở mẫu cá tra giống bị dị hình cũng nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia, bào nang có kích thước rất nhỏ nằm ký sinh rất nhiều trong cơ cá. Số mẫu cá dị hình thu trong ao không nhiều, tuy nhiên cá dị hình vẫn nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia như mẫu cá bình thường.

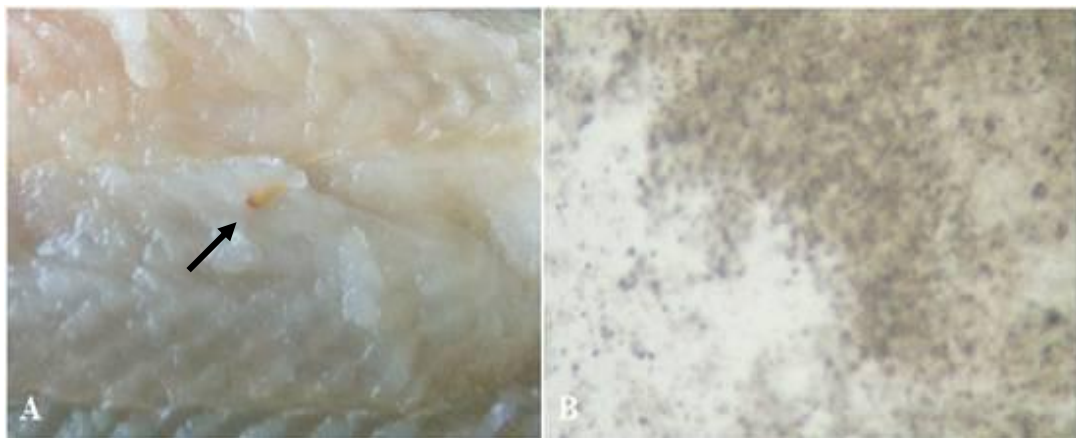
Màu sắc và kích cỡ bào nang gạo thay đổi khác nhau theo giai đoạn cá. Như phần trên đã đề cập, bào nang có màu trắng đục, vàng nâu hoặc màu đen. Ở giai đoạn cá hương và cá giống thì bào nang gạo có màu trắng đục, nhưng khi cá chuyển sang giai đoạn lớn hơn thì bào nang gạo có xu hướng chuyển sang màu vàng nâu, một số trường hợp chuyển sang màu đen. Kích cỡ bào nang cũng khác nhau theo giai đoạn cá, theo ghi nhận của đề tài, kích cỡ bào nang dao động từ 0,5-10 mm ở cả 3 nhóm cá hương, cá giống và cá thịt. Thường thì bào nang trên cá giống nhỏ hơn và có nhiều dạng hơn so với cá thịt. Tuy nhiên, bào nang ở cá hương nhiễm gạo khá to.



**Hình 4.7: (A-F) Kích thước của các bào nang gạo trong cơ cá tra**



**Hình 4.8: (A) bào nang gạo nâu trong cơ; (B) bào nang gạo đen trong cơ**

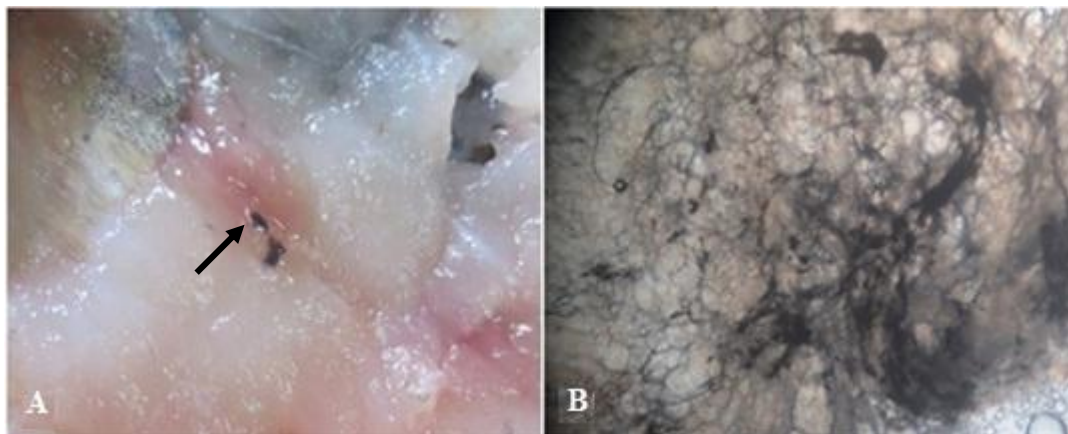


**Hình 4.9: (A) bào nang gạo nâu trong cơ; (B) tiêu bản gạo nâu - 40x;**

Kết quả phân tích mẫu cá tra thương phẩm nhiễm gạo ghi nhận ở những ao cá đã nhiễm bệnh trong thời gian dài (khoảng 30-45 ngày), cá thường được người nuôi sử dụng thuốc kháng sinh điều trị thì bào nang gạo thường thay đổi màu sắc từ trắng đục sang vàng nâu nhạt, nâu sậm hoặc thậm chí một số bào nang còn chuyển sang màu đen (Hình 4.8A và B). Quan sát hình thái bào nang gạo nâu hoặc đen cho thấy bào nang gạo không theo một hình dạng nhất định. Nhìn chung, không có điểm đặc biệt của dạng gạo nâu hoặc gạo đen.

Khi ép tiêu bản bào nang gạo nâu hoặc đen quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 40x thì khó phát hiện vi bào tử trùng *Microsporidia* trong nang gạo. Tiêu bản cho thấy nhiều chất nhầy có màu hơi nâu hoặc nhiều sắc tố đen ở nang gạo đen (Hình 4.9A, B và Hình 4.10A, B). Theo kết quả quan sát có thể nhận định rằng sau thời gian nhiễm nang gạo thì (nang gạo được gọi là gạo già) vi bào tử trùng có khả năng di chuyển sang vùng cơ khác để ký sinh và tạo bào

nang mới. Các phần còn lại trong nang gạo chỉ là sản vật còn lại giữa phản ứng cơ thể với vi bào tử trùng Microsporidia.



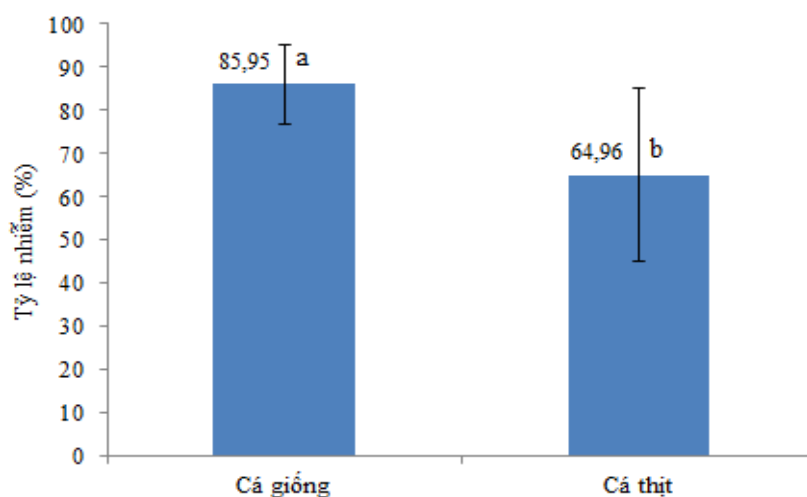
**Hình 4.10: (A) bào nang gạo đen trong cơ; (B) tiêu bản gạo đen - 40x**

#### **4.1.3 Tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia**

Kết quả quan sát và kiểm tra mẫu cơ cá hương, cá giống và cá thịt bằng phương pháp soi tươi cho thấy tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm bào nang vi bào tử trùng Microsporidia khá cao ở 3 tỉnh An Giang, Cần Thơ và Vĩnh Long. Kết quả chi tiết được thể hiện trong Bảng 4.2.

Phân tích 578 mẫu cá thu ở An Giang, Cần Thơ và Vĩnh Long đã phát hiện 472 mẫu nhiễm bào nang của vi bào tử trùng Microsporidia. Trong đó, kiểm tra 30 mẫu cá hương thu ở Cần Thơ phát hiện 28 mẫu nhiễm bào nang gạo, tỉ lệ nhiễm chiếm 93,3%, cường độ nhiễm dao động từ 2-14 bào nang/cá. Kết quả cho thấy trong 3 tỉnh thì An Giang có tỷ lệ mẫu cá giống nhiễm vi bào tử trùng cao nhất là 92,6%, thấp nhất là Cần Thơ với 78,7%. Tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng trên cá giống ở An Giang và Cần Thơ khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, đối với các mẫu ở giai đoạn cá thịt thì ao nuôi ở Cần Thơ có tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng cao nhất là 77,7%, kế đến là An Giang và thấp nhất là các ao nuôi ở Vĩnh Long với 51,1% mẫu cá nhiễm vi bào tử trùng. Tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng trên cá thịt ở các tỉnh thu mẫu khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Từ Hình 4.11 có thể thấy ở cả 3 tỉnh thu mẫu thì giai đoạn cá giống luôn có tỷ lệ nhiễm cao hơn (có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$ ) giai đoạn cá thịt. Kết quả cho thấy tỉ lệ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia của đề tài cao

hơn nghiên cứu trước đó của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011), tỷ lệ nhiễm dao động từ 40,0-85,7% tùy theo giai đoạn cá.



**Hình 4.11: Tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia ở cá giống và cá thịt của tổng số mẫu phân tích ở 3 tỉnh**

*Ghi chú: các cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )*

Các kết quả thu được khá phù hợp với nhận định của Woo (2006); Weiss và Becnel (2014). Ở giai đoạn cá giống do sức đề kháng và khả năng vận động của cá khá thấp nên các vi bào tử trùng dễ dàng xâm nhập vào cơ thể cá và phát triển thành bệnh. Nếu như ở giai đoạn cá thịt, Microsporidia chỉ là giảm chất lượng cơ thịt và gây hao hụt lớn thì ở giai đoạn cá giống, Microsporidia có thể gây hao hụt lớn cho đàn cá nếu không được điều trị hiệu quả.

Kết quả ghi nhận có sự khác nhau về cường độ nhiễm giữa giai đoạn cá và các tỉnh thu mẫu. Ở cả 3 tỉnh, mẫu cá giống luôn có cường độ nhiễm cao hơn cá thịt. Tỷ lệ nhiễm giữa các ao cá giống ở Cần Thơ dao động từ 70,0-83,3%, cường độ nhiễm từ 1-181 bào nang/cá. Các ao cá giống ở An Giang có tỷ lệ nhiễm khá cao, chiếm từ 86,6-96,6% và cường độ nhiễm từ 1-129 bào nang/cá. Ao cá ở Vĩnh Long có tỷ lệ nhiễm từ 73,3-96,6% và cường độ nhiễm từ 1-83 bào nang/cá. Ngược lại, cường độ nhiễm ở các ao cá thịt thấp hơn cá giống, tỷ lệ nhiễm các ao thu ở Cần Thơ từ 66,6-86,6%, cường độ nhiễm từ 1-70 bào nang/cá. Tỷ lệ nhiễm trong các ao ở An Giang chiếm từ 46,6-86,6% và cường độ nhiễm từ 1-



44 bào nang/cá. Riêng các ao cá ở Vĩnh Long có tỉ lệ nhiễm từ 40-73,3% và cường độ nhiễm từ 1-76 bào nang/cá.

**Bảng 4.2: Cường độ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia**

Tỉnh	Giai đoạn cá	Tổng số mẫu	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)	CĐN (thấp-cao)
An Giang	Cá giống	150	139	92,6±5,5	1-129
	Cá thịt	30	20	66,6±28,3	1-44
Cần Thơ	Cá hương	30	28	93,3±0,0	2-14
	Cá giống	138	107	78,7±4,9	1-181
	Cá thịt	45	35	77,7±10,2	1-70
Vĩnh Long	Cá giống	140	121	88±9,0	1-83
	Cá thịt	45	22	51,1±19,2	1-76

*Ghi chú: CĐN: cường độ nhiễm Microsporidia (bào nang/cá)*

Nhìn chung, tỉ lệ nhiễm ở các ao cá giống dao động từ 70,0-96,6% và cường độ nhiễm từ 1-181 bào nang/cá. Trên cá nuôi thương phẩm, tỉ lệ nhiễm ở các ao thấp nhất là 40%, cao nhất là 86,6%; cường độ nhiễm từ 1-76 bào nang/cá. Kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy tỉ lệ nhiễm và cường độ nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia nhiễm trong cơ cá tra khá cao, điều này là do đề tài không thu mẫu ngẫu nhiên mà chỉ tập trung thu mẫu ở những ao đã nhiễm bệnh gạo, vì vậy mức độ nhiễm trong đề tài cao hơn kết quả ghi nhận tỷ lệ nhiễm (dao động từ 40,0-85,7%) và (cường độ nhiễm từ 0-9 bào nang/cá) của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011).

Qua kết quả phân tích cho thấy sự cần thiết trong kiểm tra dịch bệnh cá giống trước khi được thu mua để chuyển sang nuôi thịt nhằm đề phòng dịch bệnh do vi bào tử trùng gây ra, làm giảm chất lượng thịt cá và giá thành thu hoạch. Ngoài ra, các hộ ương nuôi cá giống cần áp dụng các quy trình kiểm soát nguồn nước và thức ăn, cần chú ý kiểm tra cá để phát hiện kịp thời loại bỏ cá nhiễm bệnh, tránh những thiệt hại lớn do vi bào tử trùng gây ra khi bùng phát bệnh.

#### **4.1.4 Kết quả phân tích mô bệnh học mẫu cơ cá tra nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia**

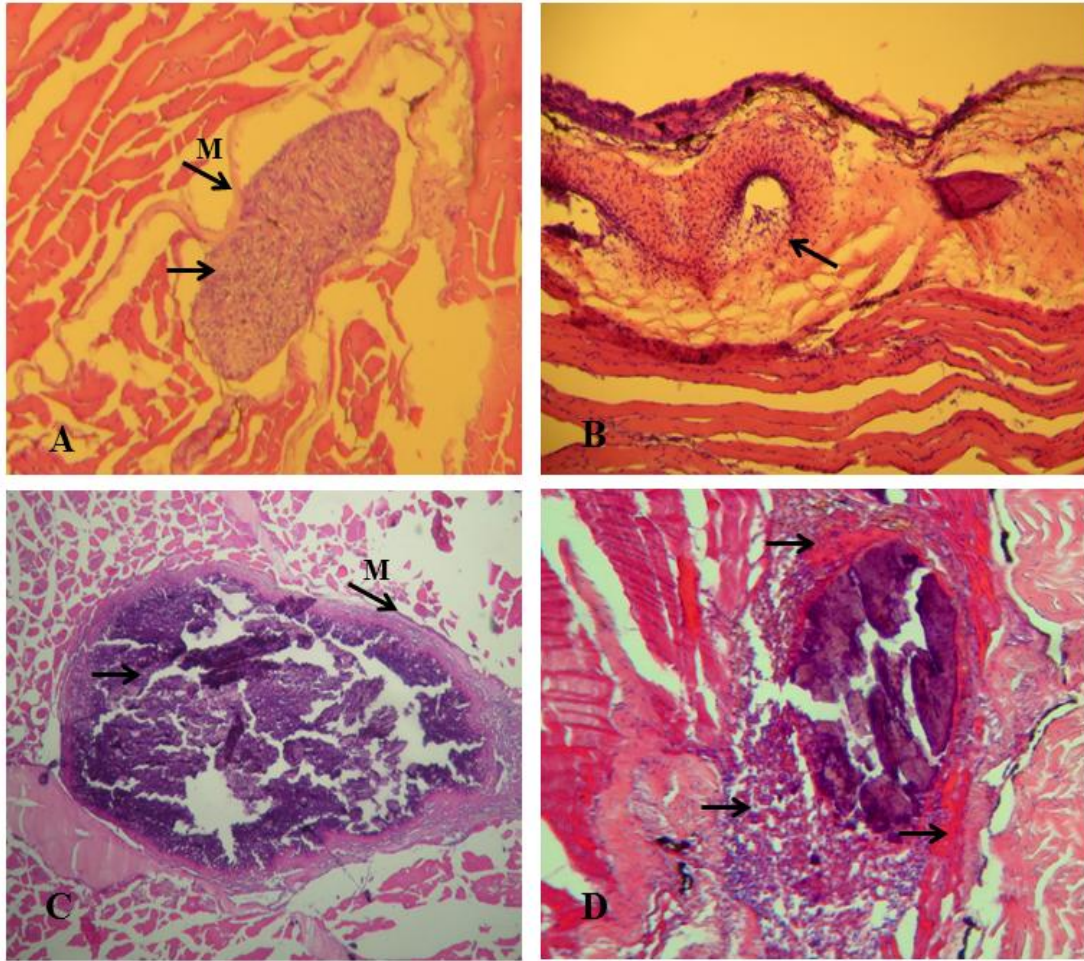
Mẫu cơ cá tra được phân tích mô học là loại cơ vân phân bố dọc hai bên thân cá. Tổng cộng có 195 mẫu mô cơ cá tra thu được từ các vùng cơ nhiễm bào

ngạo. Tuy nhiên, đề tài chọn ngẫu nhiên 65 mẫu cơ cá giống và cá thịt theo tỉ lệ mẫu thu được để phân tích mô học. Đặc điểm mô học được trình bày trong Bảng 4.3.

**Bảng 4.3: Đặc điểm mô học của cá bị nhiễm vi bào tử trùng theo từng giai đoạn cá**

Tỉnh	Giai đoạn	Số mẫu	Số mẫu cắt mô	Đặc điểm mô học
<b>Cần Thơ</b>	Cá giống	46	15	Hoại tử, mất cấu trúc tế bào, xuất hiện các bào nang tiên khởi
	Cá thịt	12	4	Hoại tử, vùng cơ bị ly giải, xuất hiện các bào nang tiên khởi
<b>Vĩnh Long</b>	Cá giống	44	15	Ly giải các tế bào cơ, màng bào nang dày, lan tỏa
	Cá thịt	9	3	Hoại tử, vùng cơ bị ly giải, xuất hiện các bào nang tiên khởi
<b>An Giang</b>	Cá giống	75	25	Xuất hiện các bào nang tiên khởi, ly giải vùng cơ bên trong bào nang, bào nang hình thoi, màng dày
	Cá thịt	9	3	Các bào nang hình thoi đến tròn, màng dày, lan tỏa nhiều hướng, bó cơ mất cấu trúc và bị phân hủy
<b>Tổng</b>		<b>195</b>	<b>65</b>	

Kết quả phân tích mô bệnh học của 65 mẫu mô cơ cá bị nhiễm bào nang gạo (Bảng 4.3) ghi nhận được hình dạng bào nang và cấu trúc mô cơ khi bị nhiễm bào tử. Đối với các bào nang mới hình thành có dạng hình tròn, kích thước đường kính từ 1-2 mm, bên trong bào nang chứa bào tử dày đặc, vùng mô cơ bị trương phồng và mất cấu trúc tế bào, bào nang lúc này được bảo vệ bởi một lớp màng mỏng, không có dấu hiệu xuất huyết xung quanh (Hình 4.12A và B). Trong khi đó, đối với các bào nang đã phát triển đến giai đoạn cuối, thì bào nang có dạng hình thoi thon dài hoặc đa giác, kích thước chiều dài từ 3-4 mm. Bào nang lúc này được bảo vệ bởi lớp màng dày, phần rìa lan tỏa. Bên trong bào nang, các cấu trúc mô cơ bắt đầu bị ly giải, phân rã và mật độ bào tử giảm thấp. Xung quanh bào nang lúc này xuất hiện các vùng cơ bị phân hủy (Hình 4.12C).



**Hình 4.12: Tiêu bản cắt mô cơ cá tra nhiễm bào nang gạo (20x)**

*A: Bào nang mới hình thành (mũi tên) - mô cá giống; B: Bào nang chứa các bào tử xuất hiện trên da của cá thịt; C: Bào nang ở giai đoạn cuối, mô cơ bị phân giải, màng bào nang rất dày (M); D: Bào tử trùng lây nhiễm qua vùng cơ lân cận, vùng cơ xuất huyết xung quanh bào nang - mô cá thịt*

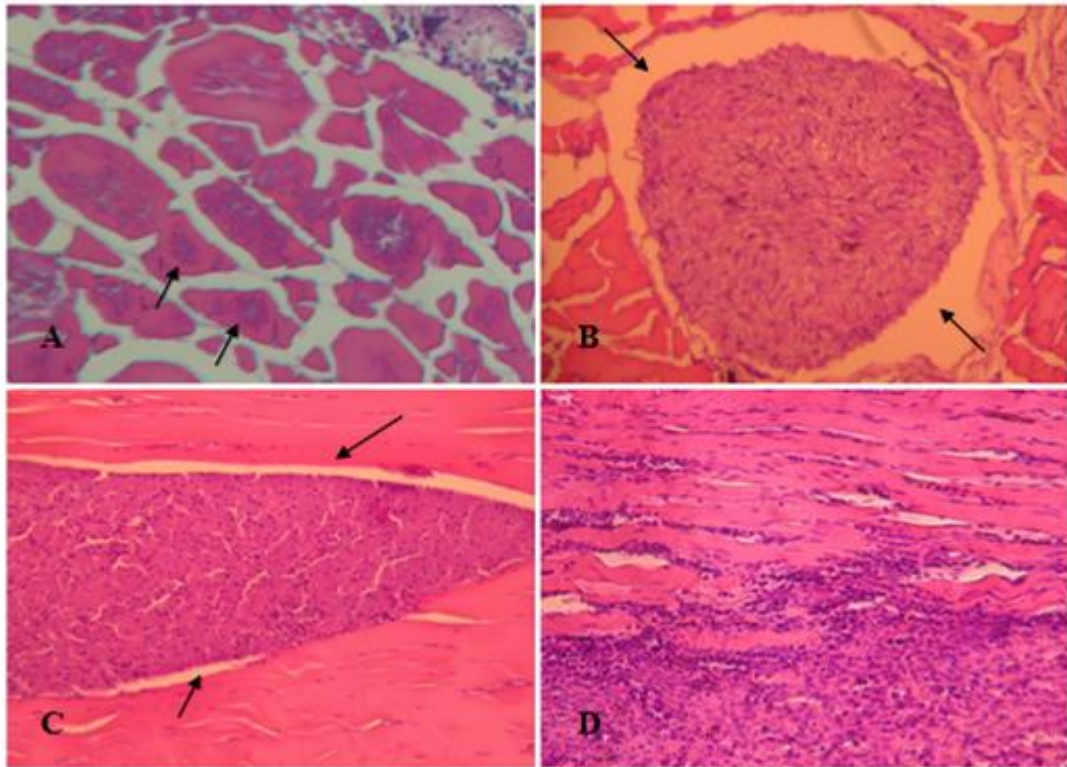
Quan sát ở tất cả các mẫu mô nhiễm trên cá thịt đều cho thấy sự xuất hiện của bào nang gạo trong cơ cá tra làm cho vùng cơ này bị mất cấu trúc và bên trong bào nang có dấu hiệu hoại tử, các tế bào mô bị vi bào tử ký sinh và bắt đầu bị ly giải hoàn toàn. Xung quanh các bào nang xuất hiện nhiều vùng xuất huyết và mất cấu trúc với mức độ nặng hơn khi vào sâu trong vùng cơ chứa bào nang. Những tổn thương về mặt cấu trúc này có thể phát triển nặng hơn, thường đối với cá thịt. Khi đó, chúng bắt đầu hình thành các bào nang trong lớp biểu mô của da, hình thành các vết loét hoặc các túi rỗng, dẫn đến da cá bị tổn thương, viêm loét, tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập gây bệnh (Hình 4.12D).

Tiêu bản mô Hình 4.13A cho thấy có sự xuất hiện bào nang tiên khởi (sporophorocyst) trong các bó cơ. Từ lát cắt của tiêu bản rất dễ dàng nhận thấy các bào nang tiên khởi bắt đầu hình thành ngay từ bên trong của các bó cơ vân. Bào nang ký sinh làm tổn thương nghiêm trọng cho các bó cơ vân, vì bào tử trùng được bào nang bảo vệ và chúng phát triển lớn dần bên trong bào nang. Tuy nhiên, quan sát kỹ có thể thấy các bào nang tiên khởi có mật độ bào tử rất ít và chúng chưa được bao bọc bởi màng liên kết dày. Các bào nang mới bắt đầu phân hủy các tế bào cơ trong từng sợi cơ, chưa gây ra các biểu hiện như xuất huyết và trương phồng các bó cơ. Vì vậy, khi cá nhiễm ở giai đoạn này thường không có các dấu hiệu bệnh lý, rất khó để chẩn đoán. Ngoài ra, ở giai đoạn khởi phát này không quan sát thấy sự xuất hiện các đại thực bào. Vì vậy, mức độ gây tổn thương mô học trong giai đoạn này thấp và bào tử dễ dàng bị tiêu diệt bởi các tác nhân lý hóa học từ bên ngoài.

Quan sát tiêu bản mô cắt ngang có thể thấy bên ngoài bào nang có một lớp màng là mô liên kết để bao bọc vi bào tử trùng *Microsporidia*, giúp bảo vệ các bào tử bên trong (Hình 4.13B và C). Khi nhuộm mẫu cơ với H và E thì bào tử sẽ bắt màu xanh tím của *Haematoxyline*. Ngoài ra, trong tiêu bản mô còn nhận thấy màng bao bọc bào nang gồm một lớp mô liên kết khá dày, chúng bao bọc bảo vệ xung quanh các vi bào tử trùng *Microsporidia* bên trong và tỏa rộng ra nhiều phía nối với các bó cơ để giữ vững chắc các bào nang này. Vì vậy, trong giai đoạn bào nang, các vi bào tử trùng *Microsporidia* rất khó bị tiêu diệt bởi các tác nhân vật lý hay hóa học từ bên ngoài.

Kết quả ghi nhận sự biến đổi cấu trúc mô học của đề tài khá tương đồng với các kết quả của nhiều nghiên cứu trước đây trên các loài cá nhiễm *Microsporidia* (Dykova và Lom, 1980; Shaw và Kent, 1999). Các tiêu bản mô cơ cho thấy bào tử hình thành từ bên trong tế bào, chúng tấn công và phân giải các thành phần của tế bào trong khi cấu trúc bên ngoài của các sợi cơ vẫn giữ nguyên vẹn. Các sợi cơ bị phá hủy nghiêm trọng trong một thời gian dài sau khi tất cả các tế bào chất của tế bào trong các sợi cơ bị phân giải. Trong giai đoạn cuối cùng, cấu trúc bên trong sợi cơ bị phá hủy hoàn toàn và được thay thế bằng

các bào tử, các bào tử nằm trong bào nang và được bảo vệ bởi chính màng sợi cơ đó.



**Hình 4.13: Tiêu bản cắt mô cơ cá tra nhiễm bào nang gạo (20x)**

*A: Bào nang tiên khởi (mũi tên) - mô cá giống; B và C: Bào nang chứa các bào tử với vùng cơ bị ly giải (mũi tên) - mô cá thịt; D: Vi bào tử trùng lây nhiễm qua vùng cơ lân cận, cơ mất cấu trúc và bị phân hủy - mô cá thịt*

Kết quả nghiên cứu đặc điểm mô bệnh học của đề tài tương tự với kết quả nghiên cứu mô học của Dykova và Lom (2000) trên cá *Pangasius sutchi* ở Thái Lan nhiễm loài *Kabatana arthuri*, các bào tử *K. Arthuri* gây ra những thay đổi thoái hóa nghiêm trọng trong các bó cơ xung quanh thân cá. Các dấu hiệu của sự hoại tử phát triển trong các sợi cơ và xung quanh các bào nang của bào tử. Tương tự, phản ứng miễn dịch của cá là hoạt động thực bào của các đại thực bào. Nghiên cứu cho thấy các đại thực bào chứa đầy các bào tử ở bên trong bào nang.

Nghiên cứu gần đây trên loài cá chình *Anguilla japonica* ở Hàn Quốc nhiễm *Heterosporis anguillarum* cũng ghi nhận sự xuất hiện các bào nang tiên khởi trong các sợi cơ ở giai đoạn đầu của quá trình nhiễm bệnh. Joh *et al.* (2007)

phát hiện quá trình ly giải các sợi cơ trên các tiêu bản mô cơ nhiễm bệnh và sự xuất hiện rải rác các bào nang tiên khởi với kích thước và hình dạng khác nhau bên trong các bó cơ. Các bào nang này chứa rất ít bào tử và chưa có màng bảo vệ. Ngoài ra, không có sự xuất hiện các đại thực bào bên trong các bào nang. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng ghi nhận có những bào nang tiên khởi bị phá hủy, giải phóng các bào tử ra bên ngoài và các đại thực bào xuất hiện để tiêu diệt chúng.

Nghiên cứu của Tourtip *et al.* (2009) ghi nhận một loài Microsporidia mới được phát hiện gây bệnh cá là loài *Enterocytozoon hepatopenaei*. Các kết quả ghi nhận được cũng cho thấy mức độ phá hủy cấu trúc tế bào củ *E. hepatopenaei* tương tự như những ghi nhận của đề tài. Kết quả cho thấy các bào tử xuất hiện trong các cấu trúc ưa acid bị giới hạn trong các không bào của tế bào chất, các tế bào dự trữ, phôi, fibrillar. Cấu trúc mô gan tụy bị phá hủy với số lượng lớn các bào tử của loài *Enterocytozoon hepatopenaei*. Tuy nhiên, ruột và các tế bào biểu mô ruột hoặc các tế bào của các mô và các cơ quan khác không bị ảnh hưởng. Phần mô học cho thấy nhiều giai đoạn phát triển của bào tử trong tế bào cơ cá.

Ngoài các trường hợp gây bệnh trên các loài cá, vi bào tử trùng cũng gây ra những biến đổi mô học nghiêm trọng trên tôm thẻ. Nghiên cứu mô bệnh học trên tôm thẻ *Litopenaeus vannamei* nhiễm vi bào tử trùng *Thelohania* sp. ghi nhận sự xâm nhiễm và gây hại của các bào tử *Thelohania* sp. ở nhiều cơ quan trọng của tôm như gan tụy, cơ vân, hạch bạch huyết, tế bào thần kinh, mang, tim và cả dạ dày. Tương tự như các trường hợp nhiễm *Kabatana* sp. trên cá tra, loài *Thelohania* sp. cũng hình thành các bào nang màu trắng, trương to trong các cấu trúc mô. Các bào nang này phá hủy cấu trúc các mô và phân hủy các tế bào mà chúng ký sinh trong đó. Ngoài ra, xung quanh các bào nang còn biểu hiện các dấu hiệu xuất huyết, viêm nhiễm do bội nhiễm vi khuẩn. Những kết quả này cho thấy rõ ràng mức độ nghiêm trọng của nhiễm vi bào tử trùng sẽ ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển và tồn tại của tôm thẻ chân trắng (Prasertsri *et al.*, 2009).

Nghiên cứu về bệnh gạo trên các tra ở ĐBSCL của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011) cũng ghi nhận các thay đổi cấu trúc mô học của các vùng bị xâm nhiễm. Các mẫu cơ cá tra nhiễm bào nang của *Microsporidia* được nhuộm Haematoxylin và Eosin. Kết quả phân tích mô bệnh học ghi nhận được hình dạng bào nang và vùng cơ bị hoại tử. Những thay đổi chính về mô học gây ra bởi *Microsporidia* được tìm thấy ở cơ bên, cơ lưng, cơ bụng. Hầu hết các khối cơ bên bị che kín bởi các bào tử. Những thay đổi nghiêm trọng về cấu trúc trong mô cơ đi kèm với sự nhân lên của *Microsporidia* và sự lây lan của sự truyền nhiễm đều chiếm ưu thế trong các mẫu được quan sát. Thêm vào đó sự thay đổi về cấu trúc của những sợi cơ đặc trưng như sự mất đi của những sợi cơ, hoại tử cơ được quan sát ở tất cả các giai đoạn phát triển cũng như ở ngoại vi thay vào đó tập hợp các bào tử không lồ tăng kích thước.

Tương tự loài *Kabatana* sp., loài *Nosema* sp. cũng gây ra các tổn thương cho tế bào cơ trơn và cả các tế bào biểu mô da, biểu mô thành ruột. Loài *Barbronia assiuti* được phát hiện nhiễm vi bào tử trùng *Nosema* sp. trong hầu hết các cơ quan quan trọng. Bào tử trưởng thành cũng hình thành các bào nang gây trương phồng các mô cơ quan. Trong đó, chúng hình thành các túi rỗng và xơ hóa làm thay đổi cấu trúc các mô cơ quan. Xung quanh các bào nang, kết quả mô bệnh học cũng quan sát thấy sự xuất hiện của các đại thực bào, các tế bào sắc tố và các tế bào sợi, để chống lại sự xâm nhiễm của các vi bào tử trùng *Nosema* sp. qua các tế bào khác (Gouda, 2013).

Nghiên cứu của West *et al.*, (2014) ghi nhận các đặc điểm mô bệnh học của loài cá *Danio rerio* nhiễm vi bào tử trùng *Pseudoloma neurophilia* cũng có những điểm tương đồng với loài *Kabatana* sp. Kết quả quan sát thấy các tổn thương như thoái hóa cấu trúc cơ, sự trương phồng của tế bào cơ, các vết hoại tử xung quanh và trong các bào nang chứa dày đặc bào tử. Xung quanh các bào nang còn xuất hiện các dấu hiệu viêm nhiễm của các tế bào cơ. Trong trường hợp nhiễm loài này, các mẫu mô bệnh học không xác định được sự xuất hiện của các bào nang tiên khởi cũng như các phản ứng miễn dịch là sự xuất hiện của các đại thực bào. Không giống như bào tử *Kabatana* sp., loài vi bào tử trùng này hình thành các bào nang có hình dạng không xác định và không có lớp màng

dày bảo vệ bên ngoài. Các bào tử xuất hiện dày đặc bên trong bào nang nhưng chúng không phân giải các bó cơ mà chỉ gây ra sự biến đổi tương tự ở các bó cơ xung quanh bào nang.

Các đặc điểm biến đổi cấu trúc cơ cũng xảy ra tương tự ở các loài rắn biển (*Hydrophiinae*) khi nhiễm vi bào tử trùng *Heterosporis anguillarum*. Nghiên cứu của Gillet *et al.* (2016) trên loài rắn biển cho thấy *H. anguillarum* nhiễm trên các nhóm cơ trơn dọc hai bên thân, nhiễm trong xương, gây ra hiện tượng gãy xương và thoái hóa các đốt sống. Kết quả phân tích mô bệnh học cho thấy sự thoái hóa và phân hủy của các sợi cơ bị nhiễm bào tử *H. anguillarum*. Các bào tử hình thành các bào nang trong cơ rắn biển được bảo vệ bởi một lớp màng mỏng chứ không dày như đối với loài *Kabatana* sp. gây ra trên cá tra. Các bào tử có dạng hình trứng và kích thước trong khoảng 2,0-2,6x1,0-1,5  $\mu\text{m}$ . Các mẫu mô bệnh học cũng có sự xuất hiện của các đại thực bào và bạch cầu trung tính nằm rải rác trong các bào nang với mật độ bào tử dày đặc. Trong trường hợp nhiễm bệnh, không có các biểu hiện xuất huyết xung quanh các bào nang, tuy nhiên các bào nang gây trương phồng và thay đổi cấu trúc của da, cơ và xương của các cá thể nhiễm bệnh.

Tóm lại: những biến đổi mô học của cá tra nhiễm vi bào tử trùng *Microsporidia* ở các giai đoạn cá giống và cá nuôi thương phẩm giống nhau. So sánh với các kết quả được công bố trước đây ở khía cạnh mô bệnh học cho thấy mức độ gây hại nghiêm trọng của vi bào tử trùng *Microsporidia* đối với cấu trúc các mô cơ của cá. Tuy nhiên, qua những kết quả này cũng đã mở ra khả năng điều trị hiệu quả nếu như phát hiện sớm sự lây nhiễm của vi bào tử trùng *Microsporidia* trong cơ cá ở giai đoạn hình thành bào nang tiên khởi.

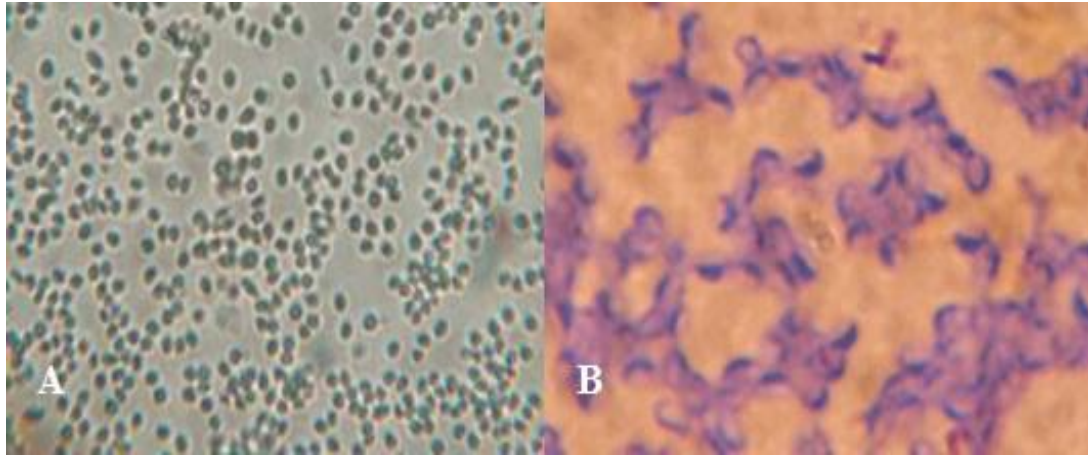
#### **4.1.5 Kết quả định danh bào tử trùng *Microsporidia* nhiễm trong cơ cá tra**

##### ***4.1.5.1 Xác định đặc điểm hình thái***

Kết quả quan sát tiêu bản tươi cho thấy các bào tử có cấu tạo bên ngoài dạng hình quả lê hoặc hình trứng, hơi thon nhỏ ở cả 2 đầu. Các bào tử này có kích thước rất nhỏ, nhỏ hơn gần 10 lần so với kích thước của các loài vi bào tử trùng khác (Hình 4.14A). Bên trong có thể quan sát thấy 1 sợi cực dạng xoắn



nối liền với 1 cực nang ở phần sau của bào tử. Số vòng xoắn của sợi cực khá nhiều nên rất khó phân biệt được sợi cực khi quan sát ở cùng một thị trường kính hiển vi. Ngoài ra, bên dưới sợi cực có không bào với kích thước nhỏ. Quan sát tiêu bản nhuộm Giemsa ở vật kính 100X nhận thấy phần cực nang của các bào tử bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm Giemsa (Hình 4.14B).



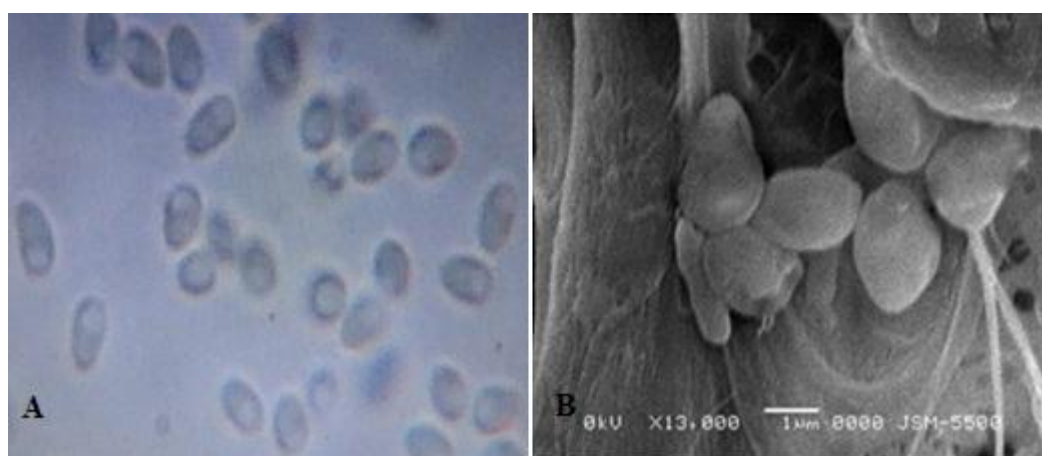
**Hình 4.14: (A) mẫu soi tươi - 40x; (B) mẫu nhuộm Giemsa - 100x**

Nhìn chung, qua kết quả soi tươi, dựa vào khóa phân loại và mô tả và của Lom và Dykova (1992), Woo (2006) và Barber *et al.* (2009) có thể xác định vi bào tử trùng ký sinh trong bào nang gạo ở cơ các tra thuộc giống vi bào tử trùng *Kabatana*.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu ghi nhận sự hiện diện của giống *Kabatana* trong cơ cá. Kết quả phân tích hình thái vi bào tử trùng của đề tài khá tương đồng với kết quả của nhiều nghiên cứu trước đây ghi nhận trên giống vi bào tử trùng này. Theo Lom *et al.* (2001), Dykova và Lom (2000), *Kabatana* sp. nội ký sinh trong các mô cơ vân, cơ trơn của cá, bào tử có kích thước nhỏ nhất (dao động từ 2x3  $\mu\text{m}$ ) trong nhóm vi bào tử trùng. Không bào có kích thước khá nhỏ, chiều dài bằng 1/3 chiều dài bào tử. Ngoài ra, số vòng xoắn của sợi cực là 4-7 vòng xoắn. *Kabatana* sp. tạo những bào nang hình thoi, màu trắng đục, kích thước từ 1,5-6,0 mm bên trong các sợi cơ của cá (Sprague *et al.*, 1992; Lom và Nilsen, 2003).

**Bảng 4.4: Đặc điểm của bào tử *Kabatana* sp.gây bệnh gạo trên cá tra**

Chỉ tiêu	Đặc điểm
Hình dạng bào tử	Hình trứng, quả lê
Chiều dài bào tử	3,1±1,5 µm
Đường kính bào tử	2,3±1,2 µm
Sợi cực của bào tử	Cấu tạo liền mạch, xoắn và khó phân biệt rõ
Không bào của bào tử	Nhỏ, chiếm 1/3 chiều dài bào tử
Bào nang	Hình thoi hoặc bầu dục
Màu sắc bào nang	Màu trắng sữa, vàng kem
Kích thước bào nang	0,5-10,0 mm



**Hình 4.15: Cấu trúc của bào tử *Kabatana* sp. (A) mẫu tươi - 200x và (B) mẫu chụp trên kính hiển vi điện tử SEM**

Kết quả tổng hợp của các tác giả Sprague (1992), Lom và Nilsen (2003), Lom và Dykova (2005), Weiss và Becnel (2014), cho thấy giống vi bào tử trùng *Kabatana* là giống nội ký sinh trong cơ của cá có kích thước nhỏ nhất trong tất cả các giống vi bào tử trùng. Cấu tạo bên ngoài của bào tử *Kabatana* sp. có màng gồm 3 lớp: vách ngoại bào, vách nội bào trong suốt ở giữa và 1 màng plasma trong cùng; cấu tạo bên trong gồm có: cực nang, bên trong có sợi cực xoắn dạng cuộn lò xo, phần đỉnh của bào tử là 1 lớp đĩa neo, nhân tế bào và không bào ở phía sau. Giống vi bào tử trùng này được ghi nhận gây bệnh nguy hiểm trên nhiều loài cá nuôi tại Nhật Bản và các loài cá biển (Woo, 2006; Lom

*et al.*, 2001). Bên cạnh đó, theo những kết quả phân tích cho thấy loài vi bào tử trùng này gây bệnh khá phổ biến cho đàn cá hồi ở giai đoạn cá giống từ 10-30 ngày tuổi, với tỷ lệ chết rất cao từ 70-90% đàn cá (Lom và Dykova, 2005).

Theo tổng hợp của Weiss và Becnel (2014), các giống vi bào tử trùng *Microsporidia* thường lây nhiễm trong các mô cơ của cá được ghi nhận đến thời điểm hiện nay gồm 4 giống là *Pleistophora*, *Heterosporis*, *Kabatana* và *Microsporidium*. Nghiên cứu cho rằng đặc điểm chính phân biệt các bào tử trưởng thành thuộc các giống khác nhau là ở kích thước, thành tế bào dày, sợi cực xoắn nhiều vòng, không bào và cấu tạo cũng như màu sắc của các bào nang. Giống *Pleistophora* sp. thường có bào nang hình thoi, màu vàng đến nâu sậm nằm trong cơ của cá, kích thước trong khoảng 3-6 mm. Các bào tử giống *Pleistophora* thường có dạng hình trứng hoặc quả lê và không bào rất to chiếm 2/3 chiều dài của bào tử. Kích thước của bào tử khá lớn thường từ 3,5x7,5  $\mu\text{m}$ . Sợi cực của các bào tử này xoắn từ 20-24 vòng (Abdel-Ghaffar *et al.*, 2011; Alde-Baki *et al.*, 2012; Weiss và Becnel, 2014).

Tương tự, các bào tử giống *Heterosporis* sp. và *Microsporidium* sp. có kích thước cũng khá lớn. Chiều dài của chúng được ghi nhận từ 4-7  $\mu\text{m}$ , đường kính từ 3,1-4,1  $\mu\text{m}$ . Tương tự *Pleistophora* sp., *Heterosporis* sp. và *Microsporidium* sp. thường có không bào rất to, chiếm 2/3 chiều dài của bào tử, sợi cực xoắn ít từ 2-3 vòng xoắn nên rất dễ quan sát được dưới kính hiển vi 100x. Hai giống vi bào tử trùng này thường gây bệnh trên các loài cá nước mặn, ở nhiệt độ từ 18-20°C. Chúng tạo thành các chấm tròn màu xám có thể quan sát rõ trên qua bề mặt da của cá (Lom và Dykova, 2005; Woo, 2006; Barber *et al.*, 2009; Weiss và Becnel, 2014).

Giống *Kabatana* với nhiều điểm khác biệt đáng chú ý. Đó là kích thước nhỏ nhất, dao động từ 2x3  $\mu\text{m}$ , cùng với không bào nhỏ, chiếm khoảng 1/3 chiều dài bào tử. Tương tự giống *Heterosporis* và *Microsporidium*, các bào tử dạng này cũng có cấu tạo sợi cực xoắn, nhưng xoắn từ 4-7 vòng nên rất khó phân biệt được các vòng xoắn (Lom *et al.*, 1999; Woo, 2006; Barber *et al.*, 2009; Weiss và Becnel, 2014). Đặc biệt là các loài thuộc giống *Kabatana* tạo ra những bào

nang hình thoi, màu trắng đục, kích thước từ 1,5-6,0 mm bên trong các sợi cơ của cá. Theo mô tả của Lom *et al.* (1999), Dykova và Lom (2000) và Weiss và Becnel (2014) cho thấy chúng thường ký sinh trong các nhóm cơ vân dọc theo cơ quan đường bên của cá. Ngoài ra, chúng không gây ra các dấu hiệu bệnh lý đặc biệt bên ngoài cơ thể.

Nhiều nghiên cứu ghi nhận sự hiện diện của giống *Kabatana* trong cơ của cá. Kết quả nghiên cứu của Dykova và Lom (2000) khi phân lập ký sinh trùng gây bệnh trong cơ của loài cá *Pangasius sutchi* ở Thái Lan, cho thấy loài vi bào tử trùng *Kabatana arthuri* xâm nhiễm trong các cơ vân của loài cá này. Các bào tử của loài này có các đặc điểm hình thái như: có dạng hình tròn, đơn nhân, kích thước trung bình khoảng 1,9x3,1  $\mu\text{m}$ . Sợi cực có từ 4-6 vòng xoắn khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử. Các bào tử này tạo thành các bào nang trương to phá hủy nghiêm trọng các sợi cơ của cá.

Loài *Kabatana seriolae* (Egusa, 1982) cũng được Lom *et al.* (2001) ghi nhận là tác nhân gây ra các bào nang trắng đục trong cơ của loài cá cam *Seriola quinqueradiata* ở Nhật Bản. Loài vi bào tử trùng này tồn tại ở dạng bào tử có kích thước nhỏ, dao động trong khoảng 2,2x3,3  $\mu\text{m}$  với các không bào khá nhỏ, sợi cực xoắn từ 4-7 vòng. Tương tự như các loài thuộc giống *Kabatana*, loài *K. seriolae* gây bệnh phổ biến trong các nhóm cơ vân dọc theo đường bên của cá. Ngoài ra, chúng cũng được tìm thấy là gây hại trong cơ tim và cơ tron với kích thước nhỏ hơn (1,2x2,2  $\mu\text{m}$ ).

Những ghi nhận của Barber *et al.* (2009) cho thấy loài *Kabatana* sp. là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng trên loài cá bống *Gobiusculus flavescens* ở Đại Tây Dương. Kết quả nghiên cứu cũng ghi nhận sự lây nhiễm phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ môi trường. Ký sinh trùng phát triển tốt ở 18°C và ngừng phát triển ở 8°C. Các bào tử hình trứng, kích thước khoảng 2,3x3,7  $\mu\text{m}$ .

Dựa vào kết quả của các nghiên cứu trước đây, kết quả quan sát hình thái vi bào tử trùng nhiễm trong cơ cá tra thuộc giống *Kabatana* là hoàn toàn phù hợp. Tuy nhiên để có được kết quả chính xác nhất thì cần phải áp dụng các kỹ

thuật công nghệ sinh học phân tử để xác định kiểu gen của vi bào tử trùng nhằm xác định thành phần giống loài một cách chính xác.

#### 4.1.5.2 Kết quả định danh bằng PCR

Vi bào tử trùng Microsporidia là nhóm sinh vật đơn bào, hầu hết có kích thước rất nhỏ. Trong cùng 1 loài, cấu tạo của bào tử có xu hướng ổn định, tuy nhiên trong từng giai đoạn của chu kỳ sống, chúng sẽ tạo ra các dạng bào tử khác nhau. Vì vậy, những phương pháp nhận dạng, phân loại định danh dựa vào các kỹ thuật kính hiển vi, mô bệnh học thường rất khó xác định và độ chính xác thấp.

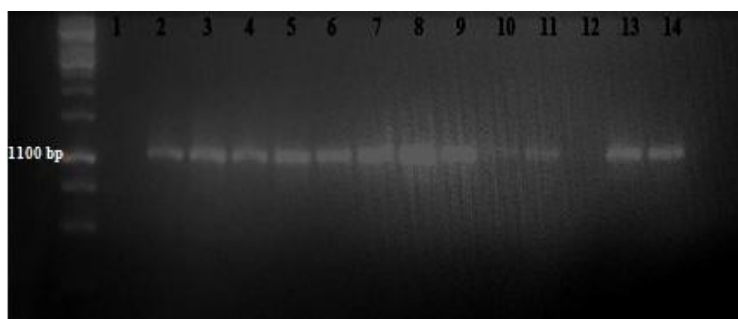
Mười hai mẫu cơ cá tra (gồm cá hương, cá giống và cá thịt) có nhiễm và không nhiễm vi bào tử trùng (nhiễm bào nang gạo) được chọn ngẫu nhiên để phân tích PCR (Bảng 4.5)

**Bảng 4.5: Đặc điểm mẫu phân tích PCR**

Tỉnh	Giai đoạn	Số mẫu PCR	Giếng(G)	Đặc điểm
Cần Thơ	Cá hương	1	3	Cơ có bào nang
	Cá giống	2	4,10	Cơ có (G4) và không có bào nang (G10)
	Cá thịt	1	5	Cơ có bào nang
Vĩnh Long	Cá giống	2	6, 7	Cơ có bào nang
	Cá thịt	2	8,11	Cơ có (G8) và không có bào nang (G11)
An Giang	Cá giống	2	9, 13	Cơ có bào nang
	Cá thịt	2	12, 14	Cơ có (G14) và không có bào nang (G12)
<b>Tổng</b>		<b>12</b>		

Mẫu được chiết tách DNA và phân tích PCR sử dụng mồi HG4F và HG4R đặc hiệu cho Microsporidia. Tổng cộng có 9 mẫu chứa bào nang gạo ở các giếng 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14 và 3 mẫu ở vùng cơ không chứa bào nang gạo (các giếng 10, 11, 12). Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 4.16) cho thấy có 9 mẫu chứa bào nang cho kết quả dương tính và hiện vạch ở vị trí 1100 bp. Trong khi đó, mẫu 10 (CT-T-A4-M25) và mẫu 11 (VL-T-A4-M9) có hiện vạch rất mờ ở vị trí 1100bp và mẫu 12 (VL-T-A5-M1) cho kết quả PCR âm tính (không hiện vạch).

Kết quả PCR ở 2 giếng 10 và 11 là mẫu cơ không có bào nang gạo, tuy nhiên, vẫn có vạch hiện ở vị trí 1.100 bp khá mờ, điều này cho thấy có thể trong mẫu cơ vẫn có vi bào tử Microsporidia ký sinh ở mật độ rất thấp. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích mô học ở phần trên, vì các mẫu cơ này có thể nhiễm Microsporidia trong giai đoạn đầu (giai đoạn nhiễm bào tử tiên khởi) nên chưa hình thành bào nang gạo. Sự phá hủy cấu trúc song song với sự phát sinh bào tử mới diễn ra bên trong các bó cơ và không làm thay đổi hình dạng của các bó cơ. Vì vậy, rất khó có thể phát hiện được các cá thể nhiễm bệnh trong giai đoạn đầu bằng phương pháp soi tươi dưới kính hiển vi. Tuy nhiên, phương pháp PCR khuếch đại vùng gen đặc hiệu của Microsporidia được sử dụng đã phát hiện mẫu nhiễm bệnh mặc dù mẫu cơ chưa có dấu hiệu hình thành bào nang.



#### **Hình 4.16: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện Microsporidia**

*Giếng M: thang đo; Giếng 1: Đối chứng âm; Giếng 2: Đối chứng dương; Giếng 3: CT-H-B1-M5; Giếng 4: CT-H-B1-M9; Giếng 5: CT-G-A2-M30; Giếng 6: VL-G-A1-M27; Giếng 7: VL-G-A2-M21; Giếng 8: AG-G-A1-M12; Giếng 9: AG-G-A2-M1; Giếng 10: CT-T-A4-M25 ; Giếng 11: VL-T-A4-M9; Giếng 12: VL-T-A5-M1; Giếng 13: AG-T-A4-M5 ; Giếng 14: AG-T-A4-M14*

Kết quả PCR cho thấy có thể sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện sớm mẫu cá giống nhiễm Microsporidia nhằm hạn chế sự bùng phát bệnh gạo do Microsporidia trong quá trình nuôi. Kỹ thuật PCR có thể phát hiện sớm cá nuôi thương phẩm nhiễm Microsporidia trong giai đoạn khởi phát để có hướng điều trị bệnh hiệu quả. Theo kết quả nghiên cứu của một số tác giả ngoài nước, phương pháp PCR đã được ứng dụng để phát hiện mầm bệnh Microsporidia nhiễm trên cá nuôi ở giai đoạn sớm để có biện pháp phòng trị hiệu quả hơn.

Điển hình là nghiên cứu của Fedorko *et al.* (1995) đã thực hiện thành công quy trình PCR phát hiện 4 loài vi bào tử trùng gồm: *Encephalitozoon*

*cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozoon bieneusi* và *Septata intestinalis* trong các mẫu lâm sàng. Ngoài ra, các loài vi bào tử trùng gây bệnh phổ biến khác trên cá là *Glugea anomala*, *Glugea stephani*, *Glugea americanus* và loài *Spraguea lophii* cũng đã được chẩn đoán/phát hiện bằng quy trình PCR của Pomport-Castillon *et al.* (2000). Kết quả cho thấy việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử đã đạt nhiều kết quả tốt trong việc phát hiện Microsporidia thuộc giống *Enterocytozoon* và *Encephalitozoon* từ các mẫu tươi hoặc mẫu đã qua xử lý Formaline, có độ nhạy rất cao trong khoảng  $10^2$ - $10^3$  bào tử/ml.

Theo Barber *et al.* (2009), quy trình PCR được áp dụng đạt kết quả cao để chẩn đoán vi bào tử trùng *Kabatana* sp. trong cơ của loài cá bống *Gobiusculus flavescens* ở Đại Tây Dương. phát hiện mẫu nhiễm vi bào tử trùng ở vạch 1352 bp. Từ đó giúp chẩn đoán chính xác các mẫu cá nhiễm bệnh trong quá trình sản xuất.

Tương tự, Abdel-Baki *et al.* (2015) áp dụng thành công kỹ thuật PCR trong việc chẩn đoán các mẫu cá *Cephalopholis hemistiktos* nhiễm loài *Glugea nagelia* trong thành ruột với sản phẩm khuếch đại PCR khoảng 900-1100 bp. Cùng thời điểm này, nghiên cứu của Freeman *et al.* (2015) cũng cho thấy hiệu quả chính xác của quy trình PCR trong chẩn đoán các mẫu cá bống *Trypauchen vagina* nhiễm vi bào tử trùng *Microgemma tilanpasiri* ở Malaysia. Thông qua kết quả PCR của đề tài, có thể thấy được khả năng ứng dụng kỹ thuật PCR để phát hiện sớm mẫu cá tra ở giai đoạn cá hương và cá giống nhiễm Microsporidia nhằm hạn chế sự bùng phát bệnh gạo do Microsporidia trong quá trình nuôi. Ngoài ra, kỹ thuật PCR có thể phát hiện sớm cá nuôi thương phẩm nhiễm Microsporidia trong giai đoạn khởi phát để có hướng điều trị bệnh hiệu quả.

#### **4.1.5.3 Định danh vi bào tử trùng dựa vào kết quả giải trình tự gen**

Để xác định chính xác thành phần giống loài vi bào tử trùng Microsporidia ký sinh trong bào nang gạo của cá tra, thông qua kết quả điện di, đề tài chọn 5 mẫu đã khuếch đại PCR có thể hiện vạch tương đối rõ ở 1100 bp (Giếng 3, 5, 8, 9, 13) để giải trình tự sản phẩm PCR. Kết quả so sánh chi tiết được trình bày trong Bảng 4.6.

**Bảng 4.6: Kết quả so sánh trình tự gen của vi bào tử trùng gây bệnh trên cá tra với các kiểu gen trong Ngân hàng Gen (GenBank)**

Ký hiệu mẫu	Số nucleotide	Độ tương đồng (%)	Tên loài đăng ký	Số đăng ký
1F	836	84	<i>Kabatana</i> sp. GC2009a	FJ843105.1
11F	861	91	<i>Kabatana</i> sp. JI-2008	EU682928.1
12R	841	84	<i>Kabatana</i> sp. GC2009a	FJ843105.1
3R	879	84	<i>Kabatana</i> sp. GC2009a	FJ843105.1
7R	854	97	<i>Kabatana</i> sp. JS-2012	JQ062989.1

Trình tự các đoạn gen được so sánh với dữ liệu gen (của các loài sinh vật) đã công bố trong Ngân hàng gen bằng chương trình BLASTN. Kết quả nhận được cho thấy đoạn gen này của vi bào tử trùng *Microsporidia* phân lập từ cá bệnh gạo có độ tương đồng 84-97% so với trình tự gen của loài *Kabatana* sp. Do kết quả giải trình tự nucleotide của các mẫu thấp nên không xác định chính xác tên khoa học của loài. Vì vậy, theo kết quả so sánh có thể nhận thấy vi bào tử trùng phân lập từ cá bệnh gạo là *Kabatana* sp.

Kỹ thuật giải trình tự gen đã được ứng dụng nhằm đem lại kết quả chẩn đoán nhanh và chính xác nhất. Đã có rất nhiều nghiên cứu áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen của vi bào tử trùng để định danh loài gây bệnh và nhiều nghiên cứu chuyên sâu hơn về sự biến đổi gen của chúng. Ở sinh vật, vật liệu di truyền có trong nhân và một số ít trong ty thể. Do ty thể nằm trong tế bào chất nên các gene trên DNA ty thể (mtDNA) tuân theo quy luật di truyền theo tế bào chất. mtDNA ít bị tác động của môi trường nên ít bị biến dị di truyền. Đặc biệt là vùng mã hóa các phân tử ribosomal RNA (16S rRNA và 12S rRNA), cytochrome b, rất được quan tâm ứng dụng phục vụ trong công tác nghiên cứu sự phát sinh loài và định danh loài do chúng có tính bảo tồn cao và kích thước vừa phải, thuận lợi cho việc phân lập, giải trình tự và phân tích trình tự vật liệu di truyền (Khuất Hữu Thanh, 2006).



Tương tự kết quả của đề tài, nghiên cứu của McGourty *et al.* (2006) cũng đã phân lập, định danh nhanh và chính xác loài vi bào tử trùng ký sinh trên cá bống *Eucyclogobius newberry*. Kỹ thuật giải trình tự DNA ty thể của vi bào tử trùng gây bệnh được áp dụng từ sản phẩm PCR có khối lượng phân tử là 1400bp. Trình tự DNA thu được khi so sánh với các kiểu gen trên ngân hàng gen thế giới (GenBank) đã giúp xác định được loài vi bào tử trùng gây bệnh là loài *Kabatana newberri* với tỷ lệ tương đồng khoảng 85%. Ngoài ra, cặp mồi được thiết kế chuyên biệt để khuếch đại vùng 16S trên mtDNA, sau đó giải trình tự và xây dựng cây phát sinh loài để quan sát sự đa dạng về di truyền của các giống loài. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ tương đồng rất cao về kiểu gen của loài này với loài *K. takedai* và loài *K. seriolae* ở những vùng địa lý khác.

Nghiên cứu của Abdel-Ghaffar *et al.* (2011) thực hiện khảo sát trên 103 mẫu cá *Saurida tumbil* nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia. Phân tích sinh học phân tử dựa trên trình tự gen của tiểu đơn vị nhỏ rDNA đã được thực hiện để xác định vị trí phát sinh loài của giống *Pleistophora*. Kết quả so sánh trình tự gen cho thấy 8 loài thuộc giống *Pleistophora* có mức độ tương đồng cao (>92%) trong kiểu gen. So sánh các trình tự nucleotide cho thấy rằng các trình tự nucleotide của vi bào tử trùng tương đồng với kiểu gen của loài *Pleistophora anguillarum* (99,8%), chỉ khác nhau 13 vị trí trong trình tự nucleotide. Vì vậy, loài này được ghi nhận và phân loại như là một loài mới của giống *Pleistophora*.

Nghiên cứu của Mladineo và Lovy (2011) cũng cho thấy tính chính xác và hiệu quả của phương pháp giải trình tự gen trong phân loại và định danh vi bào tử trùng. Tương tự đề tài này, nghiên cứu của tác giả cũng áp dụng các phương pháp định danh bằng hình thái, thông qua kính hiển vi điện tử. Tuy nhiên những biến đổi hình thái để thích nghi với môi trường của vi bào tử trùng đã gây khó khăn cho việc xác định chính xác loài gây bệnh trên loài cá ngừ vây xanh Đại Tây Dương (*Thunnus thynnus*). Phương pháp giải trình tự gen vùng mã hóa 16S rRNA đã giúp xác định loài nhanh chóng hơn. Từ sản phẩm PCR có khối lượng phân tử 813 bp, các trình tự nucleotide được ghi nhận và so sánh với các kiểu gen của ngân hàng gen. Kết quả cho thấy loài này có nhiều điểm tương đồng về hình thái so với loài *Kabatana takedai*, tuy nhiên kiểu gen lại

không tương đồng. Loài vi bào tử trùng *Microsporidium milevae* được xác định là có mức tương đồng về kiểu gen cao (>90%). Cây phát sinh loài được xây dựng và cho thấy mức độ tương đồng rất cao về kiểu gen của loài này với loài *K. takedai* và loài *K. newsberryi*, *M. cypselurus* gây bệnh trên các loài cá khác.

Nghiên cứu của Morsy *et al.* (2012) cũng đã áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phân loại và định danh loài vi bào tử trùng gây bệnh trên cá *Pagrus pagrus* ở Ai Cập. Quan sát đặc điểm hình thái được thực hiện nhằm phân loại đến giống của vi bào tử trùng. Kết quả xác định đây là giống *Pleistophora*. Tuy nhiên, không thể phân biệt loài chỉ dựa vào hình thái. Các kết quả giải trình tự gen SSU rDNA đã cho thấy loài vi bào tử trùng này có kiểu gen tương đồng rất cao (97,8%) so với loài *Pleistophora hypheobryconis*, nhưng về đặc điểm hình thái thì không tương đồng. Cây phát sinh loài được xây dựng, nghiên cứu đã xác định đây là một loài vi bào tử trùng gây bệnh có tên khoa học là *Pleistophora pagri* với số đăng ký trên ngân hàng gen là JF797622.

Một loài vi bào tử trùng mới cũng được ghi nhận dựa vào phương pháp giải trình tự gen 16S rDNA. Nghiên cứu của Abdel-Baki *et al.* (2015) thực hiện giải trình tự gen của 25 mẫu vi bào tử trùng gây bệnh trên loài cá *Cephalopholis hemistiktos* ở Biển Đỏ. Kết quả phân tích hình thái bằng kính hiển vi điện tử cho thấy đây là giống *Glugea*. Đồng thời, kết quả giải trình tự gen sản phẩm PCR (900-1100 bp) lại cho kết quả tương đồng rất cao 99% với loài *Glugea* sp. gây bệnh trên cá song *Epinephelus awoara*. Qua việc xây dựng cây phát sinh loài và so sánh mức độ tương đồng trong kiểu gen. Loài vi bào tử trùng mới có tên khoa học là *Glugea nagelia* được ghi nhận.

Tương tự, một loài vi bào tử trùng mới phát sinh gây bệnh trên loài cá nước ngọt ở Brasil đã được ghi nhận dựa vào kỹ thuật giải trình tự gen và các phân tích về hình thái. Nghiên cứu của Videira *et al.* (2015), phân lập được loài ký sinh trùng gây bệnh trên loài cá *Aequidens plagiognathus*. Các phân tích về hình thái gặp khó khăn vì các đặc điểm hình thái rất khó để xác định chính xác. Tuy nhiên, kết quả giải trình tự đã cho thấy vi bào tử trùng có nhiều tương đồng trong kiểu gen của họ Spragueidae và Tetramicridae. Kết hợp các đặc điểm về

hình thái và trình tự nucleotide trong kiểu gen, nghiên cứu đã xác định được đây là loài *Potasporea aequidens*.

Tóm lại, từ những kết quả của các nghiên cứu trước đây kết hợp với đặc điểm hình thái của vi bào tử (đã nêu ở phần trên) cho thấy kết quả định danh giống vi bào tử trùng nhiễm trong cơ cá tra là loài *Kabatana* sp. là hoàn toàn phù hợp. Ngoài ra, những ghi nhận trên và kết quả phân lập của đề tài cho thấy loài vi bào tử trùng *Kabatana* sp. đã có sự mở rộng phổ loài cảm nhiễm trên các đối tượng cá nuôi tại ĐBSCL hiện nay và sự cần thiết trong quản lý dịch bệnh ngay từ giai đoạn cá giống nhằm hạn chế tác hại của dịch bệnh.

#### 4.2 Nghiên cứu kỹ thuật nuôi cấy vi bào tử trùng *Kabatana* sp.

##### 4.2.1 Mật độ và tỉ lệ sống của vi bào tử trùng trong bào nang gạo cá tra

Sử dụng phương pháp đếm mật độ bào tử trên buồng đếm hồng cầu. Đề tài đã xác định được mật độ trung bình và tỉ lệ sống trung bình của vi bào tử *Kabatana* sp. trong từng bào nang gạo. Kết quả khảo sát chỉ tiêu này cho thấy có sự thay đổi mật độ bào tử khác nhau phụ thuộc vào kích thước và màu sắc của bào nang gạo nhiễm trên cá tra, có 4 nhóm kích cỡ nang gạo nhiễm trên cá hương, cá giống và cá thịt (Bảng 4.7).

**Bảng 4.7: Mật độ, tỉ lệ sống bào tử trong bào nang gạo**

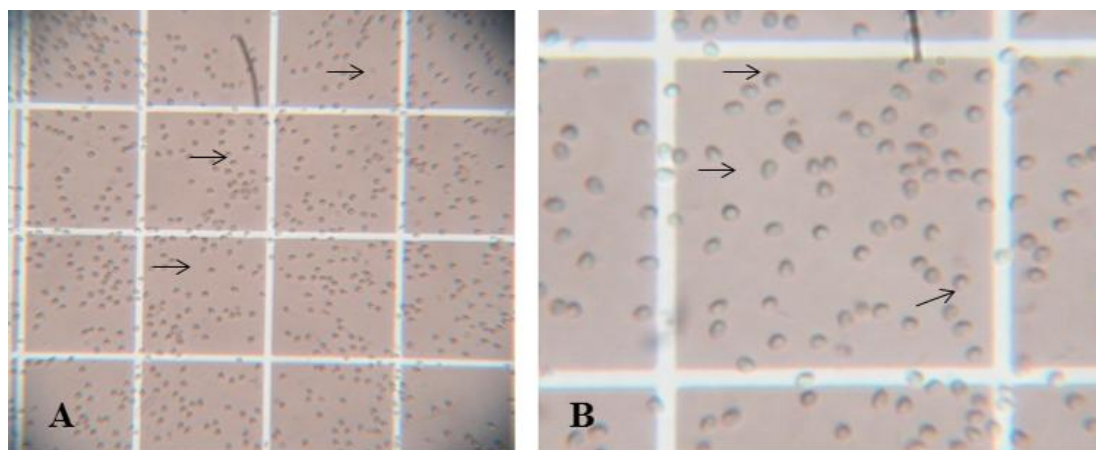
Kích thước bào nang (mm)	Màu sắc bào nang	Giai đoạn cá	Mật độ bào tử/bào nang	Tỉ lệ sống (%)
<1	Trắng đục	Giống	$0,11 \pm 0,03 \times 10^{6a}$	100
1-1,4	Trắng đục	Hương, giống	$2,71 \pm 1,83 \times 10^{6b}$	100
1,5-1,9	Trắng đục	Hương, giống, thịt	$3,35 \pm 1,92 \times 10^{6c}$	100
$\geq 2$	Vàng kem	Thịt	$7,44 \pm 3,1 \times 10^{6d}$	83,1 $\pm$ 9,7

Ghi chú: trong cùng 1 cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Đối với các bào nang gạo có kích thước nhỏ (<1mm), bào nang thường được tìm thấy nhiễm trên các mẫu cá giống. Đây là giai đoạn phát triển đầu tiên của bào nang gạo, sau khi lây nhiễm vào trong cơ cá dưới dạng bào nang tiên

khởi. Các bào nang giai đoạn đầu khá nhỏ, màu trắng đục hoặc trắng trong, đôi khi khó có thể phát hiện bằng mắt thường. Kết quả xác định mật độ bào tử trên buồng đếm hồng cầu cho thấy mật độ trung bình dao động khoảng  $0,11 \times 10^6$  bào tử/ml. Mật độ cao nhất là  $0,13 \times 10^6$  bào tử/ml, mật độ thấp nhất là  $0,01 \times 10^6$  bào tử/ml. Tỷ lệ sống của các bào tử đạt 100% (bào tử vận động).

Sau giai đoạn lây nhiễm tiên khởi vào trong cơ, lúc này bào tử phát triển rất nhanh và hình thành các bào nang có kích thước từ 1-1,9 mm. Ở giai đoạn này thường được nhận biết dễ dàng bằng mắt thường, bào nang nằm trong các bó cơ dọc hai bên thân của cá. Bào nang có dạng hình trứng giống hạt gạo, màu trắng đục, vách bào nang khá dày và bám chặt vào bó cơ. Các bào nang ở giai đoạn này thường xuất hiện trên các mẫu cá hương, cá giống và cá thịt giai đoạn <300g. Mật độ bào tử trong các bào nang rất cao, dao động khoảng  $2,71-3,35 \times 10^6$  bào tử/ml. Mật độ cao nhất được quan sát thấy là  $7,3 \times 10^6$  bào tử/ml, mật độ thấp nhất là  $0,6 \times 10^6$  bào tử/ml. Tương tự, bào tử trong giai đoạn này cũng có tỷ lệ sống 100% (bào tử vận động).



**Hình 4.17: Bào tử *Kapatana* sp. trên buồng đếm hồng cầu (mũi tên)  
(A-10x; B-40x)**

Cuối cùng là giai đoạn bào nang thoái hóa, ở giai đoạn này bào nang thường có màu vàng kem hoặc có màu nâu nhạt, kích thước  $\geq 2$ mm, vách bào nang dày và dễ dàng tách khỏi các bó cơ. Bào nang thường được tìm thấy trên các mẫu cá thịt có khối lượng >300g. Ở giai đoạn này, mật độ bào tử trong bào nang rất cao, đạt  $7,44 \times 10^6$  bào tử/ml. Mật độ cao nhất là  $12,3 \times 10^6$  bào tử/ml, mật độ thấp nhất là  $1,2 \times 10^6$  bào tử/ml. Tuy nhiên, tỷ lệ sống của bào tử trong

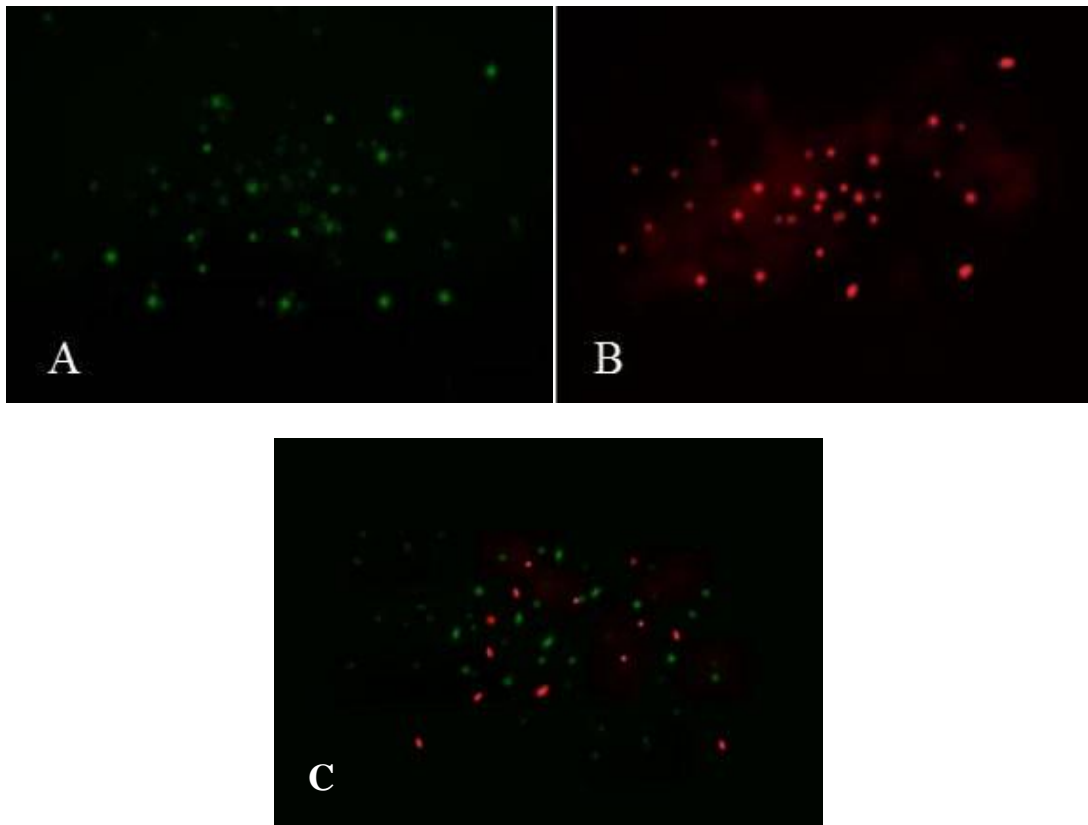
bào nang chỉ đạt 83,1%. Kết quả so sánh thống kê cho thấy mật độ bào tử ở các nhóm kích thước bào nang khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Những nghiên cứu trước đây đã sử dụng kỹ thuật nhuộm huỳnh quang bằng thuốc nhuộm SG và PI để nghiên cứu về bào tử Microsporidia. Theo mô tả của các tác giả nước ngoài cho thấy vi bào tử trùng thuộc giống *Kabatana* có kích thước rất nhỏ, chúng thường tạo ra những bào nang hình thoi, màu trắng đục, kích thước từ 1,5-6,0 mm nằm ký sinh bên trong các sợi cơ của cá, đặc biệt là ký sinh trong các nhóm cơ vân dọc theo cơ quan đường bên của cá. Kết quả nghiên cứu cũng nhận định rằng tùy theo kích thước, hình dạng, màu sắc, giai đoạn phát triển bào nang mà mật độ bào tử và tỷ lệ sống của bào tử có thể thay đổi khác nhau (Lom *et al.*, 1999; Dykova và Lom, 2000; Weiss và Becnel, 2014).

Ngoài việc đếm mật độ bào tử trên buồng đếm hồng cầu, đề tài cũng kết hợp sử dụng phương pháp nhuộm bào tử bằng 2 loại thuốc nhuộm SG, PI. Thông qua sự bắt màu thuốc nhuộm SG, PI để xác định tỉ lệ sống/chết của bào tử trong các giai đoạn bào nang. Hình 4.18A cho thấy ở những mẫu cá tra bệnh có kích cỡ bào nang gạo  $\leq 1,9$  mm, hầu hết các bào tử đều bắt màu xanh của thuốc nhuộm SG chụp dưới kính hiển vi huỳnh quang, kết quả xác định 100% bào tử sống. Ngược lại, bào tử chết sẽ bắt màu hồng đỏ của thuốc nhuộm PI (Hình 4.18B), kết quả nghiên cứu cho thấy ở những bào nang gạo  $\geq 2$  mm, tỉ lệ sống của bào tử giảm hơn giai đoạn đầu, chỉ chiếm  $83,1 \pm 9,7$  %. Tiếp tục nhuộm đồng thời 2 loại thuốc nhuộm SG và PI, những mẫu bào nang có kích thước lớn trên cá thịt thường xuất hiện cả bào tử sống lẫn bào tử chết (Hình 4.18C).

Theo nghiên cứu của Ferguson *et al.* (2007), khảo sát tác dụng của hóa chất lên sự sinh trưởng và phát triển của loài 3 loài vi bào tử trùng *Pseudoloma neurophilia*, *Encephalitozoon cuniculi* và *Glugea anomala*. Phương pháp nhuộm SG và PI được áp dụng để xác định mật độ cũng như tỷ lệ sống và chết của bào tử trong các mẫu thí nghiệm. Kết quả nhuộm bào tử đã giúp xác định được tỷ lệ sống và chết của bào tử trong các nghiệm thức tiếp xúc với chlorine ở các nồng độ khác nhau. Bào tử bắt màu xanh của thuốc nhuộm SG là bào tử

sống, chiếm 65% ở nồng độ chlorine 500 ppm. Trong khi đó các bào tử bắt màu vàng hoặc đỏ của thuốc nhuộm PI là các bào tử chết, chiếm 80% trong nghiệm thức chlorine 3.000 ppm.



**Hình 4.18:** (A) Bào tử bắt màu thuốc nhuộm SG - bào tử sống; (B) Bào tử bắt màu thuốc nhuộm PI - bào tử chết; (C) Bào tử bắt màu thuốc nhuộm SG và PI

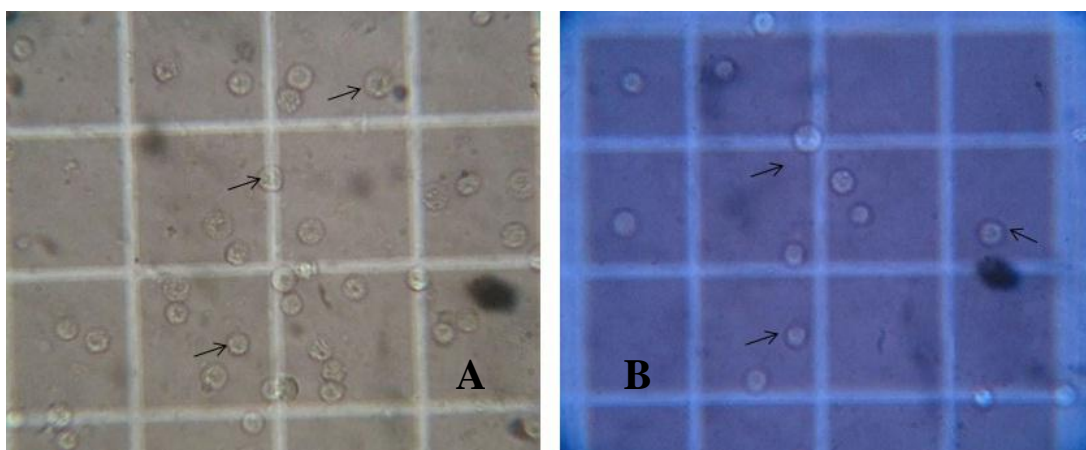
Gần đây, nghiên cứu của Peng *et al.* (2013) cũng đã cho thấy tính khả thi của phương pháp nhuộm huỳnh quang để xác định mật độ, tỷ lệ sống của bào tử *Nosema apis*. Bào tử loài *Nosema apis* gây bệnh nguy hiểm trên ong mật. Chúng thường nhiễm trên thành ruột của ong mật và gây chết 70% đàn ong nếu không được phát hiện và điều trị sớm. Tác giả đã phát triển một quy trình nhuộm huỳnh quang các mẫu dịch ruột của ong mật để dễ dàng phát hiện sớm đàn ong nhiễm *N. apis*. Kết quả cho thấy quy trình nhuộm bằng SG+PI (5+2,4  $\mu\text{M}/\text{ml}$  mẫu dịch ruột) cho hiệu quả phát hiện bào tử cao nhất trong các loại thuốc nhuộm. Ngoài ra, quy trình nhuộm này cũng giúp xác định được mật độ của các bào tử trong bào nang nhiễm ở thành ruột ong mật dao động từ  $1,1 \times 10^5$ - $2,7 \times 10^6$

bào tử/ml và tỷ lệ sống dao động từ 73-100% tùy vào từng giai đoạn của bệnh trên đàn ong mật.

#### 4.2.2 Kết quả nuôi tế bào thận và cơ của cá

Tế bào thận và sợi cơ của cá được nuôi trong môi trường nhân tạo L-15 được đánh giá dựa vào (1) mật độ của tế bào thận đưa vào giếng nuôi ban đầu và mật độ các tế bào thận bám dính xuống đáy giếng; (2) tỉ lệ sợi cơ gồm các sợi cơ bám dính xuống đáy giếng/tổng số sợi cơ quan sát trong giếng nuôi.

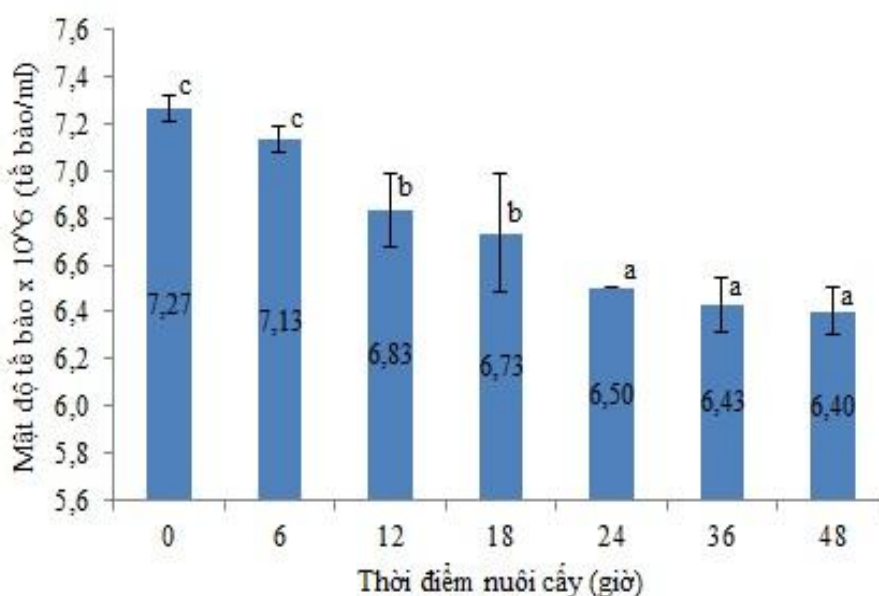
Kết quả quan sát dưới kính hiển vi cho thấy các tế bào thận sau khi được tách từ mô thận có dạng tế bào đơn, riêng lẻ, màu sắc tươi sáng (Hình 4.19A), khi nhuộm với thuốc nhuộm trypan blue, các tế bào thận còn sống sẽ không bắt màu xanh của thuốc nhuộm (Hình 4.19B). Mật độ tế bào thận được nuôi cấy ban đầu ở mỗi giếng thí nghiệm là  $7,27 \times 10^6$  tế bào/ml.



**Hình 4.19: Tế bào thận cá tra (mũi tên); (A) Mẫu tươi và (B) mẫu nhuộm với Trypan blue (40x)**

Theo dõi sự bám dính của các tế bào thận cá nuôi trong môi trường nhân tạo L-15 cho thấy tế bào thận có khả năng sống sót trong 48 giờ nuôi cấy (Hình 4.20). Trong 6 giờ đầu nuôi cấy, mật độ tế bào thận giảm nhẹ, mật độ tế bào bám xuống đáy giếng thời điểm này là  $7,13 \times 10^6$  tế bào/ml. Mật độ tế bào tiếp tục giảm cho đến thời điểm 24 giờ còn  $6,5 \times 10^6$  tế bào/ml và ổn định cho đến 48 giờ ( $6,4 \times 10^6$  tế bào/ml). Kết quả so sánh thống kê cho thấy mật độ tế bào thận khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Đối với các mẫu thận được bảo quản trong khoảng thời gian 2 giờ cho kết quả nuôi cấy rất tốt, không có hiện tượng nhiễm khuẩn, tế bào có khả năng bám dính đáy đĩa nuôi tốt cũng như khả năng sống cao ở tất cả các đĩa nuôi. Trong khi đó, các mẫu phân lập tế bào sau thời gian bảo quản từ 4-6 giờ thì khả năng nuôi không đạt hiệu quả tốt. Các tế bào cũng có sự bám dính dưới đáy đĩa nuôi nhưng tỷ lệ sống khá thấp, chỉ đạt 40%. Thêm vào đó, tỉ lệ nhiễm khuẩn cũng gia tăng khoảng 40%. Qua kết quả nuôi cấy tế bào thận có thể thấy thời gian bảo quản mẫu có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng nuôi cấy tế bào hiệu quả.



**Hình 4.20: Mật độ của tế bào thận cá sống sót ở các thời điểm nuôi cấy**

Ghi chú: các cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

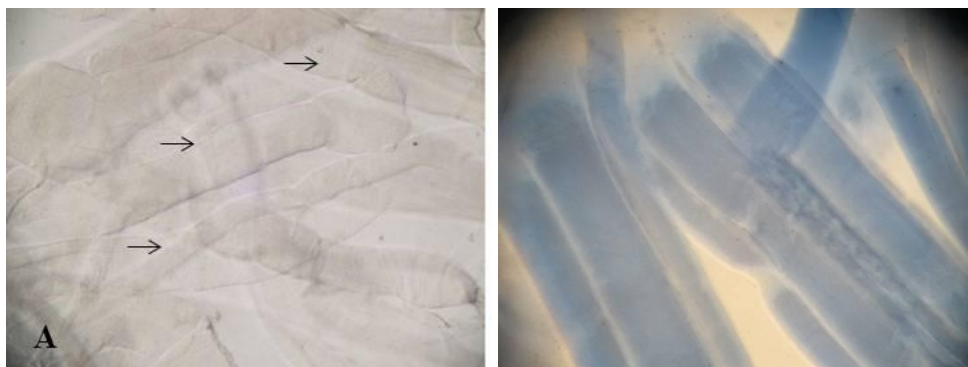
Nghiên cứu của Wongtavatchai *et al.* (1995) sử dụng quy trình nuôi cấy các tế bào bạch cầu của cá hồi Thái Bình Dương để xác định khả năng gây bệnh của loài *Nucleospora salmonis*. Các tế bào bạch cầu được nuôi cấy nhân tạo và cho cảm nhiễm với các bào tử của *N. salmonis* được lưu giữ trong nitơ lỏng - 70°C. Kế đến là nghiên cứu của Shaw *et al.* (2001) thực hiện nuôi cấy đại thực bào của cá hồi Thái Bình Dương và cá hồi Đại Tây Dương để so sánh khả năng thực bào của loài *Loma salmonae*. Kết quả của nghiên cứu ghi nhận khả năng thực bào của đại thực bào ở các hồi Đại Tây Dương cao hơn loài cá hồi Thái Bình Dương. Các mẻ nuôi cấy được quan sát trong vòng 48 giờ.



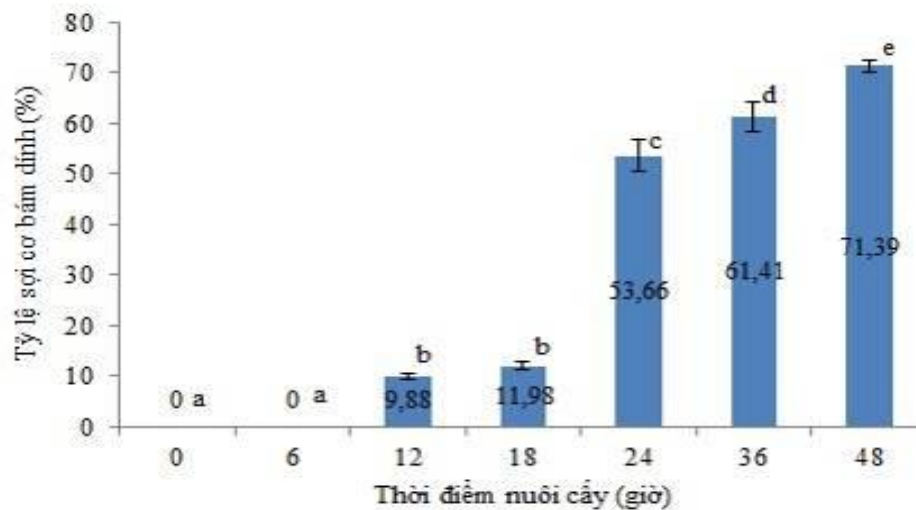
Nghiên cứu của Monagang *et al.* (2010), phát triển một hệ thống nuôi cấy tế bào của thận thỏ và tuyến sinh dục để nghiên cứu sự phát triển và xâm nhập của loài *Anncaliia algerae*. Các dòng tế bào được nuôi trong môi trường Grace's Insect Culture Medium (HyClone). Quá trình nuôi cấy có bổ sung thêm penicillin/streptomycin với nồng độ mỗi kháng sinh là 100 IU/ml. Kết quả thử nghiệm cho thấy khả năng xâm nhập và gây bệnh cao của loài *A. algerae* đối với các dòng tế bào trên cá vàng và một số loài cá nước ngọt khác.

Đối với mẫu mô cơ cá tra, kết quả quan sát dưới kính hiển vi thấy sợi cơ có dạng sợi dài, riêng lẻ, màu sắc trong sáng (Hình 4.21A) và bắt màu xanh nhạt của thuốc nhuộm trypan blue (Hình 4.21B). Đối với các mẫu cơ được bảo quản trong khoảng thời gian từ 2 giờ trước khi tiến hành phân lập đều cho kết quả nuôi cấy khá tốt, sợi cơ không có hiện tượng nhiễm khuẩn, các sợi cơ này có khả năng bám dính đáy đĩa nuôi cũng như khả năng sống cao ở tất cả các đĩa nuôi. Trong khi đó, các mẫu tiến hành nuôi tế bào sau thời gian bảo quản từ 4-6 giờ thì khả năng nuôi cấy không đạt hiệu quả. Các sợi cơ có sự bám dính dưới đáy đĩa nuôi nhưng tỷ lệ sống khá thấp, chỉ đạt 20% tổng số mẫu. Thêm vào đó, tỉ lệ nhiễm khuẩn cũng gia tăng khoảng 20% tổng số mẫu. Từ kết quả nuôi cấy có thể thấy thời gian bảo quản mẫu cũng có ảnh hưởng lớn đến khả năng nuôi cấy hiệu quả.

Kết quả nuôi cấy các sợi cơ (chứa các tế bào cơ) được đánh giá thông qua khả năng sống, bám dính của tế bào được tiến hành sau khoảng thời gian 6, 12, 18, 24, 36, 48 giờ kể từ khi cho vào các giếng nuôi.



**Hình 4.21: Sợi cơ trong các giếng nuôi (mũi tên) (A); sợi cơ được nhuộm với trypan blue (B)**



**Hình 4.22: Tỷ lệ sợi cơ bầm dính ở các thời điểm nuôi cấy**

Ghi chú: các cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Từ kết quả tổng hợp ở Hình 4.22 cho thấy trong thời gian 6 giờ kể từ lúc nuôi, các sợi cơ chưa có hiện tượng bầm dính. Sau đó, các sợi cơ bắt đầu bầm dính, ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy, đạt trung bình khoảng 53,66% so với mức 9,88% thời điểm 12 giờ nuôi cấy. Ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy, tỉ lệ sợi cơ sống sót so với tổng số sợi cơ quan sát được đạt khoảng 71,39%. Kết quả cho thấy tỉ lệ sợi cơ sống sót ở các thời điểm khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Nhìn chung, kết quả đề tài đạt được tương đối tốt, điều này cho thấy các khâu xử lý chọn lọc mẫu, phân lập tế bào, nhiệt độ nuôi cũng như môi trường nuôi sử dụng là phù hợp cho việc nuôi cấy tế bào cơ trong điều kiện phòng thí nghiệm.

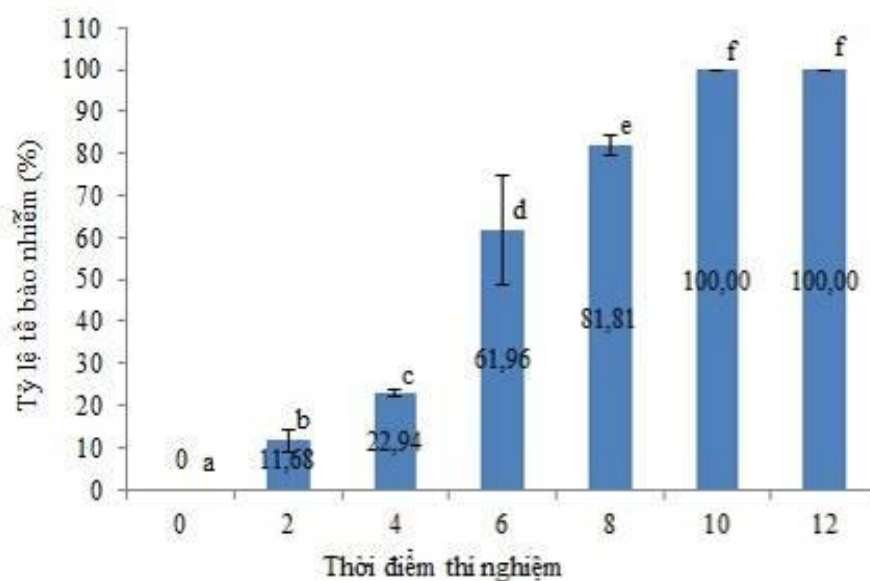
Việc nuôi cấy tế bào cơ cá để phục vụ cho nghiên cứu đã có những thành công nhất định. Một số nghiên cứu đã sử dụng nuôi cấy tế bào cơ cá để tìm hiểu cách thức xâm nhập cũng như khả năng gây bệnh của vi bào tử trùng *Microsporidia* vào tế bào vật chủ. Kou *et al.* (1995) đã phát triển một quy trình nuôi cấy dòng tế bào biểu mô của cá chình để nghiên cứu khả năng xâm nhập và tác động của loài *Heterosporia anguillarum* lên tế bào vật chủ. Kết quả cho thấy các tế bào biểu mô của cá chình không bị phân hủy mà vẫn phát triển bình thường. Ngoài ra, các dòng tế bào cá chình cũng được phát triển thành công để phục vụ cho nghiên cứu đặc điểm bệnh học của loài *Glugea* sp. Tuy nhiên, kết

quả không thật sự thành công khi thí nghiệm nuôi bào tử *Glugea* sp. trên dòng tế bào cá hồi CHSE-214 ở 21°C. Trong quá trình thí nghiệm, chỉ vài giai đoạn chu kỳ sống đã được ghi nhận và sự hình thành xenomas không diễn ra trên cơ quan cảm nhiễm (Lores *et al.*, 2003).

#### 4.2.3 Kết quả cảm nhiễm vi bào tử trùng vào tế bào thận và cơ cá tra

Sau khi nuôi tế bào thận và sợi cơ của cá tra trong thời gian 48 giờ ở thí nghiệm trên, đề tài tiến hành thí nghiệm gây cảm nhiễm với vi bào tử trùng *Kabatana* sp. Quá trình xâm nhiễm của bào tử *Kabatana* sp. được ghi nhận vào từng thời điểm thí nghiệm trong suốt 12 giờ. Môi trường nuôi cấy tế bào thận và sợi cơ của cá có tác dụng trong việc duy trì sự sống và sinh trưởng của vi bào tử trùng *Kabatana* sp.

Kết quả quan sát thí nghiệm tại thời điểm 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 giờ sau khi cảm nhiễm đã ghi nhận ở thời điểm 1 giờ sau cảm nhiễm, các bào tử vẫn chưa xâm nhập vào tế bào thận. Đến thời điểm 2 giờ, một số bào tử ở các giếng nuôi cấy bắt đầu ký sinh và phá hủy tế bào thận, tỷ lệ nhiễm trung bình ở thời điểm này là  $11,68 \pm 2,60\%$  tổng số tế bào. Kết quả so sánh thống kê cho thấy tỉ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. trên tế bào thận khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

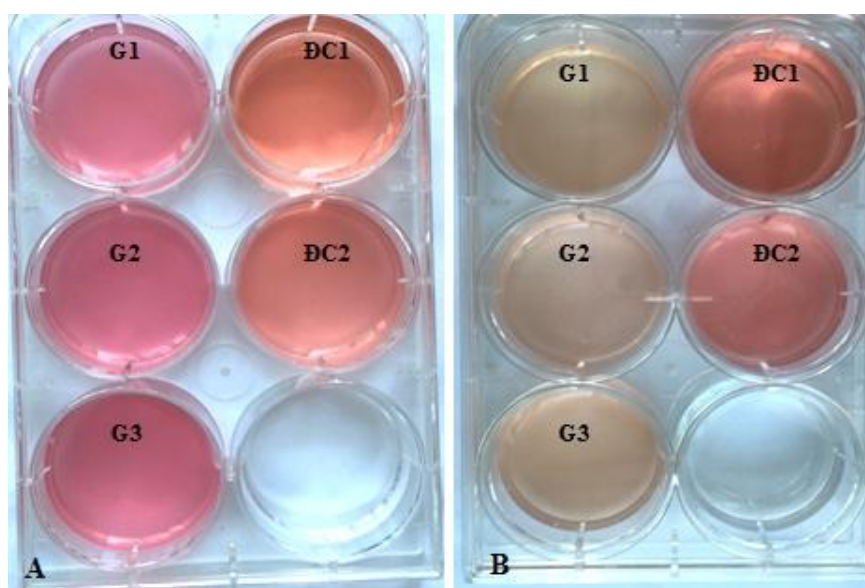


**Hình 4.23: Tỷ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. trên tế bào thận**

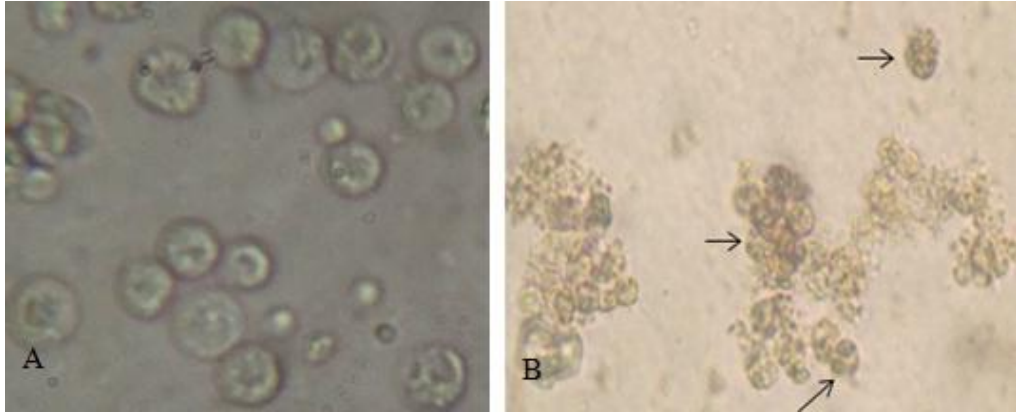
Ghi chú: các cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Thời điểm 6 giờ, mức độ xâm nhiễm của bào tử đạt mức cao, với  $61,96 \pm 12,96\%$  tế bào bị nhiễm *Kabatana* sp., tăng gấp 6 lần so với thời điểm 2 giờ. Lúc này, màu sắc môi trường nuôi cấy L-15 ở các giếng thí nghiệm cảm nhiễm bắt đầu thay đổi từ màu hồng tươi chuyển dần sang màu hồng rất nhạt, một lượng lớn tế bào thận đã bị phá hủy, vì vậy mức độ tế bào thận bị xâm nhiễm tăng lên. Kết quả sau 6 giờ cảm nhiễm, thời điểm 10 và 12 giờ, các tế bào thận đã bị bào tử xâm nhập và phá hủy hoàn toàn, 100% tế bào bị mất cấu trúc, các tế bào có biểu hiện bám dính lại với nhau, vách ngoài tế bào bị phá hủy, không còn liên mạch. Các vật chất bên trong tế bào bị đông vón và bị phá hủy theo mức độ nhiễm (Hình 4.23; 4.24 và 4.25).

Sau thời điểm 12 giờ, môi trường nuôi cấy ở các giếng cảm nhiễm đã mất màu hồng và môi trường chuyển sang trong suốt. Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy các tế bào thận đã bị xâm nhiễm và phá hủy trong các giếng cảm nhiễm. Thí nghiệm cảm nhiễm vẫn được tiếp tục theo dõi ở thời điểm 36 giờ và 48 giờ, dịch môi trường chứa bào tử nhiễm các tế bào thận cá được nhuộm với thuốc nhuộm SG và PI. Các mẫu nhuộm cho thấy các bào tử bắt màu xanh của thuốc nhuộm SG, tỷ lệ sống của bào tử là 100% sau 48 giờ cảm nhiễm. Từ kết quả trên cho thấy, có thể nuôi cấy bào tử *Kabatana* sp. trong môi trường nuôi cấy bằng tế bào thận cá tra.

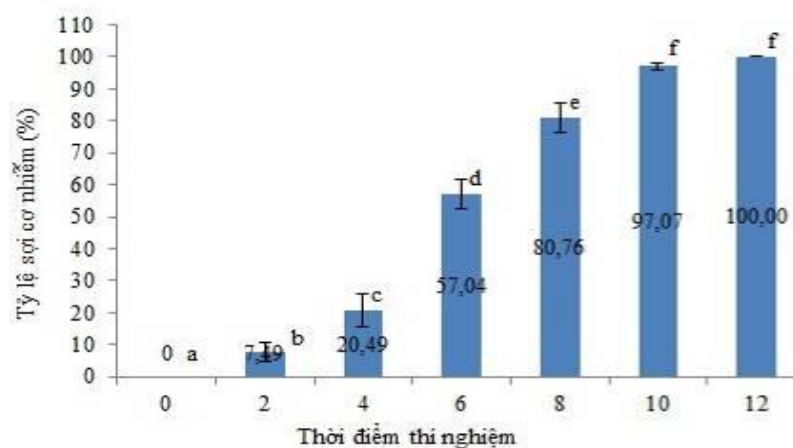


**Hình 4.24: Giếng nuôi tế bào thận (A) trước và (B) sau cảm nhiễm 12 giờ** (ĐC1: Môi trường L-15; ĐC2: L-15 + tế bào thận; G1,2,3: L-15 + tế bào thận + *Kabatana* sp.)



**Hình 4.25: Tế bào thận: (A) trước gây cảm nhiễm và (B) sau khi gây cảm nhiễm với bào tử *Kabatana* sp. (mũi tên) (40x)**

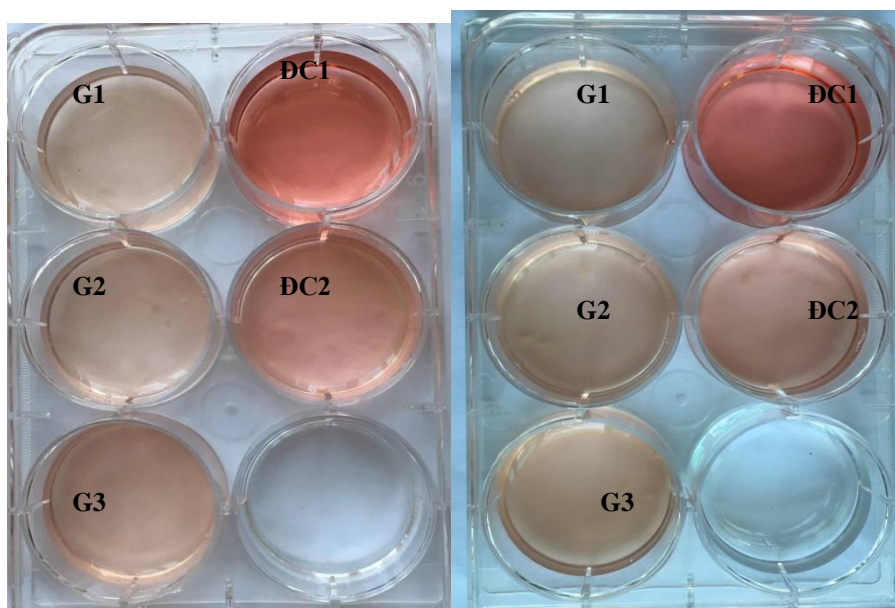
Tương tự, kết quả cảm nhiễm vi bào tử *Kabatana* sp. vào sợi cơ được tổng hợp trong Hình 4.26. Quan sát thí nghiệm ở thời điểm 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 giờ sau khi gây cảm nhiễm thấy ở thời điểm 1 giờ sau cảm nhiễm, các bào tử có xu hướng tập trung bám vào phần đầu của sợi cơ, chưa xâm vào trong sợi cơ (Hình 4.28A). Đến thời điểm 2 giờ, các giếng nuôi cấy đã ghi nhận một số sợi cơ bị bào tử ký sinh. Theo đó, tỷ lệ nhiễm trung bình ở thời điểm này là  $7,49 \pm 3,02\%$  tổng số sợi cơ. Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy các sợi cơ bị bào tử trùng *Kabatana* sp. xâm nhập làm các sợi cơ mất cấu trúc, vách ngoài các sợi cơ bị phá hủy, rất nhiều các bào tử bám bên ngoài sợi cơ, đặc biệt là phần đầu các sợi cơ, vì vùng này có nhiều sợi cơ chứa tế bào cơ nên bào tử dễ dàng bám vào hơn bám bên ngoài sợi cơ. Kết quả so sánh thống kê cho thấy tỷ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. của sợi cơ khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p < 0,05$ .



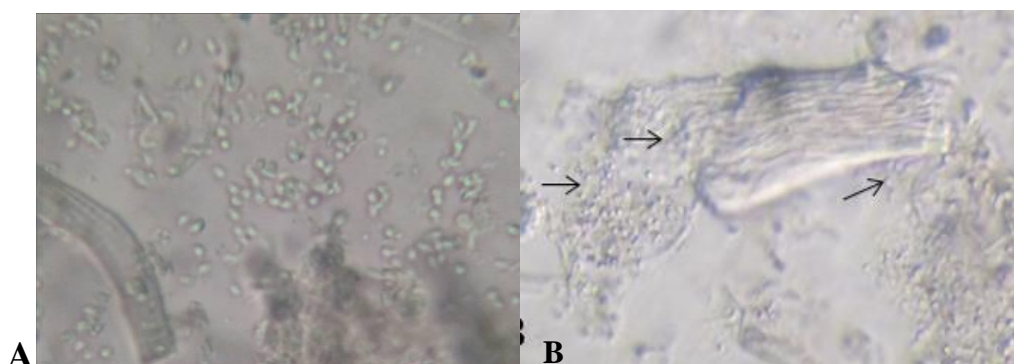
**Hình 4.26: Tỷ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. của sợi cơ**

Ghi chú: các cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Thời điểm 8 giờ tỷ lệ xâm nhiễm của bào tử đạt  $80,76 \pm 4,61\%$ , sợi cơ bị nhiễm nhiều hơn, tăng gấp 11 lần so với thời điểm 2 giờ. Màu sắc môi trường nuôi cấy ở các giếng gây nhiễm với bào tử bắt đầu thay đổi từ màu hồng chuyển sang màu hồng rất nhạt. Thời điểm 12 giờ sau cảm nhiễm, quan sát bằng mắt thường có thể thấy các giếng cảm nhiễm đã mất màu hồng hoàn toàn và chuyển sang trong suốt. Quan sát cho thấy 100% các sợi cơ đã bị bào tử xâm nhập hoàn toàn. Dịch môi trường được quan sát dưới kính hiển vi 40x ghi nhận vi bào tử *Kabatana* sp. vẫn vận động bình thường, sau đó tiếp tục nhuộm dịch mẫu với thuốc nhuộm SG và PI, kết quả cho thấy 100% bào tử bắt màu xanh dưới kính hiển vi huỳnh quang. Chứng tỏ các bào tử vẫn phát triển bình thường trong môi trường.



**Hình 4.27: Giếng nuôi sợi cơ (A) trước và (B) sau cảm nhiễm 12 giờ**  
(DC1: Môi trường L-15; DC2: L-15 + tế bào cơ; G1,2,3: L-15 + tế bào cơ + *Kabatana* sp.)



**Hình 4.28: (A) bào tử sau 1 giờ cảm nhiễm vào sợi cơ (B) bào tử bám vào đầu sợi cơ sau 2 giờ cảm nhiễm (mũi tên)**

Việc nuôi cấy vi bào tử trùng Microsporidia có ý nghĩa rất quan trọng trong những nghiên cứu chuyên sâu về cách thức lây nhiễm và gây bệnh cũng như các phương pháp phòng và điều trị bệnh do các loài vi bào tử trùng gây ra. Trước đây, đã có rất nhiều nghiên cứu gây cảm nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia với các dòng tế bào nuôi trong môi trường nhân tạo để nghiên cứu sâu hơn về bào tử của chúng. Nghiên cứu của Silveira và Canning (1995) về sự phát triển và vòng đời của vi bào tử trùng *Vittaforma corneae* đã sử dụng 3 dòng tế bào MDCK, MRC-5 và XEN để gây cảm nhiễm với bào tử. Tương tự thí nghiệm cảm nhiễm của đề tài, nghiên cứu này cũng sử dụng môi trường L-15 để nuôi các dòng tế bào. Bào tử *V. corneae* được cho cảm nhiễm lên các dòng tế bào này với mật độ  $2 \times 10^5$  bào tử/ml. Quá trình xâm nhập của bào tử vào tế bào được chụp bằng kính hiển vi điện tử để theo dõi hoạt động xâm nhập của bào tử vào tế bào. So sánh thời điểm bào tử *Kabatana* sp. xâm nhập vào tế bào thận của đề tài ghi nhận thì loài *V. corneae* có thời gian bắt đầu xâm nhập khá lâu, thời điểm 40 giờ sau cảm nhiễm thì các bào tử mới xâm nhập vào tế bào. Tương tự, đặc điểm phá hủy tế bào chủ của các dòng tế bào thí nghiệm không có gì khác biệt lớn với kết quả của đề tài.

Nghiên cứu của Santillana-Hayat *et al.* (2002) cho vi bào tử trùng *Encephalitozoon intestinalis* cảm nhiễm với các dòng tế bào nuôi cấy trong môi trường nhân tạo. Với mật độ bào tử là  $10^7$  bào tử/ml, các tế bào dòng U-373-MG được cảm nhiễm trong môi trường dinh dưỡng RPMI. Các giếng nuôi bào tử này được ủ ở  $37^\circ\text{C}$  và theo dõi trong 8 ngày nuôi. Kết quả cho biết mặc dù không bổ sung thêm môi trường dinh dưỡng RPMI mới trong 8 ngày nuôi, nhưng bào tử của loài này vẫn có khả năng sinh trưởng tốt trong các tế bào U-373-MG. Kết quả thí nghiệm đã cung cấp nguồn bào tử *E. intestinalis* cho các thí nghiệm khảo sát tác dụng của các loại hóa chất khác nhau.

Ngoài ra, loài vi bào tử trùng *Enterocytozoon salmonis*, *Glugea* sp., *Microgemma caulleryi* cũng đã được nuôi cấy thành công trong môi trường nhân tạo. Các loài này đã được nhân giống trong ống nghiệm với tế bào bạch cầu đơn nhân của cá hồi. Bào tử được nuôi cấy thành công và cho kết quả cảm nhiễm tốt trên cá hồi (Lores *et al.*, 2003). Kế tiếp, nghiên cứu của Redondo *et*

al. (2003) cũng ghi nhận kết quả tương tự nuôi cấy loài bào tử trùng *Enterocytozoon scophthalmi* gây bệnh trên cá bơn *Scophthalmus maximus*. Nghiên cứu cũng sử dụng môi trường L-15 nuôi tế bào, dòng tế bào thực hiện thí nghiệm cảm nhiễm là tế bào đơn nhân phân lập ở vây của cá bơn. Quan sát dưới kính hiển vi thấy bào tử *E. scophthalmi* bắt đầu xâm nhập vào tế bào ở thời điểm 24 giờ sau cảm nhiễm, thời gian xâm nhiễm của loài *E. scophthalmi* cũng lâu hơn kết quả của đề tài ghi nhận ở loài *Kabatana* sp. Biểu hiện của tế bào chủ khi bị bào tử xâm nhập có những đặc điểm tương tự như sự kết dính của các tế bào, màng ngoài tế bào bị phân rã và các cơ quan bên trong tế bào bị phân hủy cùng với sự gia tăng mật độ của bào tử bên trong.

Loài vi bào tử *Nosema ceranae* gây bệnh nguy hiểm trên ong mật cũng được nuôi cấy thành công trong môi trường nhân tạo với tỷ lệ sống rất cao. Nghiên cứu của Fenoy *et al.* (2009) sử dụng các tế bào dòng nuôi trong những môi trường dinh dưỡng khác nhau như FBS và RPMI để lưu giữ các bào tử *N. ceranae*. Các bào tử được cảm nhiễm ở mật độ  $5 \times 10^5$  bào tử/ml. Kết quả cho thấy trong hầu hết các giếng nuôi dưỡng, bào tử phát triển rất tốt sau 12 giờ cảm nhiễm. Tỷ lệ sống của bào tử ở cả hai môi trường nuôi sau 1 tuần nuôi dao động trong khoảng 89%. Điều này được chứng minh thông qua kết quả nhuộm với DAPI, tất cả các bào tử đã bắt màu xanh của thuốc nhuộm này. Bên cạnh đó, các giếng nuôi khi được bảo quản ở nhiệt độ dưới 0°C cũng cho tỷ lệ sống bào tử rất cao sau 3 tuần lưu trữ. Với tỷ lệ sống trên 83% sau khi rã đông cho thấy bào tử *N. ceranae* có sức sống rất cao.

Gần đây, kết quả nghiên cứu của Lallo *et al.* (2015) cũng cho thấy tầm quan trọng cũng như tính khả thi khi nuôi cấy các dòng tế bào nhằm lưu giữ và nhân giống các loài vi bào tử trùng gây bệnh trên cá. Các giống vi bào tử trùng gây bệnh nguy hiểm trên cá như *Glugea*, *Brachiola*, *Nosema*, *Heterosporis*, *Pleistophora* được ghi nhận là có khả năng sống và phát triển rất tốt trong các dòng tế bào RK-13, MRC-5, MDCK và cả tế bào được phân lập từ biểu mô của các loài cá mà chúng ký sinh. Phần lớn các mẫu cảm nhiễm này được nuôi theo phương pháp nuôi cấy sơ cấp và được lưu trữ, sử dụng trong 48 giờ sau cảm



nhiễm bào tử. Tỷ lệ sống đạt từ 90-97%, tùy thuộc vào từng môi trường nuôi dưỡng.

Qua các thí nghiệm cảm nhiễm vi bào tử trùng lên tế bào chủ cá đã giúp cho quá trình khảo sát hóa chất và thuốc kháng ký sinh trùng đạt hiệu quả tốt hơn trong việc phòng và điều trị bệnh do vi bào tử trùng gây ra.

### 4.3 Xác định ảnh hưởng của một số hóa chất và thuốc kháng ký sinh trùng lên vi bào tử trùng *Kabatana* sp.

#### 4.3.1 Tác dụng của hóa chất đối với vi bào tử trùng *Kabatana* sp.

Thí nghiệm được thực hiện với 6 loại hóa chất thuộc nhóm tẩy rửa và diệt trùng đang được sử dụng phổ biến trên thị trường. Đánh giá hiệu quả của các loại hóa chất dựa vào kết quả quan sát sự bất hoạt của bào tử dưới kính hiển vi. Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các loại hóa chất đến vi bào tử trùng *Microsporidia* được trình bày trong Bảng 4.8 và 4.9.

**Bảng 4.8: Thời gian (phút) gây bất hoạt bào tử tương ứng với các nồng độ của ethanol và formaline**

Hóa chất	Thời gian gây bất hoạt ở các nồng độ hóa chất (%) khác nhau						
	70	65	60	55	50	45	40
Ethanol	3,44 <sup>a</sup> ±0,2	3,90 <sup>a</sup> ±0,2	4,05 <sup>a</sup> ±0,2	6,18 <sup>b</sup> ±0,3	7,26 <sup>c</sup> ±0,3	9,09 <sup>d</sup> ±0,4	28,63 <sup>e</sup> ±0,5
Formaline	3,30 <sup>a</sup> ±0,2	5,88 <sup>b</sup> ±0,2	12,25 <sup>c</sup> ±0,2	13,75 <sup>d</sup> ±0,2	15,33 <sup>e</sup> ±0,3	16,90 <sup>f</sup> ±0,4	31,95 <sup>g</sup> ±0,5

*Ghi chú: thời gian thí nghiệm thể hiện bằng phút, được tính đến khi bào tử bất hoạt và chết ở các giếng thí nghiệm. Các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )*

Kết quả ở Bảng 4.8 cho thấy vi bào tử trùng ở các nghiệm thức có thời gian bất hoạt dao động thấp nhất là 3,30 phút và cao nhất là 31,95 phút. Trong khi đó, ở nghiệm thức đối chứng vi bào tử vẫn còn hoạt động bình thường. Hợp chất diệt trùng nhóm rượu là ethanol có tác dụng đến *Microsporidia* khá tốt trong thời gian ngắn. Trong 7 nghiệm thức thí nghiệm, ethanol ở nồng độ 70% làm bất hoạt bào tử nhanh nhất trong thời gian 3,44 phút. Ở các nồng độ thấp hơn thì ảnh hưởng của ethanol đến bào tử càng thấp, ethanol nồng độ 40% làm bất hoạt *Microsporidia* chậm nhất là 28,63 phút. Các nghiệm thức có nồng độ và

thời gian bất hoạt bào tử khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), riêng nghiệm thức 70, 65, 60% khác biệt không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ).

Theo nghiên cứu của Li và Fayer (2006), ethanol 70% có tác dụng đối với các loài vi bào trùng *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem* và *Glugea stephani*. Dung dịch bào tử với mật độ  $15 \times 10^4$  bào tử/ml được tiếp xúc với ethanol 70% trong thời gian 5, 10, 20 phút ở 22°C. Kết quả ghi nhận mức độ ảnh hưởng của ethanol lên các loài vi bào tử trùng khác nhau. Bào tử của loài *E. cuniculi*, *E. intestinalis* và *G. stephani* đã bị phá hủy hoàn toàn sau 5 phút thử nghiệm. Riêng bào tử của loài *E. hellem* thì sau 20 phút thử nghiệm mới có thể bị tiêu diệt hoàn toàn. Một kết quả nghiên cứu khác cũng cho rằng ethanol diệt vi sinh vật tốt nhất ở nồng độ 60-70%, nồng độ cao sẽ cho hiệu quả kém hơn do sự đông vón của các protein bên ngoài của thành tế bào, làm ngăn chặn sự xâm nhập của ethanol vào trong tế bào, dẫn đến làm giảm tác dụng của ethanol (Thomas, 2013).

Mặc khác, một số nghiên cứu cho rằng việc sử dụng ethanol lại không cho hiệu quả tốt (Mixon *et al.*, 2010; Sokolowski *et al.*, 2012, Ptaszynska *et al.*, 2013). Tiêu biểu là nghiên cứu của Ptaszynska *et al.* (2013), tiến hành thí nghiệm cho các cá thể ong mật nhiễm *Nosema* sp. (một loài vi bào tử trùng gây bệnh nguy hiểm trên ong mật) ăn Ethanol với liều lượng 2,5%, 5%, 10% (Higes *et al.*, 2006). Kết quả cho thấy ong mật nhiễm *Nosema* sp. gia tăng tỷ lệ chết khi ăn ethanol ở 3 nồng độ trên. Ở nồng độ ethanol 10%, tỷ lệ ong chết ở mức cao nhất, tỷ lệ chết hàng ngày lên đến 9,2% so với mức tỷ lệ chết 1,3% ở nghiệm thức đối chứng, không cho ăn ethanol.

Maze *et al.* (2006) đã tiến hành thí nghiệm sử dụng ethanol trên loài ong *Apis mellifera*, với các nồng độ ethanol từ 0%; 2,5%; 5%; 10% và 50% trong dung dịch siro. Kết quả nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ chết của đàn ong gia tăng tỷ lệ thuận với nồng độ ethanol. Ở nồng độ 50%, đàn ong có tỷ lệ chết cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Tất cả các kết quả này hoàn toàn phù hợp với lý giải của Graaf *et al.* (1993), khi ethanol vào trong cơ thể của ong và côn trùng khác cũng như các động vật có xương sống, ethanol được

chuyển hóa bởi men ethanol dehydrogenase và được chuyển hóa bởi men acetaldehyde dehydrogenase thành acetate, chúng axit hóa các thức ăn trong đường ruột. Môi trường axit hóa của ruột sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho sự lây nhiễm của bào tử *Nosemasp.* vào các tế bào biểu mô, ngoài ra cũng tạo điều kiện thuận lợi cho sự nảy mầm và phát triển của vi bào tử trùng trong cơ thể.

Từ kết quả nghiên cứu của đề tài và các nghiên cứu khác trước đây cho thấy hóa chất nhóm rượu là ethanol có tác dụng bất hoạt vi bào tử trùng khi tiếp xúc trực tiếp với bào tử ngoài cơ thể sinh vật. Ngược lại, không thể sử dụng ethanol để điều trị khi vi bào tử nhiễm vào bên trong của cơ thể vật chủ.

Các hợp chất thuộc nhóm aldehyde cũng được nhiều nghiên cứu ghi nhận là có tác dụng tiêu diệt vi sinh vật rất tốt. Trong đó, formalin là hợp chất aldehyde được sử dụng rộng rãi trong nhiều chế phẩm thương mại để diệt vi sinh vật trong môi trường. Formalin tác động tiêu diệt vi sinh vật bằng cơ chế liên kết ngang với các protein trên màng tế bào hoặc ức chế tổng hợp DNA, RNA và các đại phân tử khác trong tế bào vi sinh vật. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận tác động của formalin lên các loài bào tử trùng như *Acanthamoeba sp.*, *Cryptosporidium sp.*, *Toxoplasma sp.* Ở nồng độ 2,0-2,5%, formalin có khả năng tiêu diệt phần lớn các bào tử của vi bào tử trùng trong khoảng 2-3 giờ tiếp xúc (Thomas, 2013).

Đối với vi bào tử Microsporidia trong bào nang gạo trên cá tra nuôi, formalin cũng có tác động đến chúng. Kết quả cho thấy ở nồng độ 70%, formalin có thể làm bất hoạt 100% bào tử trong thời gian 3,3 phút. Nồng độ càng giảm thì formalin tác dụng càng thấp lên bào tử, với thời gian tiếp xúc lâu hơn mới có thể bất hoạt hoàn toàn các bào tử. Các nghiệm thức nồng độ có thời gian tác động bào tử khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu trong đề tài khác biệt so với nghiên cứu của Frankenhuizen *et al.* (2004), thí nghiệm so sánh hiệu quả của formalin trong quá trình khử trùng trứng của loài sâu bướm nhiễm vi bào tử trùng *Cystosporogenes sp.* Vi bào tử trùng *Cystosporogenes sp.* được ghi nhận là có thể lây nhiễm (theo chiều ngang) từ môi trường nước vào trong trứng. Vì thế,

phương pháp ngâm trứng bằng formalin nồng độ 33% trong 30 phút được thử nghiệm để khảo sát khả năng tiêu diệt bào tử trùng *Cystosporogenes* sp. nhiễm trên trứng bướm. Kết quả cho thấy trứng bướm sau khi ngâm trong formalin vẫn nở ra ấu trùng nhiễm vi bào tử trùng với nhiều mức độ khác nhau. Tuy nhiên, đối với trường hợp trứng nhiễm mức độ nặng thì việc ngâm formalin ở nồng độ 33% trong 30 phút không cho kết quả khả quan. Điều này cho thấy formalin chỉ có tác dụng kiềm chế sự phát triển của bào tử *Cystosporogenes* sp. mà không có khả năng tiêu diệt hoàn toàn.

Theo kết quả nghiên cứu gần đây nhất của Nayaka (2016), tác giả đã chứng minh hiệu quả của formalin tiêu diệt vi bào tử trùng NIK-5hm thuộc giống *Nosema* ký sinh trong nhộng tằm. Với các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0% formalin, nhộng tằm nhiễm *Nosema* sp. được xử lý trong 5, 10, 20, 30 phút. Tỷ lệ nhiễm bào tử *Nosema* sp. của nhộng tằm dao động từ 1,7-38,0%. Kết quả cho thấy formalin không có tác dụng tiêu diệt bào tử *Nosema* sp. ở nồng độ 0,5% và 1,0% trong thời gian 5-30 phút. Ngược lại, ở nồng độ 1,5% và 2,0%, formalin có thể tiêu diệt 100% bào tử *Nosema* sp. trong thời gian từ 5-30 phút. Từ kết quả thử nghiệm, nghiên cứu cho rằng việc xử lý nhộng tằm trong dung dịch formalin nồng độ 1,5% trong thời gian 30 phút là an toàn và ngăn chặn hiệu quả sự lây nhiễm vi của bào tử trùng *Nosema* sp.

Các hợp chất halogen cũng thường được sử dụng rộng rãi để diệt vi sinh vật gồm chlorine và iodine. Kết quả thí nghiệm cho thấy 2 hợp chất này có tác dụng lên bào tử *Microsporidia* với nồng độ từ 0,1-0,7%. Ở nồng độ 0,7% thời gian bất hoạt bào tử của chlorine là 6,29 phút. Tác dụng của chlorine giảm đáng kể khi nồng độ hóa chất giảm, chlorine 0,1% cần thời gian 39,5 phút mới hoàn toàn làm các bào tử ngừng hoạt động. Tương tự, iodine cũng có tác dụng bất hoạt bào tử khá tốt ở nồng độ 0,6%-0,7%. Tuy nhiên, tác dụng của iodine thấp hơn chlorine, ở nồng độ 0,7% Iodine bất hoạt bào tử trong thời gian tiếp xúc là 7,29 phút. Nhìn chung, nồng độ hóa chất cao thì thời gian tiêu diệt bào tử ngắn hơn, có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nồng độ thấp (Bảng 4.9).

Đối với chlorine, hiệu quả tiêu diệt vi sinh vật cũng đã được nhiều nghiên cứu ghi nhận. Khi hòa tan trong nước, các hoạt chất tạo ra các phản ứng oxy hóa mạnh giúp tiêu diệt các vi sinh vật. Tuy nhiên, cần chú ý đến mật độ các phân tử hữu cơ và vô cơ hiện diện trong nước, vì chúng sẽ làm giảm hiệu quả diệt vi sinh vật của các halogen (Mogoa, 2010; Thomas, 2013).

**Bảng 4.9: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt bào tử của 4 loại hóa chất**

Hóa chất	Thời gian gây bất hoạt ở các nồng độ hóa chất (%) khác nhau						
	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Chlorine	6,29 <sup>a</sup> ±0,1	6,92 <sup>b</sup> ±0,2	12,00 <sup>c</sup> ±0,2	15,43 <sup>d</sup> ±0,4	16,91 <sup>e</sup> ±0,4	17,65 <sup>f</sup> ±0,4	39,50 <sup>g</sup> ±0,6
Iodine	7,29 <sup>a</sup> ±0,3	10,05 <sup>b</sup> ±0,3	15,36 <sup>c</sup> ±0,2	17,5 <sup>d</sup> ±0,6	19,08 <sup>e</sup> ±0,2	21,9 <sup>f</sup> ±0,5	31,75 <sup>g</sup> ±0,4
Chlorine dioxide	1,45 <sup>a</sup> ±0,3	5,13 <sup>b</sup> ±0,2	6,86 <sup>c</sup> ±0,1	10,42 <sup>d</sup> ±0,4	12,03 <sup>e</sup> ±0,4	15,02 <sup>f</sup> ±0,2	17,25 <sup>g</sup> ±0,5
Hydrogen peroxide	1,05 <sup>a</sup> ±0,4	2,55 <sup>b</sup> ±0,1	4,03 <sup>c</sup> ±0,2	10,42 <sup>d</sup> ±0,4	12,26 <sup>e</sup> ±0,4	12,65 <sup>f</sup> ±0,5	15,08 <sup>g</sup> ±0,3

Ghi chú: thời gian gây chết thể hiện bằng phút và được tính đến khi bào tử bất hoạt và chết ở các giếng thí nghiệm. Các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

Kết quả tổng hợp của LeChevallier và Kwok-Keung (2004) cũng cho thấy khả năng tiêu diệt của chlorine đối với vi bào tử trùng *Cryptosporidium* sp., *Encephalitozoon* sp. và *Septata intestinalis*. Loài *Cryptosporidium* sp. tồn tại trong môi trường nước với pH=7, chlorine có thể tiêu diệt đến 90% bào tử trong 90 phút tiếp xúc ở nồng độ 80 mg/l. Đối với loài *Encephalitozoon* sp., khi pH=7, chlorine có khả năng tiêu diệt 100% bào tử ở nồng độ 3,5 mg/l trong 10 phút; khi pH=4 thì chlorine có khả năng tiêu diệt 100% bào tử ở nồng độ 2 mg/l trong 10 phút; nhưng khi pH=10 thì nồng độ chlorine ở mức 12 mg/l mới có thể tiêu diệt được chúng. Tuy nhiên, đối với loài *Septata intestinalis*, chlorine ở nồng độ 2 mg/l cũng có thể bất hoạt được hoàn toàn bào tử trong 16 phút ở điều kiện pH=7.

Khả năng tác động của chlorine còn giới hạn đối với một số giống vi bào tử trùng khác. Theo nghiên cứu của Ferguson *et al.* (2007), chlorine có khả năng kháng rất cao của 2 giống vi bào tử trùng *Pseudoloma* và *Glugea* nhưng lại nhạy

với giống vi bào tử trùng *Encephalitozoon*. Nghiên cứu đã thử nghiệm tác động của chlorine ở nồng độ từ 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 và 200 ppm lên bào tử của 3 giống vi bào tử *Pseudoloma*, *Glugea* và *Encephalitozoon* trong thời gian 10 phút. Kết quả cho thấy ở nồng độ 5 ppm, Chlorine có thể tiêu diệt 100% bào tử *E. cuniculi*. Tuy nhiên, trong môi trường nước thì chlorine ở nồng độ rất cao (>100-150 ppm) cũng chỉ có thể tiêu diệt được 95% bào tử của loài *P. neurophilia* và *G. anomala*. Ngoài ra, khi thay đổi pH=7 thì tác dụng của chlorine gia tăng đáng kể với khả năng tiêu diệt 99% bào tử *P. neurophilia* ở nồng độ 100 ppm. Kết quả này một lần nữa cho thấy hiệu quả của chlorine phụ thuộc vào từng giống loài vi bào tử trùng và pH của môi trường nước.

Nghiên cứu của Mogoia (2010) ghi nhận kích thước của các bào tử loài *Acanthamoeba* sp. đã giảm đáng kể khi tiếp xúc với 5 mg/ml chlorine làm 90% các bào tử bị hoại tử. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử cho thấy các tế bào này xảy ra sự ngưng tụ và mất dần các bào quan (ty thể, hạt nhân). Liều lượng chlorine từ 1-7 ppm có thể diệt hiệu quả các nhóm vi bào tử trùng trong 5-30 phút tiếp xúc. Nghiên cứu cũng ghi nhận nồng độ chlorine tiêu diệt bào tử phụ thuộc vào loài vi bào tử trùng và giá trị pH của môi trường.

Theo Athanassopoulou *et al.* (2009), kết quả nghiên cứu đã chứng minh iodine có thể ức chế sự tăng trưởng của các bào tử, đối với bào nang thì tác động hạn chế, nồng độ ức chế tối thiểu 50% dao động từ 90-370ppm iodine đơn chất hoặc từ 60-195ppm iodine hợp chất.

Một số hợp chất khác thuộc nhóm oxy hóa tiêu diệt vi sinh vật thường được sử dụng rộng rãi bao gồm chlorine dioxide ( $\text{ClO}_2$ ) và hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Kết quả nghiên cứu cho thấy 2 loại hợp chất này có tác dụng bất hoạt bào tử Microsporidia rất tốt, thời gian tiếp xúc để bất hoạt bào tử ngắn, có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức hóa chất khác ( $p < 0,05$ ). Chlorine dioxide có tác dụng bất hoạt bào tử rất nhanh ở nồng độ 0,7%. Theo đó, trong thời gian tiếp xúc với  $\text{ClO}_2$  khoảng 1,45 phút, các bào tử đã bị bất hoạt và mất cấu trúc hoàn toàn ở các nghiệm thức thí nghiệm. Ngoài ra,  $\text{H}_2\text{O}_2$  cũng có tác dụng rất tốt để bất hoạt bào tử Microsporidia, thời gian tác dụng của  $\text{H}_2\text{O}_2$  cũng thấp hơn

so với ClO<sub>2</sub>. Ở nồng độ từ 0,5%-0,7%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cho thời gian bất hoạt (1,05 phút ở nồng độ 0,7%) ngắn hơn so với ClO<sub>2</sub>. Tương tự, nồng độ ClO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cao thì thời gian tiêu diệt bào tử ngắn, có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nồng độ thấp.

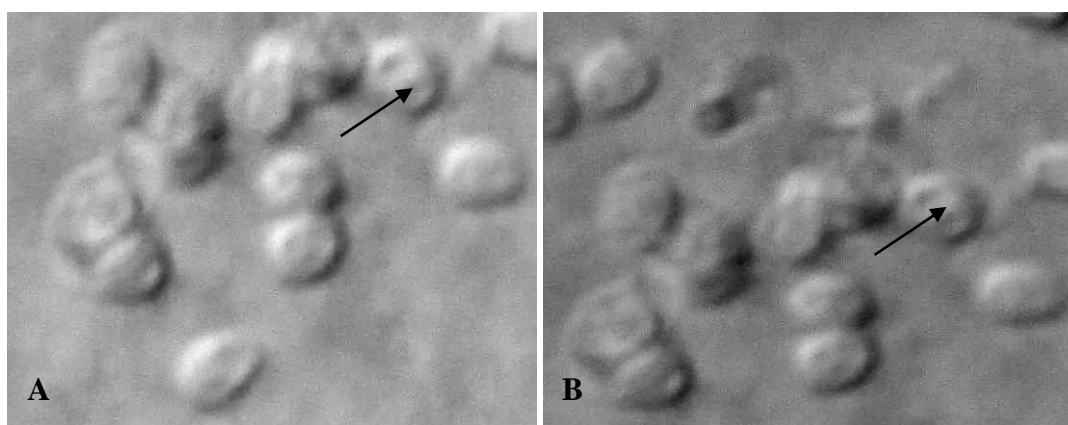
Theo Thomas (2013), các hợp chất oxy hóa có khả năng giải phóng các phân tử hoạt động phản ứng với bề mặt tế bào và có khả năng thâm nhập vào bên trong tế bào, gây ra các tổn thương cho nội bào từ đó tiêu diệt vi sinh vật. Trong đó, ClO<sub>2</sub> là một chất khử trùng mới với phổ diệt trùng rất rộng và được ứng dụng rộng rãi (Zhengyong *et al.*, 2010). ClO<sub>2</sub> làm bất hoạt các vi sinh vật thông qua quá trình oxy hóa trực tiếp các Tyrosine, Methionine, hoặc Cysteine, làm biến đổi các vùng cấu trúc quan trọng của các enzym chuyển hóa hoặc protein màng tế bào (LeChevallier và Kwok-Keung, 2004). Nghiên cứu của Korich *et al.* (1990) cho thấy tác dụng của ClO<sub>2</sub> đối với vi bào tử trùng *Cryptosporidium parvum* tốt hơn các hóa chất oxi hóa khác. Nghiên cứu ghi nhận ClO<sub>2</sub> ở nồng độ 1,3 ppm có thể tiêu diệt trên 90% bào tử của *C. parvum* trong 1 giờ, trong khi đó chlorine và monochloramine cần đạt nồng độ 80 ppm mới có thể mang lại hiệu quả tương tự. Mặt khác, ở nồng độ 0,6 ppm, ClO<sub>2</sub> chỉ có thể tiêu diệt 60% bào tử trong thời gian 1 giờ.

Tương tự chlorine, kết quả tổng hợp của LeChevallier và Kwok-Keung (2004), cũng cho thấy khả năng tiêu diệt vi bào tử trùng của ClO<sub>2</sub> phụ thuộc rất nhiều vào pH và nhiệt độ. Nghiên cứu ghi nhận bào tử của *Cryptosporidium sp.* nhanh chóng bị bất hoạt bởi Chlorine dioxide ở môi trường pH=8 hơn môi trường pH=6. Tuy nhiên, hiệu quả bất hoạt sẽ giảm 40% khi nhiệt độ giảm từ 20°C xuống 10°C. Kết quả nghiên cứu cho thấy ClO<sub>2</sub> có khả năng tiêu diệt 90% bào tử *Cryptosporidium sp.* ở nồng độ 1,3 mg/l trong thời gian 60 phút.

Nghiên cứu của Ortega *et al.* (2007) ghi nhận khả năng diệt bào tử trùng *Encephalitozoon intestinalis* của ClO<sub>2</sub>. Kết quả cho thấy ở nồng độ 4,1 mg/ml, ClO<sub>2</sub> đã tiêu diệt bào tử của *E. intestinalis* trong thời gian 20 phút. Những biến đổi trong cấu trúc của vi bào tử trùng được ghi nhận gồm sự phá hủy cấu trúc của sợi cực, cực nang và các không bào. Ngoài ra, lớp màng của bào tử đã bị

phá hủy cấu trúc dẫn đến hoại tử các bào quan bên trong. Một số nghiên cứu gần đây ghi nhận giá trị nồng độ của  $\text{ClO}_2$  khá cao khi tác dụng với loài vi bào tử trùng *Nosema bombycis*. Các kết quả cho thấy ở nồng độ 15 mg/ml,  $\text{ClO}_2$  cho hiệu quả tiêu diệt các bào tử tốt nhất (100%) trong thời gian 30 phút tiếp xúc. Ngoài ra, kết quả quan sát dưới kính hiển vi điện tử thấy các bào quan của bào tử bao gồm protein, DNA, polysaccharide bị phá hủy trong một thời gian ngắn sau khi được xử lý với  $\text{ClO}_2$  (Zhengyoung *et al.*, 2010).

Những kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Nayaka (2016), tác giả đã chứng minh hiệu quả của  $\text{ClO}_2$  tiêu diệt bào tử vi bào tử trùng NIK-5hm thuộc giống *Nosema* sp. Kết quả khảo sát cho thấy ở nồng độ 400 ppm,  $\text{ClO}_2$  cho hiệu quả tiêu diệt bào tử *Nosema* sp. đến 100% trong 20 phút xử lý. Kết quả tương tự với nồng độ  $\text{ClO}_2$  ở mức 500 ppm trong thời gian từ 5-30 phút xử lý. Ở các nồng độ thấp hơn từ 50-300 ppm, hiệu quả tiêu diệt bào tử *Nosema* sp. giảm dần dao động từ 4,33-63,33%. trong thời gian từ 5-30 phút tác động. Từ các thử nghiệm độ độc và kết quả nêu trên, nghiên cứu này cho rằng việc xử lý nhộng tằm trong dung dịch  $\text{ClO}_2$  nồng độ 400-500 ppm trong thời gian 20 phút là an toàn và ngăn chặn hiệu quả khả năng nhiễm vi bào tử trùng *Nosema* sp.



**Hình 4.29: Cấu trúc bên ngoài của bào tử *Kabatana* sp. sau khi thí nghiệm với (A)  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  50% ở 7,26 phút và (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,6% ở 2,55 phút (mũi tên) (200X)**

Các bào tử sau khi tiếp xúc với hóa chất cho đến khi bị bất hoạt thường thay đổi hình thái và biến đổi cấu trúc bên ngoài. Quan sát bào tử dưới kính hiển



vi ở vật kính 100-200X, hầu hết lớp vỏ kitin bên ngoài bào tử bị biến dạng (Hình 4.29A và 4.29B).

Bên cạnh đó, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cũng là hóa chất được sử dụng diệt vi bào tử trùng hiệu quả. Nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lên bào tử của vi bào tử trùng của Waller (1980) chứng minh tính hiệu quả của hóa chất này. Có 11 loại hóa chất tác dụng vi bào tử trùng *E. cuniculi*. Trong đó, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> là một trong 9 loại hóa chất có hiệu quả tiêu diệt hoàn toàn các bào tử thử nghiệm. Dung dịch bào tử trùng ở mật độ 8x10<sup>9</sup> bào tử/ml được thử nghiệm với dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 1% trong thời gian 30 phút. Sau khoảng thời gian tiếp xúc với hóa chất, 100% bào tử *E. cuniculi* đã bị tiêu diệt.

Nghiên cứu của Ortega *et al.* (2007) cũng đã chứng minh tác dụng của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiêu diệt vi bào tử trùng. Nghiên cứu tiến hành thử nghiệm trên bào tử *E. intestinalis* được nuôi bằng dòng tế bào RK-23 đối với 4 loại hóa chất trong thời gian 1, 5 và 15 phút. Kết quả cho thấy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đã tiêu diệt hoàn toàn bào tử *E. intestinalis* hiệu quả nhất ở thời gian 1 phút và nồng độ 0,5%.

Gần đây nhất là kết quả nghiên cứu của Nayaka (2016), tác giả đã chứng minh hiệu quả tiêu diệt bào tử vi bào tử trùng NIK-5hm thuộc giống *Nosema* sp. của các hợp chất của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kết quả khảo sát cho thấy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và hợp chất Accelerated Hydrogen peroxide (AHP) ở nồng độ 0,5-2% không gây độc cho cơ thể vật chủ (nhộng tằm). Trong khoảng nồng độ từ 0,5-2%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> có khả năng bảo vệ nhộng tằm đến 89,92- 99,67% khỏi nguy cơ lây nhiễm bào tử *Nosema* sp. Riêng hợp chất accelerated hydrogen peroxide (AHP), ở nồng độ 2% có thể loại bỏ khả năng lây nhiễm *Nosema* sp. đến 100%. Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận sự phát triển của nhộng tằm cũng gia tăng có ý nghĩa so với các nghiệm thức không xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Qua kết quả nghiên cứu thử nghiệm 6 loại hóa chất formaline, chlorine dioxide, oxy già, iodine, chlorine và ethanol cho thấy các hóa chất có tác động bất hoạt mầm bệnh vi bào tử trùng Microsporidia. Tuy nhiên, thời gian làm chúng bất hoạt phụ thuộc vào nồng độ từng loại hóa chất.

### 4.3.2 Tác dụng của thuốc kháng ký sinh trùng đối với vi bào tử trùng *Kabatana* sp.

#### 4.3.2.1 Ảnh hưởng của thuốc với vi bào tử trùng *Kabatana* sp.

Bên cạnh những hóa chất tiêu diệt vi bào tử trùng Microsporidia cũng có một số loại thuốc có khả năng ức chế chúng trong thủy sản. Thí nghiệm thực hiện với 3 loại thuốc kháng ký sinh trùng là albendazole, fumagillin, TNP-470 cũng đã cho kết quả khả quan (Bảng 4.10).

**Bảng 4.10: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt vi bào tử của Albendazole, fumagillin và TNP-470**

Hóa chất	Thời gian gây bất hoạt ở các nồng độ hóa chất ( $\mu\text{g/ml}$ ) khác nhau						
	5	4	3	2	1	0,5	0,1
Albendazole	3,20 <sup>a</sup> ±0,2	3,47 <sup>a</sup> ±0,2	3,03 <sup>a</sup> ±0,3	5,42 <sup>b</sup> ±0,2	6,48 <sup>c</sup> ±0,4	7,07 <sup>d</sup> ±0,3	11,75 <sup>e</sup> ±0,4
Fumagillin	4,03 <sup>a</sup> ±0,2	5,38 <sup>b</sup> ±0,2	5,53 <sup>b</sup> ±0,2	5,13 <sup>b</sup> ±0,3	6,98 <sup>c</sup> ±0,4	11,98 <sup>d</sup> ±0,4	13,67 <sup>e</sup> ±0,4
TNP-470	5,37 <sup>a</sup> ±0,3	5,55 <sup>a</sup> ±0,3	6,28 <sup>b</sup> ±0,3	7,05 <sup>c</sup> ±0,3	7,48 <sup>c</sup> ±0,3	8,90 <sup>d</sup> ±0,4	13,75 <sup>e</sup> ±0,5

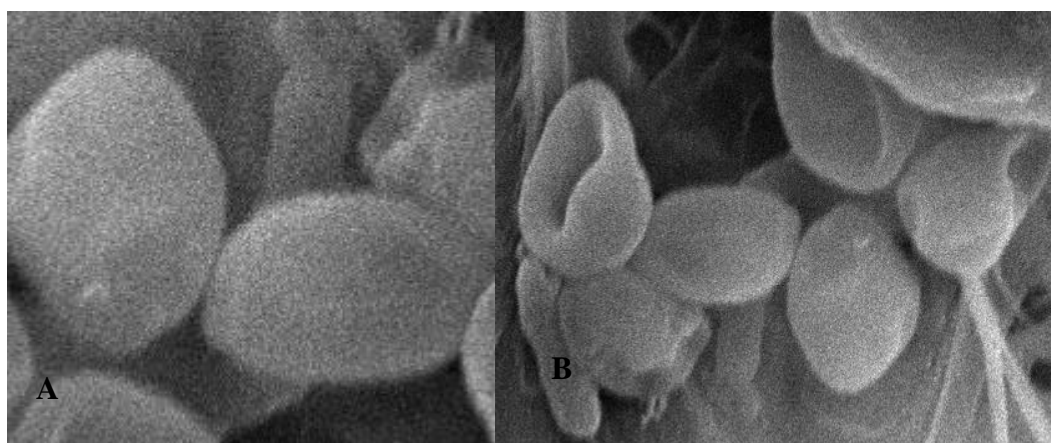
*Ghi chú: thời gian gây chết thể hiện bằng giờ và được tính đến khi bào tử bất hoạt và chết ở các giếng thí nghiệm. Các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).*

Kết quả Bảng 4.10 cho thấy các loại thuốc kháng ký sinh trùng có thời gian gây bất hoạt cho vi bào tử trùng *Kabatana* sp. (dao động từ 3,20 - 13,75 giờ) dài hơn các nghiệm thức sử dụng hóa chất. Ở nghiệm thức đối chứng thì vi bào tử trùng vẫn hoạt động bình thường và chúng ngưng hoạt động sau 2 tuần. Ở nghiệm thức sử dụng albendazole (nồng độ 5  $\mu\text{g/ml}$ ) cho kết quả bất hoạt bào tử nhanh nhất trong thời gian 3,2 giờ. Ở nồng độ thấp thì hiệu quả càng thấp, albendazole nồng độ 0,1  $\mu\text{g/ml}$  có tác dụng bất hoạt Microsporidia chậm nhất với thời gian tiếp xúc lên đến 11,75 giờ. Các nghiệm thức nồng độ có thời gian bất hoạt bào tử khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), riêng nghiệm thức 3, 4, 5  $\mu\text{g/ml}$  khác biệt không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ).

Đối với nhóm thuốc là fumagillin và TNP-70, kết quả đề tài ghi nhận tác dụng bất hoạt bào tử Microsporidia khá tốt, tuy nhiên thời gian tác dụng chậm

hơn có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với albendazole. Trong các nghiệm thức thí nghiệm, fumagillin và TNP-470 nồng độ càng cao thì có thời gian tiếp xúc để bất hoạt bào tử càng thấp và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Riêng nghiệm thức TNP-470: 4-5  $\mu\text{g/ml}$  và 1-2  $\mu\text{g/ml}$ ; nghiệm thức fumagillin 2, 3, 4  $\mu\text{g/ml}$  thấy khác biệt không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ). Ở nồng độ thấp (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) thời gian tác dụng của TNP-470 cao hơn gấp đôi so với các nghiệm thức có nồng độ cao (4-5  $\mu\text{g/ml}$ ). Bên cạnh đó, ở nồng độ thấp (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) thời gian tác dụng của fumagillin cao hơn gấp ba lần so với các nghiệm thức có nồng độ cao (4-5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy được sự tác động của thuốc lên các bào tử Microsporidia làm chúng bị bất hoạt và dần dần bị tiêu diệt do màng bào tử bị mất cấu trúc, dẫn đến sự thoái hóa bên trong tế bào chất, vỏ bào tử dần bị teo lại (Hình 4.30A và B).



**Hình 4.30: Bào tử *Kabatana* sp. trước (A) và sau thí nghiệm (B) với fumagillin 2  $\mu\text{g/ml}$  ở thời điểm 5 phút (Mẫu quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét, SEM)**

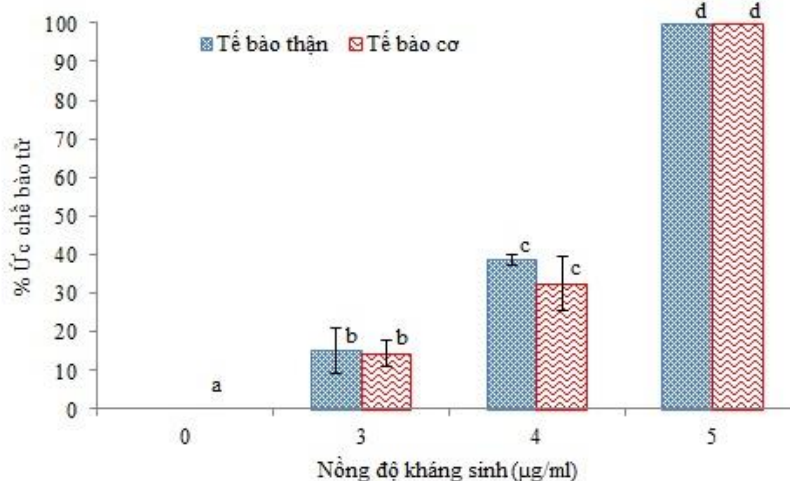
Từ kết quả của các nghiên cứu lược khảo ở trên và các kết quả của đề tài, cho thấy hiệu quả của các thuốc kháng ký sinh trùng albendazole, fumagillin và TN-470 trong điều trị bệnh do nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia trên cá rất khác nhau. Chúng phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ thuốc, thời gian tiếp xúc và đặc biệt là phụ thuộc vào giống loài vi bào tử trùng Microsporidia ký sinh trên vật chủ. Do đó, để có thể đạt được hiệu quả điều trị cao nhất thì cần thiết có

những thử nghiệm điều trị trên cá để có thể xác định chính xác loại thuốc đặc trị nhóm vi bào tử trùng Microsporidia.

#### 4.3.2.2 Xác định khả năng ức chế của thuốc lên vi bào tử trùng *Kabatana* sp. gây nhiễm trong tế bào thận/cơ cá tra

Từ kết quả khảo sát tác động của 3 loại thuốc kháng ký sinh trùng lên vi bào tử trùng *Kabatana* sp. (mục 4.3.2.1) cho thấy albendazole và fumagillin có tác dụng bất hoạt bào tử rất tốt ở các nồng độ 3, 4, 5  $\mu\text{g/ml}$  trong thời gian ngắn. Vì vậy, đề tài tiếp tục khảo sát khả năng ức chế vi bào tử *Kabatana* sp. của 2 loại thuốc này khi cho bào tử lây nhiễm vào các tế bào chủ (tế bào thận/cơ cá tra). Các nghiệm thức thí nghiệm được quan sát dưới kính hiển vi (10-40x) ở thời điểm 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 giờ. Kết quả đánh giá hiệu quả của thuốc dựa vào tỷ lệ ức chế sự phát triển của vi bào tử *Kabatana* sp. trong các giếng có sử dụng thuốc.

Kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm vi bào tử trùng *Kabatana* sp. với tế bào thận/cơ cá tra có sử dụng thuốc albendazole cho thấy tỉ lệ bào tử bị ức chế tăng dần theo nồng độ thuốc, có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) (Hình 4.31).



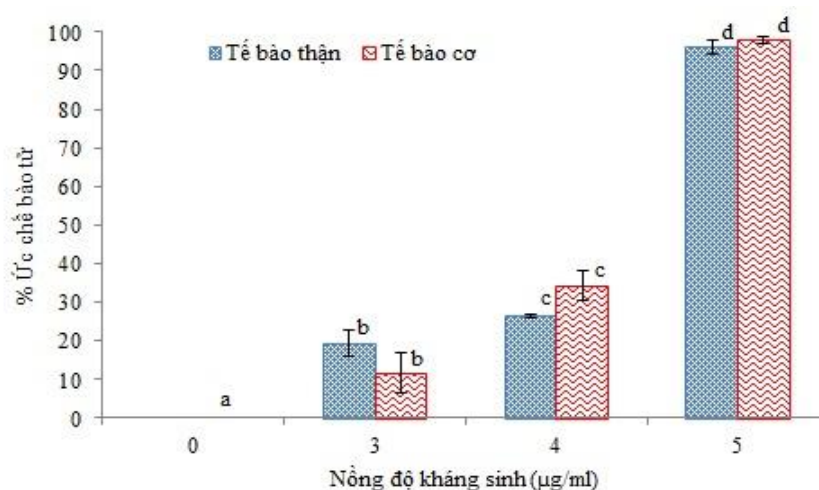
**Hình 4.31: Sự ức chế của albendazole lên bào tử *Kabatana* sp. nhiễm trên tế bào thận và cơ cá tra sau 6 giờ cảm nhiễm**

Ghi chú: các cột có cùng hình dạng có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Tương tự, kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm vi bào tử *Kabatana* sp. với tế bào thận/cơ cá tra có sử dụng thuốc fumagillin cũng cho thấy tỉ lệ bào tử bị

ức chế tăng dần theo nồng độ thuốc, có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$  (Hình 4.32).

Đồ thị Hình 4.31 và 4.32 cho thấy sau 6 giờ cảm nhiễm, nghiệm thức sử dụng albendazole nồng độ 5  $\mu\text{g/ml}$ , ức chế 100% bào tử *Kabatana* sp. Nghiệm thức sử dụng fumagillin (5  $\mu\text{g/ml}$ ) cũng có tác dụng ức chế gần như hoàn toàn các bào tử, với tỷ lệ ức chế 96,16% ở nghiệm thức cảm nhiễm tế bào thận và ức chế 97,87% ở nghiệm thức cảm nhiễm sợi cơ. Trong khi đó, tỷ lệ ức chế bào tử ở nồng độ 3 và 4  $\mu\text{g/ml}$  của cả 2 loại thuốc albendazole và fumagillin ở các nghiệm thức rất thấp ( $\leq 35\%$ ).



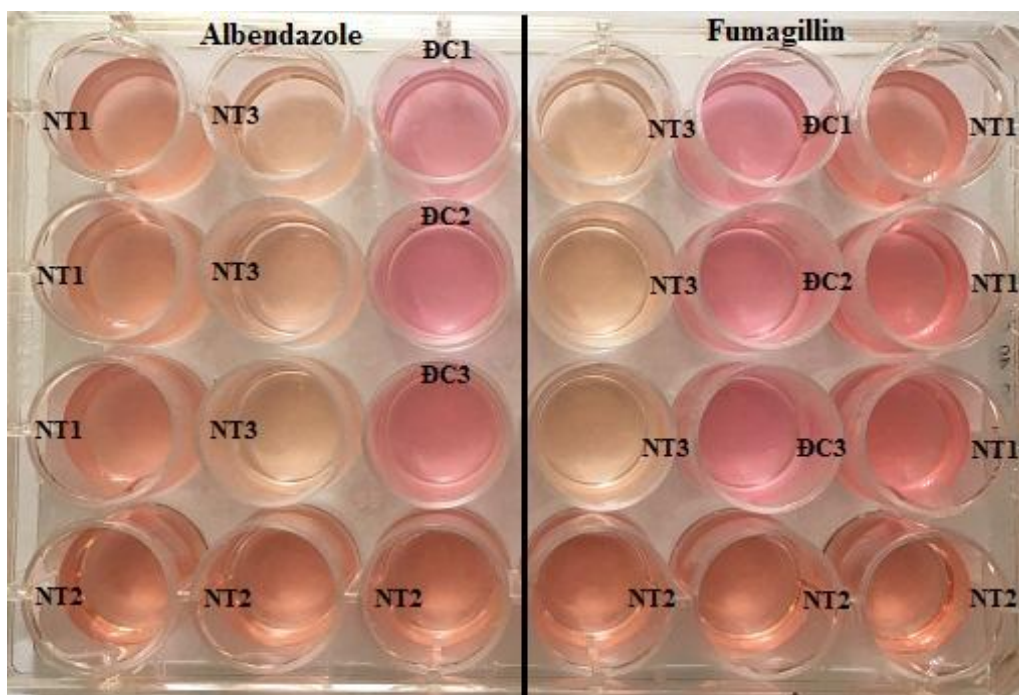
**Hình 4.32: Sự ức chế của fumagillin lên bào tử *Kabatana* sp. nhiễm trên tế bào thận và cơ cá tra**

Ghi chú: các cột có cùng hình dạng có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Quan sát giếng nuôi tế bào thận/cơ cá (ĐC1) có sử dụng thuốc albendazole và fumagillin nồng độ 5  $\mu\text{g/ml}$ , sau 48 giờ các tế bào thận/cơ của cá vẫn phát triển bình thường, không phát hiện sự suy giảm về số lượng của các tế bào thận cũng như sợi cơ. Điều này cho thấy thuốc kháng ký sinh trùng albendazole và fumagillin ở liều lượng 5  $\mu\text{g/ml}$  không gây độc cho tế bào chủ và có thể sử dụng an toàn. Ở giếng ĐC2, tế bào thận và cơ vẫn phát triển bình thường trong môi trường L-15. Ở giếng ĐC3, môi trường L-15 không bị nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, ở giếng ĐC4-, cảm nhiễm với vi bào tử *Kabatana* sp. thì

100% tế bào thận và cơ cá đã bị bào tử xâm nhiễm làm biến đổi cấu trúc tế bào sau 12 giờ cảm nhiễm (tương tự kết quả cảm nhiễm ở phần 4.2.3).

Ở các thí nghiệm cảm nhiễm bào tử với tế bào thận và sử dụng thuốc kháng ký sinh trùng, có thể quan sát bằng mắt thường các giếng nuôi cấy ở cả 3 NT thấy có sự thay đổi màu sắc của môi trường. So sánh với giếng đối chứng âm (ĐC2: tế bào thận + môi trường L15), màu môi trường chuyển từ hồng đậm ở NT1 nhạt dần đến NT3 (Hình 4.33). Quan sát cho thấy các tế bào thận đã bị bào tử *Kabatana* sp. xâm nhiễm và phá hủy cấu trúc tế bào.



**Hình 4.33: Giếng nuôi tế bào thận thử nghiệm tác động của thuốc albendazole và fumagillin**

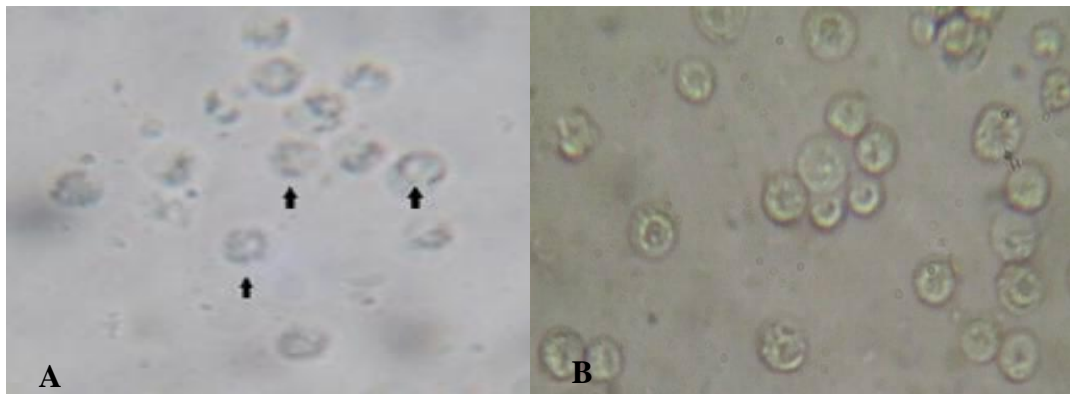
ĐC1: tế bào thận + albendazole/fumagillin, ĐC2: tế bào thận + môi trường L-15, ĐC3: môi trường L15; NT1: tế bào thận + bào tử *Kabatana* sp. + albendazole/fumagillin (5  $\mu\text{g/ml}$ ); NT2: tế bào thận + bào tử *Kabatana* sp. + albendazole/fumagillin (4  $\mu\text{g/ml}$ ). NT3: tế bào thận + bào tử *Kabatana* sp. + albendazole/fumagillin (3  $\mu\text{g/ml}$ ).

Quan sát các nghiệm thức cảm nhiễm tế bào thận có sử dụng albendazole, ở thời điểm 2 giờ cảm nhiễm, vi bào tử *Kabatana* sp. vẫn hoạt động. Tuy nhiên, sau 4 giờ cảm nhiễm, albendazole nồng độ 3  $\mu\text{g/ml}$  (NT3) có tác dụng ức chế bào tử khá thấp, 15,24% bào tử bị ức chế phát triển; nồng độ 4  $\mu\text{g/ml}$  (NT2) bào tử bị ức chế 38,76%. Đối với các nghiệm thức có sử dụng fumagillin, tác dụng của thuốc lên vi bào tử *Kabatana* sp. cũng có sự thay đổi sau 4 giờ cảm nhiễm.

Thuốc Fumagillin nồng độ 3  $\mu\text{g/ml}$  (NT3) có tác dụng ức chế 19,29% bào tử, nồng độ 4  $\mu\text{g/ml}$  (NT2) ức chế 26,45% bào tử.

Kết quả quan sát dịch môi trường cảm nhiễm trên kính hiển vi cho thấy ở NT3 các tế bào thận bị vi bào tử xâm nhiễm gây hại, nồng độ thuốc albendazole và fumagillin (3  $\mu\text{g/ml}$ ) không hoàn toàn ức chế bào tử *Kabatana* sp. Tuy nhiên, ở NT1 với nồng độ thuốc 5  $\mu\text{g/ml}$  thì rõ ràng màu sắc dịch môi trường không khác biệt nhiều so với giếng đối chứng, kết quả quan sát dịch môi trường cảm nhiễm cho thấy ở nồng độ này thuốc có khả năng ức chế vi bào tử gây hại cho tế bào (Hình 4.34).

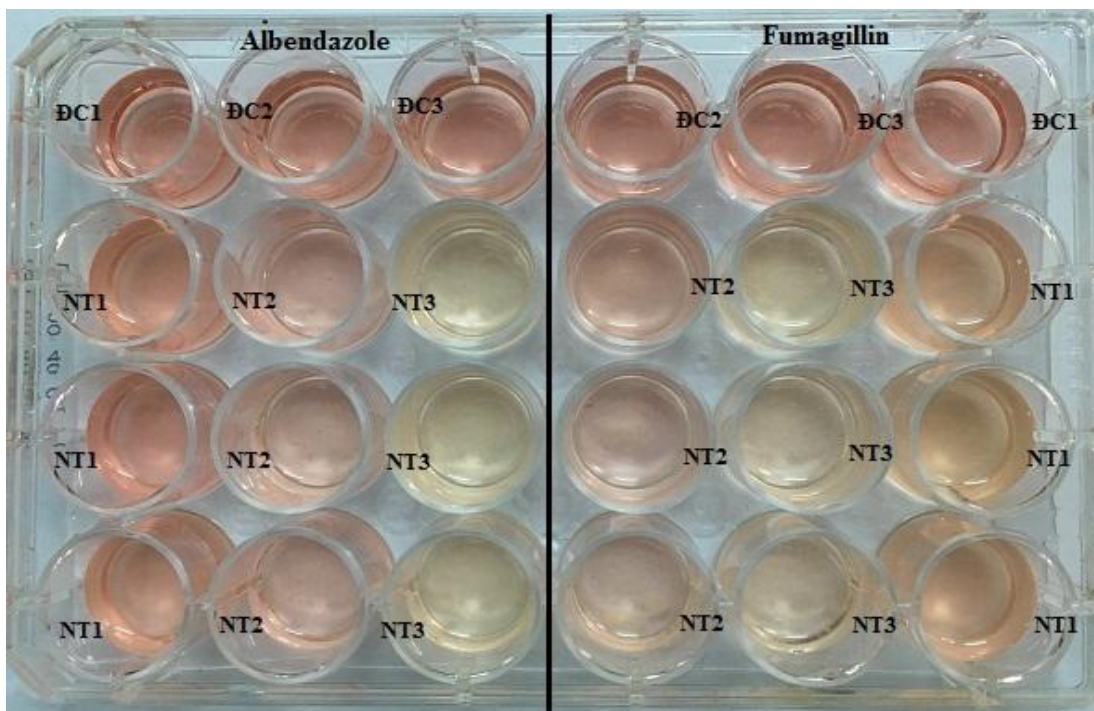
Tương tự, màu sắc ở các giếng nuôi sợi cơ cũng có sự thay đổi màu môi trường theo nồng độ thuốc. Màu môi trường chuyển từ hồng ở NT1 nhạt dần đến NT2 và chuyển sang màu vàng nhạt ở NT3. Quan sát dịch môi trường NT2 và NT3 trên kính hiển vi cho thấy nhiều sợi cơ đã bị bào tử *Kabatana* sp. xâm nhiễm và phá hủy cấu trúc vách sợi cơ (Hình 4.35).



**Hình 4.34: Tế bào thận (A) NT3 - tế bào thận bị mất cấu trúc - 40X; (B) NT1 - tế bào thận phát triển bình thường - 100X**

Tác động của thuốc albendazole và fumagillin lên vi bào tử *Kabatana* sp. khi gây nhiễm với tế bào cơ cũng cho kết quả tương tự như gây nhiễm trên tế bào thận. Đối với albendazole, ở NT3, nồng độ thuốc 3  $\mu\text{g/ml}$  không ức chế hiệu quả bào tử, nên hầu hết các sợi cơ bị bào tử xâm nhiễm làm ảnh hưởng vách sợi cơ, tỉ lệ ức chế chỉ đạt 14,45 % bào tử. Ở nồng độ 4  $\mu\text{g/ml}$  (NT2) tỉ lệ ức chế 32,53%. Với fumagillin, nồng độ 3  $\mu\text{g/ml}$  (NT3) ức chế 11,53 % bào tử, nồng độ 4  $\mu\text{g/ml}$  (NT2) ức chế 34,31%. Riêng NT1, với nồng độ 5  $\mu\text{g/ml}$ , cả

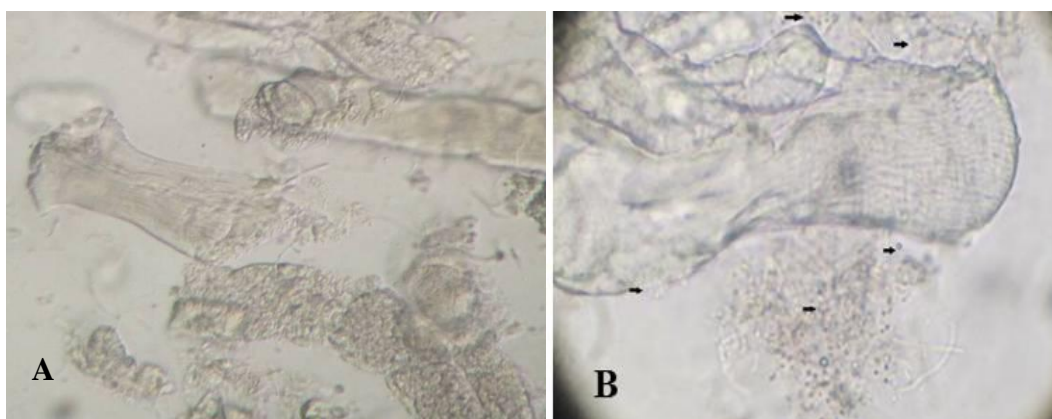
albendazole và fumagillin đã ức chế bào tử, các bào tử bị bất hoạt và thường dính lại với nhau thành cụm (Hình 4.36).



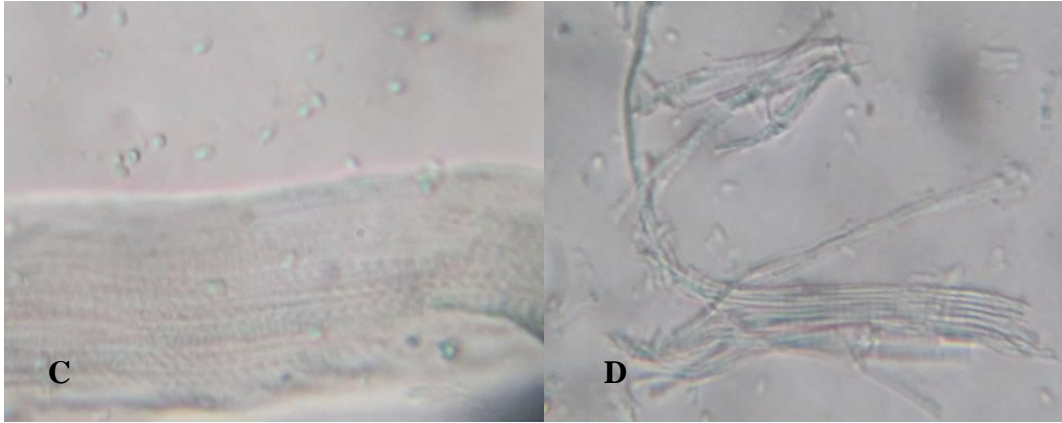
**Hình 4.35: Giếng nuôi sợi cơ thử nghiệm tác động của thuốc albendazole và fumagillin**

DC1: sợi cơ + albendazole/fumagillin, DC2: sợi cơ + môi trường L-15, DC3: môi trường L15; NT1: sợi cơ + bào tử trùng *Kabatana sp.* + albendazole/fumagillin (5  $\mu\text{g/ml}$ ); NT2: sợi cơ + bào tử *Kabatana sp.* + albendazole/fumagillin (4  $\mu\text{g/ml}$ ). NT3: sợi cơ + bào tử *Kabatana sp.* + albendazole/fumagillin (3  $\mu\text{g/ml}$ ).

Như vậy, từ kết quả thí nghiệm ở phần 4.3.2 và 4.3.3 cho thấy albendazole và fumagillin có thể được sử dụng trong điều trị bệnh do vi bào tử trùng *Kabatana sp.* ký sinh trong cơ của cá. Nồng độ của albendazole và fumagillin có tác dụng hiệu quả ức chế vi bào tử trùng là 5  $\mu\text{g/ml}$ .







**Hình 4.36: Sợi cơ cá tra (A) bào tử xâm nhiễm phá hủy cấu trúc sợi cơ; (B) bào tử dính lại với nhau thành cụm; (C, D) bào tử phá hủy vách sợi cơ**

#### 4.3.2.3 Thảo luận chung

Benzimidazole là nhóm thuốc có phổ diệt ký sinh trùng khá rộng nên được sử dụng khá rộng rãi, bao gồm albendazole, mebendazole, thiabendazole, oxibendazole, flubendazole. Các loại thuốc này có tác dụng ngăn chặn sự hình thành các vi ống của bào tử Microsporidia. Khi các vi ống này bị phá hủy, các chức năng vận chuyển, chuyển hóa và hấp thụ glucose và glycogen của bào tử bị ức chế dẫn đến bị tiêu diệt hoàn toàn (Kappagoda *et al.*, 2011). Khả năng tác dụng của albendazole phụ thuộc vào giống loài vi bào tử Microsporidia và liều lượng thuốc sử dụng. Nghiên cứu của Franssen *et al.* (1995) thử nghiệm các loại thuốc khác nhau gồm thiabendazole, albendazole, oxibendazole để điều trị bệnh do nhóm vi bào tử trùng gây ra. Loài ký sinh trùng *Encephalitozoon cuniculi* được cảm nhiễm vào các tế bào thận thỏ RK-13. Theo đó, albendazole có nồng độ ức chế tối thiểu khá thấp, giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 0,3; 0,004; 0,0015  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả ghi nhận ở các nghiệm thức điều trị albendazole với nồng độ 5 mg/ml thì không có bào tử nào phát triển sau 3 tuần điều trị. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy kháng sinh nhóm benzimidazole có khả năng điều trị hiệu quả bệnh do loài vi bào tử trùng *E. cuniculi* gây ra.

Theo nghiên cứu của Schmahl và Benini (1998), kết quả khảo sát ảnh hưởng của albendazole lên vi bào tử *Glugea anomala* gây bệnh trên loài cá ba gai *Gasterosteus aculeatus* cho thấy nồng độ thuốc sử dụng rất cao so với kết quả của đề tài. Albendazole được thử nghiệm với các nồng độ 1, 5, 10, 15 và 50

$\mu\text{g/ml}$  trong thời gian 2-6 giờ. Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng khá nghiêm trọng của nhóm thuốc này lên cấu trúc của các bào tử *G. Anomala* tương tự với kết quả của đề tài, sự xuất hiện những cấu trúc bị phá hủy dẫn đến hình thành các bào tử khiếm khuyết các bào quan, màng tế bào tạo nên cấu trúc của bào tử trưởng thành bị phá vỡ, từ đó làm mất cấu trúc của bào tử.

Nghiên cứu của Didier *et al.* (2006) thử nghiệm tác dụng của thuốc albendazole đối với 2 loài *Encephalitozoon intestinalis* và *Vittaforma corneae*. Tương tự như nghiên cứu của Franssen *et al.* (1995), dòng tế thận thỏ RK-13 được sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm. Kết quả cho thấy albendazole có giá trị MIC50 đối với *V. corneae* (55 ng/ml) cao hơn đáng kể so với *E. intestinalis* (8 ng/ml). Từ đó cho thấy albendazole cho khả năng điều trị bệnh do *E. intestinalis* hiệu quả hơn so với loài *V. corneae*.

Khảo sát gần đây của Lallo *et al.* (2013) trên loài vi bào tử trùng *E. cuniculi* cũng đã ghi nhận hiệu quả điều trị bệnh của kháng sinh albendazole. Kết quả khảo sát cho thấy những biểu hiện phục hồi trong cấu trúc mô của các cơ quan sau 15 ngày điều trị bằng albendazole. Sau 30 ngày điều trị, quan sát các tiêu bản mô học không thấy sự hiện diện của các bào tử *E. cuniculi*. Tuy nhiên, albendazole không thể tiêu diệt hoàn toàn các bào tử còn tồn tại trong môi trường nước, nên sau 60 ngày thì cá lại tái nhiễm vi bào tử trùng *E. cuniculi*. Từ kết quả trên cho thấy albendazole không thể điều trị hoàn toàn bệnh do loài *E. cuniculi* gây ra nhưng có thể sử dụng để kiểm soát sự nhiễm trùng và giảm các triệu chứng của bệnh trên đàn cá nuôi.

Kết quả nghiên cứu của Nayaka (2016) đã chứng minh hiệu quả tiêu diệt bào tử vi bào tử trùng NIK-5hm thuộc giống *Nosema* sp. của albendazole và mebendazole. Kết quả khảo sát cho thấy albendazole và mebendazole ở nồng độ 0,25; 0,5; 1,0% không gây độc cho cơ thể vật chủ là nhộng tằm và có tác dụng lên bào tử của *Nosema* sp. Trong khoảng nồng độ 0,25; 0,5; 1,0% albendazole và mebendazole có khả năng giảm tỷ lệ chết của nhộng tằm đến 87,75- 96,08%, so với nghiệm thức đối chứng, với tỷ lệ chết lên đến 54%. Ngoài

ra, nghiên cứu cũng ghi nhận sự phát triển của nhộng tằm cũng gia tăng có ý nghĩa so với các nghiệm thức được điều trị với các kháng sinh trên.

Theo Didier *et al.* (2006), Athanassopoulou *et al.* (2009), Selzer (2009), nhóm thuốc kháng sinh fumagillin được điều chế từ loài nấm *Aspergillus fumigatus* và đã được sử dụng vào những năm 1950 để điều trị bệnh do Microsporidia gây ra. Fumagillin có tác dụng ức chế sự sao chép DNA và RNA của các loài vi bào tử trùng Microsporidia. Nhóm thuốc kháng sinh này gồm có fumagillin và 1 dẫn xuất khác có tên là TNP-470. Tương tự như albendazole, khả năng tác dụng của TNP-470 phụ thuộc vào loài vi bào tử trùng Microsporidia và ký chủ cá. Một nghiên cứu khác của Franssen *et al.* (1995) cũng đã thử nghiệm fumagillin để điều trị bệnh do nhóm vi bào tử trùng *E. cuniculi* gây ra và chứng minh được tác dụng tiêu diệt bào tử hiệu quả của loại thuốc này. Các tế bào thận thỏ và các bào tử *E. cuniculi* được nuôi cấy và cảm nhiễm. Kết quả ghi nhận, ở các nghiệm thức điều trị với fumagillin, không bào tử nào hình thành sau 3 tuần điều trị tại một nồng độ 5 mg/ml. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu IC của fumagillin rất thấp (0,00086 µg/ml). Những biểu hiện của tế bào vi bào tử trùng bị phá hủy được quan sát. Điển hình đó là sự thoái hóa màng tế bào và dẫn đến sự thẩm thấu sâu hơn của fumagillin. Tiếp theo là sự ức chế và phá hủy các sợi cực của bào tử và phá hủy bào tử này. So với các nhóm thuốc kháng sinh khác thì fumagillin cho kết quả điều trị tốt và hiệu quả hơn.

Nghiên cứu của Beauvais *et al.* (1994) cũng khẳng định hiệu quả điều trị bệnh do vi bào tử trùng gây ra bằng kháng sinh TNP-70. Thí nghiệm thực hiện cảm nhiễm loài vi bào tử trùng *E. cuniculi* trên dòng tế bào thận thỏ. Các tế bào này sau 3 ngày điều trị với TNP-470, với nồng độ thấp nhất 0,0001 µg/ml, các bào tử *E. cuniculi* chỉ bị giảm 20% số lượng bào tử. Mặt khác, ở nồng độ 0,0005 µg/ml, TNP-470 hạn chế sự phát triển của 80% các bào tử *E. cuniculi*. Ở các nồng độ cao hơn từ 0,002-5 µg/ml, các bào tử *E. cuniculi* đã bị phá hủy hoàn toàn 100%, ngăn chặn sự lây nhiễm sang các tế bào chủ khác.

Nghiên cứu của Didier (1998) khảo sát tác dụng của fumagillin và kháng sinh cùng nhóm là TNP-470 đối với loài *Encephalitozoon intestinalis* và *Vittaforma corneae*. Kết quả cho thấy fumagillin có giá trị MIC50 đối với *V. corneae* (0,81 ng/ml) cao hơn đáng kể so với *E. intestinalis* (0,515 ng/ml). Không có sự khác biệt đáng kể ở giá trị MIC50 của TNP-470 đối với *E. intestinalis* và *V. corneae*, trong khoảng 0,35 ng/ml. Từ những kết quả trên, nghiên cứu đưa ra kết luận fumagillin và TNP-470 có thể là một thuốc mới đầy hứa hẹn cho việc điều trị nhóm vi bào tử trùng Microsporidia. Do fumagillin, TNP-470 có tác dụng tiêu diệt cả hai loài *E. intestinalis* và *V. corneae* và TNP-470 đã được chứng minh là ít độc hại đối với cơ thể sinh vật.

Tương tự, theo nghiên cứu của Speare *et al.* (1999) ghi nhận thì kết quả điều trị bệnh do nhiễm *Loma salmonae* trên cá hồi vân có nhiều kết quả khả quan. Nghiệm thức thử nghiệm tác dụng của các loại thuốc fumagillin (0,1 µg/ml) và TNP-470 (0,005 µg/ml), kết quả cho thấy ở cả hai nghiệm thức đều có tác dụng kiềm chế và giảm dần sự hình thành và phát triển các khối tế bào khổng lồ (xenomas) trong cơ cá. Trong đó fumagillin làm giảm số lượng các xenomas đáng kể trong 10 tuần điều trị ( $p < 0,01$ ). Kết quả nghiên cứu cho rằng cả hai loại thuốc fumagillin và TNP-470 có giá trị trong việc kiểm soát *L. salmonae* gây bệnh trên cá hồi. Từ những kết quả ghi nhận được ở các nghiên cứu trước kết hợp với nghiên cứu đưa đến kết luận fumagillin và TNP-470 có thể là các loại thuốc mới đầy hứa hẹn cho việc điều trị bệnh do vi bào tử trùng gây ra.

Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Huang *et al.* (2013) ghi nhận thì kết quả có sự khác biệt trên ong mật. Kết quả cho thấy fumagillin không có tác dụng điều trị bệnh do vi bào tử trùng *Nosema ceranae* gây ra trên ong mật. Fumagillin là kháng sinh đã được sử dụng rộng rãi ở Hoa Kỳ để kiểm soát dịch bệnh do loài vi bào tử trùng *Nosemasp.* gây ra trên ong mật. Fumagillin độc hại đối với động vật có vú và phải được áp dụng theo mùa để tránh dư lượng thuốc tồn lưu trong mật ong, với liều lượng giảm dần theo các tháng trong năm. Nghiên cứu thử nghiệm kháng sinh fumagillin ở nồng độ 25 mg/l và giảm dần đến 5 µg/l. Kết quả cho thấy sự sinh sản của bào tử *N. Ceranae* tăng 100% so với các

nghiệm thức nhiễm bệnh nhưng không được điều trị với fumagillin. Thông qua các kết quả phân tích protein và enzym, nghiên cứu kết luận rằng các phương pháp sử dụng fumagillin có thể làm tăng mức độ lây nhiễm vi bào tử trùng *N.ceranae* trầm trọng hơn là ngăn chặn vì chúng tạo ra môi trường thuận lợi và kích thích sự sinh sản của vi bào tử trùng nhiễm trên ong mật.

## Chương 5

### KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

#### 5.1 Kết luận

Cá tra bị bệnh gạo trong cơ có nhiều túi bào nang màu trắng đục (cá hương, cá giống), vàng kem, nâu hoặc đen (cá thịt). Màu sắc và kích cỡ bào nang gạo thay đổi khác nhau theo giai đoạn phát triển của cá, dao động từ 0,5-10 mm.

Vùng cơ của cá tra nhiễm bào nang gạo bị mất cấu trúc và hoại tử, các tế bào mô bị vi bào tử trùng *Microsporidia* ly giải hoàn toàn, có sự xuất hiện bào nang tiên khởi trong các bó cơ. Bào nang có một lớp màng là mô liên kết bao bọc khá dày và tỏa ra nhiều phía, nối với các bó cơ.

Vi bào tử trùng *Microsporidia* nhiễm trong cơ cá tra bị bệnh gạo là *Kabatana* sp. Bào tử có dạng hình quả lê, hình trứng, kích thước rất nhỏ.

Tế bào thận và sợi cơ của cá tra có khả năng sống sót trong môi trường L-15. Kết quả cảm nhiễm bào tử vào tế bào thận và cơ cho thấy sau 2 giờ cảm nhiễm, các tế bào bị bào tử xâm nhập với tỉ lệ nhiễm là  $11,68 \pm 2,60\%$  tổng số tế bào thận và  $7,49 \pm 3,02\%$  tổng số sợi cơ. Thời điểm 12 giờ sau khi cảm nhiễm, 100% các tế bào thận và sợi cơ bị bào tử xâm nhiễm.

Các hóa chất ethanol, formalin (nồng độ 40-70%), chlorine dioxide, hydrogen peroxide, chlorine và iodine (nồng độ 0,1-0,7%) có tác động ảnh hưởng đến vi bào tử trùng *Kabatana* sp. Thời gian tác dụng của hóa chất dao động từ 1,05-39,50 phút tùy vào nồng độ. Thuốc albendazole, fumagillin và TNP-470 cũng có khả năng tác động đến *Kabatana* sp. ở các nồng độ từ 0,1; 0,2; 1; 2; 3; 4; 5  $\mu\text{g/ml}$ . Thời gian tác dụng của albendazole từ 3,20-11,75 giờ, fumagillin từ 4,03-13,67 giờ và TNP-470 từ 5,37-13,75 giờ. Thuốc albendazole và fumagillin nồng độ 5  $\mu\text{g/ml}$  có khả năng ức chế *Kabatana* sp. nhiễm trong tế bào thận/cơ cá tra, có thể áp dụng trong điều trị bệnh gạo do vi bào tử trùng *Kabatana* sp. ký sinh trong cơ cá tra.

## 5.2 Đề xuất

- Tiếp tục nghiên cứu phân loại vi bào tử trùng *Kabatana* sp. gây bệnh gạo trên cá tra đến mức loài.
- Gây cảm nhiễm vi bào tử trùng *Kabatana* sp. trong môi trường nuôi cấy tế bào thận và sợi cơ cá tra ở nhiều mật độ khác nhau để đánh giá mức độ gây tác hại với tế bào ký chủ.
- Gây cảm nhiễm vi bào tử trùng *Kabatana* sp. và thử nghiệm điều trị bệnh gạo với albendazole và fumagillin trong điều kiện ao nuôi.
- Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy tế bào thận và sợi cơ của cá tra để phục vụ tốt cho các nghiên cứu về thuốc điều trị.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

- Đặng Thúy Bình, Vũ Đặng Hạ Quyên, Lê Thị Thu Hà, Trần Quang Sáng và Nguyễn Đắc Kiên, 2014. Xác định ấu trùng sán lá song chủ (metacercariae) ký sinh trên một số loài cá dựa vào đặc điểm hình thái và di truyền. Tạp chí Khoa học, trường Đại học Cần Thơ. (2014) (2): 15-23.
- Hà Kỳ và Bùi Quang Tề, 2007. Ký sinh trùng cá nước ngọt Việt Nam. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật. 360 trang.
- Khuất Hữu Thanh, 2006. Kỹ thuật gen, nguyên lý và ứng dụng. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Lê Thanh Hùng, 2008. Một số kết quả nghiên cứu về dinh dưỡng và thức ăn trên cá tra, cá basa tại Đại học Nông Lâm, Tp Hồ Chí Minh. Khoa Thủy sản, Đại học Nông Lâm.
- Nguyễn Hoàng Lộc, 2006. Công nghệ tế bào. NXB Đại học Huế.
- Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Kết quả nghiên cứu bước đầu về bệnh gao ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản lần 4, Đại học Cần Thơ. trang 262-269.
- Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Xác định nhóm ký sinh trùng tạo bào nang trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ. 22c: 155-164.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, Đặng Thụy Mai Thy, Nguyễn Thanh Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2008. Khảo sát sự nhiễm ký sinh trùng trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh ở tỉnh An Giang. Tạp chí Khoa học. 1: 204-212.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, Glenn Allan Bristow, Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2008. Đa dạng sinh học ký sinh trùng trên cá gai (*Gasterosteus aculeatus*) sống trong các môi trường nước ngọt, lợ và mặn ở Hordaland, Norway. Tạp chí khoa học chuyên ngành Thủy sản. ISSN: 1859-2333. Khoa Thủy sản - Đại học Cần Thơ. Trang 214-222.
- Phạm Thị Thanh Hương và Từ Thanh Dung, 2010. Đặc điểm mô bệnh học của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bị bệnh vàng da ở Đồng bằng sông Cửu Long. Luận văn thạc sĩ, khoa Thủy sản, trường đại học Cần Thơ.

### 2. Tài liệu tiếng Anh

- Abdel-Baki, A.A.S., Al-Quraishy S., Rocha S., Dkhil M.A., Casal G., Azevedo C. 2015: Ultrastructure and phylogeny of *Glugea nageliasp.* n. (Microsporidia: *Glugeidae*), infecting the intestinal wall of the yellowfin hind, *Cephalopholis hemistiktos* (Actinopterygii: *Serranidae*) from the Red Sea. *Folia Parasitologica*. 62: 1-9.



- Abdel-Baki, A.S., S. Al-Quraishy, H. Al-Qahtani, M.A. Dkhil and C. Azevedo, 2012. Morphological and ultrastructural description of *Pleistophora dammami* sp. n. infecting the intestinal wall of *Saurida undosquamis* from the Arabian Gulf, Saudi Arabia. *Parasitology Research*. 111: 413-418.
- Abdel-Ghaffar, F., A.R. Bashtar, K. Morsy, H. Mehlhorn, S. Al Quraishy, K. Al-Rasheid and R. Abdel-Gaber. 2011. Morphological and molecular biological characterization of *Pleistophora aegyptiaca* sp. nov. infecting the Red Sea fish *Saurida tumbil*. *Parasitology Research*. 110: 741-52.
- Amigo, J.M., H. Salvado and M.P. Gracia, 1998. The pathologic cycle of the infection of the microsporidian *Microgemma ovoidea* (Thel., 1895) in the liver of the Red Band Fish (*Cepola macrophthalma* L.). *Parasitology Research*. 84: 7–12.
- Anane, S. and H. Attouchi, 2010. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*. 34: 450-464.
- Andreadis, T.G. and C.R. Vossbrinck, 2002. Life cycle, ultrastructure and molecular phylogeny of *Hyalinocysta chapmani* (Microsporidia: *Thelohaniidae*), a parasite of *Culiseta melanura* (Diptera: *Culicidae*) and *Orthocyclops modestus* (Copepoda: *Cyclopidae*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 49: 350–364.
- Athanassopoulou, F., I.S. Pappas and K.Bitchava, 2009. An overview of the treatments for parasitic disease in Mediterranean aquaculture. In : Rogers C. (ed.), Basurco B. (ed.). *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*. Zaragoza CIHEAM. p. 65-83.
- Barber, I., A.J. Davies, J.E. Ironside, E. Forsgren and T. Amundsen, 2009. First record of a *Kabatana* sp. microsporidium infecting fish in the Atlantic Ocean. *Diseases of aquatic organisms*. 83: 145–152.
- Beauvais, B., C. Sarfati, S. Challier and F. Derouin, 1994. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 38: 2440-2448.
- Bigliardi, E., M. G. Riparbelli, M. G. Selmi, L. Bini, S. Libera-tori, V. Pallini, A. Bernuzzi, S. Gatti, M. Scaglia and L. Sacchi, 1999. Evidence of actin in the cytoskeleton of microsporidia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46: 410-415.
- Bristow, E.A., P.G. Griffiths, R.M. Andrews, M.A. Johnson and D.M. Turnbull, 2002. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Archives of Ophthalmology*. 120: 791-796.
- Canning, E.U. and J. Lom, 1986. *The Microsporidia of vertebrates*. Academic Press, New York and London, 289 pp.
- Canning, E.U., J. Lom and J.P. Nicholas, 1982. Genus *Glugea* Thelohan 1891 (Phylum *Microspora*): redescription of the type species *Glugea anomala* (Moniez, 1887) and recognition of its sporogonic development within

- sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes). *Protistologica*. 18: 193-210.
- Casal, G., E. Matos, L. Teles-Grilo and C. Azevedo, 2010. Ultrastructural and molecular characterization of a new microsporidium parasite from the Amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (*Rhamphichthyidae*). *The Journal of Parasitology*. 96:1155-1163.
- Castillon, C.P., J.F. De Jonckheere and B. Romestand, 2000. Ribosomal DNA sequences of *Glugea anomala*, *G. stephani*, *G. americanus* and *Spraguea lophii* (Microsporidia): phylogenetic reconstruction. *Aquatic organisms*. 40: 125-129.
- Costa, S.B., C. Duarte, A.I. Bourbon, A.C. Pinheiro, A.T. Serra, M.M. Martinsa, M.I.N. Januario, A.A. Vicente, I. Delgadillo, C. Duarte and M.L.B. Costa, 2012. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*. 110: 190–199.
- Chen, C., X. Zhang and Y. Lin, 2002. Researches on disinfect mechanism of ClO<sub>2</sub> and its application. *Journal Medicine English Project*. 23: 17–20.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and Polissiou, M.G., 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal Agriculture Food Chemiscal*. 48: 2576-2581.
- Didier, E.S., 1997. Effects of Albendazole, Fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. *Antimicrobial Agents Chemotherial*. 41: 1541–1546.
- Didier, E.S., J.A. Maddry, C.D. Kwong, L.C. Green, K.F. Snowden and J.A. Shaddock, 1998. Screening of compounds for antimicrosporidial activity in vitro. *Folia Parasitologica*. 45: 129-139.
- Didier, P.J., J.N. Phillips, D.J. Kuebler, M. Nasr, P.J. Brindley, M.E. Stovall, L.C. Bowers and E.S. Didier, 2006. Antimicrosporidial activities of Fumagillin, TNP-470, Ovalicin and Ovalicind in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 2146–2155.
- Dunn, A.M. and J.E. Smith, 2001. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection*. 3: 381–388.
- Dykova, I. and J. Lom, 1980. Tissue reaction to microsporidian infection in fish. *Journal Fish Diseases*. 3: 265-283.
- Dykova, I. and J. Lom, 2000. Histopathology of *Kabatana arthuri* (Microspora) infection in sutchi catfish, *Pangasius sutchi*. *Folia Parasitologica*. 47: 161–166.
- Dykova, I., J. Lom and S. Egusa, 1980. Tissue reaction to *Glugea plecoglossi* infection in its natural host, *Plecoglossus altivelis*. *Folia Parasitologica*. 27: 213–216.

- Elisa, B., R.P. Hedrick and L. Sacchi, 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection*. 3: 373–379.
- Fedorko, D.P., N.A. Nelson and C.P. Cartwright, 1995. Identification of Microsporidia in Stool Specimens by using PCR and Restriction Endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1739-1741.
- Fenoy, S., C. Rueda, M. Higes, R. Martin-Hernandez and C. del Aguila, 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and environmental microbiology*. 75: 6886–6889.
- Ferguson, J.A., V. Watral, A.R. Schwindt and M.L. Kent, 2007. Spores of two fish microsporidia (*Pseudoloma neurophilia* and *Glugea anomala*) are highly resistant to Chlorine. *Diseases of Aquatic Organisms*. 76: 205–214.
- Figueras, A., B. Novoa, M. Santarem, E. Martinez, J.M. Alvarez, A.E. Toranzo and I. Dyková, 1992. *Tetramicra brevifilum*, a potential threat to farmed turbot *Cophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 14: 127–135.
- Foschino, R., I. Nervegen, A. Motta and A. Galli, 1998. Bactericidal activity of Chlorine dioxide against *Escherichia coli* in water and on hard surface. *Journal Food Protection*. 61: 668–672.
- Frankenhuyzen, K.V., P. Ebling, B. McCron, T. Ladd, D. Gauthier and C. Vossbrinck, 2004. Occurrence of *Cystosporogenes* sp. (Protozoa, Microsporidia) in a multi-species insect production facility and its elimination from a colony of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *J.Inver.Path.* 87: 16–28.
- Franssen, F.F.J., J.T. Lumei and F. Vanknapen, 1995. Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculitoto* several drugs in vitro. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 39: 1265–1268.
- Franzen, C., 2005. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitologica*. 52: 1-13.
- Freeman, M.A., H. Yokoyama, A. Osada, T. Yoshida, A. Yamanobe, K. Ogawa, 2011. *Spraguea* (Microsporida: *Spraguidae*) infections in the nervous system of the Japanese anglerfish, *Lophius litulon* (Jordan), with comments on transmission routes and host pathology. *Journal Fish Disease*. 34: 445-452.
- Freeman, M., J.M Kasper and A. Kristmundsson, 2013. *Nucleospora cyclopteri* n. sp., an intranuclear microsporidian infecting wild lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Icelandic waters. *Parasites and Vectors*. 6: 49-57.
- Freeman, M.A., W.W. Chong and K.H. Loh, 2015. Microsporidians infecting eel gobies (Gobiidae: *Amblyopinae*) from Malaysia, with a description of *Microgemma tilanpasiri* n. sp. from the burrowing goby *Trypauchen vagina*. *Fish Pathology*. 35: 112-120.

- Frixione, E., L. Ruiz, M. Santillan, L.V. de Vargas, J.M. Tejero and A.H. Undeen, 1992. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian. Spores. Cell Motility and the Cytoskeleton. 22: 38–50.
- Garcia, L.S., 2002. Laboratory Identification of the *Microsporidia*. Journal of clinical microbiology. 40: 1892–1901.
- Ghosh, K. and L.M. Weiss, 2009. Molecular diagnostic tests for Microsporidia. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.
- Gouda, H.A., 2013. A disseminated microsporidian pathogen in a new host. Journal of Microbiology Research. 3: 176-184.
- Graaf, D.C., G. Masschelein, F. Vandergeynst, H.F.D. Brabander and F.J. Jacobs, 1993. In vitro germination of *Nosema apis* (Microsporidia: *Nosematidae*) spores and its effect on their  $\alpha$ -trehalose/D-glucose ratio. Journal of Invertebrate Pathology. 62: 220-225.
- Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, E. Christaki, N.A. Botsoglou and A.B. Spais, 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. 2003. Archives of Animal Nutrition. 57: 99-106.
- Gillett, A.K., R. Ploeg, P.J. O'Donoghue, P.A. Chapman, R.I. Webb and M. Flint, 2016. Ultrastructural and molecular characterisation of an *Heterosporis*-Like microsporidian in Australian sea snakes (*Hydrophiinae*). PLoS ONE. 11: 15-24.
- Higes, M., R. Martin, A. Meana, 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. Journal of Invertebrate Pathology. 92: 93-95.
- Huang, W.F., L.F. Solter, P.M. Yau and B.S. Imai, 2013. *Nosema ceranae* escapes Fumagillin control in honey bees. PLoS Pathogen. 9: 1-9.
- Iglesias, R., A. Parama, M.F. Alvarez, J. Leiro, M.L. Sanmartin. 2002. Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Glugea anomala*. Diseases of Aquatic Organisms. 49: 191–197.
- Jithendran, K.P., K.K. Vijayan and M. Kailasam, 2011. Microsporidian (*Glugea* sp.) infection in the greasy grouper *Epinephelus tauvina* (Forsskal, 1775). Indian Journal Fish. 58:125-127.
- Joh, S.J., Y.K. Kwon, M.C. Kim, M.J. Kim, H.M. Kwon, J.W. Park, J.H. Kwon and J.H. Kim, 2007. *Heterosporis anguillarum* infections in farm cultured eels (*Anguilla japonica*) in Korea. Journal of Veterinary Science. 8: 147-149.
- John, D.E., C.N. Haas, N. Nwachuku and C.P. Gerba, 2005. Chlorine and ozone disinfection of *Encephalitozoon intestinalis* spores. Water Resistant. 39: 2369-2375.

- Johnson, C.H., M.M. Marshall, L.A. DeMaria, J.M. Moffet and D.G. Korich, 2003. Chlorine inactivation of spores of *Encephalitozoon* spp. Applied and Environmental Microbiology. 69: 1325–1326.
- Jordan, C.N., J.A. DiCristina and D.S. Lindsay, 2006. Activity of bleach, ethanol and two commercial disinfectants against spores of *Encephalitozoon cuniculi*. Veterinary Parasitology. 136: 343–346.
- Kappagoda, S.M.D., S.M.U. Singh, and B.G. Blackburn, 2011. Antiparasitic Therapy. Mayo Clinic Proceedings. 86: 561-583.
- Kim, J.H., K. Ogawa and H. Wakabayashi, 1999. Lectin reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of Ayu *Plecoglossus altivelis*. Diseases of Aquatic Organisms. 39:59-63.
- Kou, G.H., C.H. Wang, H.W. Hung, Y.S. Jang, C.M. Chou and C.F. Lo, 1995. A cell line (EP-1 cell line) derived from “Beko disease” affected Japanese eel elver (*Anguilla japonica*) persistently infected with *Pleistophora anguillarum*. Aquaculture. 132: 161–173.
- Kyei-Poku, G., D. Gauthier, R. Schwarz and K.V. Frankenhuyzen, 2011. Morphology, molecular characteristics and prevalence of a *Cystosporogenes* species (*Microsporidia*) isolated from *Agrilus anxius* (Coleoptera: Buprestidae). Journal of Invertebrate Pathology. 107: 1–10.
- Lallo, M.A., L.F.V. Costa and J.M. Castro, 2013. Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed fish. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 57: 3067–3071.
- Lallo, M.A., L.F.V. Costa, A.M. Alvares-Saraiva, P.R.D.A. Rocha, D.D. Spadacci-Morena, F.T. Camargo and I.B. Suffredini, 2015. Culture and propagation of microsporidia of veterinary interest culture of microsporidia. The Journal of Veterinary Medical Science.
- LeChevallier, M.W. and A. Kwok-Keung, 2004. World Health Organization. Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water. ISBN: 1 84339 069 8. Published by IWA Publishing, London, UK.
- Leiro, J., A. Parama, M. Ortega, M.T. Santamaria and M.L. Sanmartin, 1999. Redescription of *Glugea caulleryi*, a microsporidia parasite of the greater sand-eel, *Hyperoplus lanceolatus* (Le Sauvage), (Teleostei: Ammodytidae), as *Microgemma caulleryi* comb. nov. Journal of Fish Diseases. 22: 101-110.
- Leiro, J., E. Cano, F.M. Ubeira, F. Orallo and M.L. Sanmartin, 2004. In vitro effects of resveratrol on the viability and infectivity of the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48: 2497–2501.

- Li, X. and R. Fayer, 2006. Infectivity of microsporidian spores exposed to temperature extremes and chemical disinfectants. *Journal Eukaryotic Microbiology*. 53: 77-79.
- Liu, D., 2011. Molecular detection of human fungal pathogens. CRC Press publis.
- Lom J. and I. Dykova, 2002. Ultrastructure of *Nucleospora secunda* n. sp. (Microsporidia), parasite of enterocytes of *Nothobranchius rubripinnis*. *European Journal of Protistology*. 38: 19- 27.
- Lom, J. and I. Dyková, 2000. Histopathology of *Kabatana arthuri* (Microspora) infection insutchi catfish, *Pangasius sutchi*. *Folia Parasitologica*. 47: 161-166.
- Lom, J. and Dykova, I. 1992. Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, p. 125-157.
- Lom, J. and F. Nilsen, 2003. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *International Journal for Parasitology*. 33: 107–127.
- Lom, J. and I. Dykova, 2005. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitologica*. 52: 69–81.
- Lom, J. and M. Pekkarinen, 1999. Ultrastructural observations on *Loma acerinae* (Jirovec, 1930) comb. nov. (phylum Microsporidia). *Acta Protozoologica*. 38: 61-74.
- Lom, J., F. Nilsen and S. Urawa, 2001. Redescription of *Microsporidium takedai* (Awakura, 1974) as *Kabatana takedai* (Awakura, 1974) comb. n. *Diseases of aquatic organisms*. 44: 223–230.
- Lom, J., I. Dykova and K. Tonguthai, 1999. *Kabataia agen.* n., a new genus proposed for *Microsporidium* spp. infecting trunk muscles of fishes. *Diseases of aquatic organisms*. 38: 39–46
- Lom, J., I. Dykova and K. Tonguthai, 2000. *Kabataia* gen. n., a new genus proposed for *Microsporidium* spp. infecting trunk muscles of fishes. *Diseases of aquatic organisms*. 38: 39-46.
- Lom, J., Noga, E. J. and Dykova, I. 1995. Occurrence of a microsporean with characteristics of *Glugea anomala* in ornamental fish of the family Cyprinodontidae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21: 239-242.
- Lores, B., M.J. Rosales, C. Mascaro and A. Osuna, 2003. In vitro culture of *Glugea* sp. *Veterinary Parasitology*. 112: 185–196.
- Lu, K., X. Xu, F. Liao, G. Zhong, X. Huang, R. Yao and W. Lu, 1992. Studies on effect of a new type disinfectant “Kebaoling” on silkworm pathogenic microorganism and production test. *Guangdong Sericult*. 1: 24–32.
- Maistrello, L., M. Lodesani, C. Costa, F. Leonardi, G. Marani, M. Caldon, F. Mutinelli and A. Granato, 2008. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease. *Apidologie*. 39: 436–445.

- Mansour, L., G. Prensier, S.B. Jemaa, O.K.B. Hassine, G. Metenier, P.V. Christian and E. Cornillot, 2005. Description of a xenoma inducing microsporidian, *Microgemma tincae* n. sp., parasite of the teleost fish *Symphodus tinca* from Tunisian coasts. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65: 217–226.
- Margolis, L.G.W., J.C. Holmes, A.M. Kuris and G.A. Schad. 1982. The use of ecological terms in parasitology (Report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology* 68(1):131-133 pp.
- Matos, E. and C. Azevedo, 2004. Ultrastructural description of *Microsporidium brevirostris* sp. n., parasite of the Teleostean *Brachyhypopomus brevirostris* (*Hypopomidae*) from the Amazon River. *Acta Protozoologica*. 43: 261-267.
- Matthews, J.L., A.M.V. Brown, K. Larison, J.K. Bishop-Stewart and M.L. Kent, 2001. *Pseudoloma neurophilia*, n. g., n. sp., a new microsporidium from the central nervous system of the zebrafish. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 48: 227–233.
- Matthews, R.A. and B.F. Matthews, 1980. Cell and tissue reaction of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) to *Tetramicra brevifilum* gen., sp. n. (Microspora). *Journal of Fish Diseases*. 3: 495–515.
- Maze, I.S., G.A. Wright and J.A. Mustard, 2006. Acute ethanol ingestion produces dose-dependent effects on motor behavior in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 52: 1243-1253.
- McGourty, K.R., A.P. Kinziger., G.L. Hendrickson, G.H. Goldsmith, G. Casal and C. Azevedo. 2006. A new microsporidian infecting the musculature of the endangered tidewater goby (*Gobiidae*). *American Society of parasitologists*. 93: 655 – 660.
- Mejholm, O. and P. Dalgaard, 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* liquid media and fish products. *Letter Applied Microbial*. 27: 34-37.
- Mixson, T.A., C.I. Abramson and J. Bozic, 2010. The behavior and social communication of honey bees (*Apis mellifera*) under the influence of Ethanol. *Psychology Reports*. 106: 701-717.
- Mladineo, I. and J. Lovy, 2011. A new xenoma-forming microsporidium infecting intestinal tract of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Acta Parasitologica*. 56: 339–347.
- Mogoa, E. (2010) *Acanthamoeba castellanii*: cellular changes induced by chlorination. *Experimental Parasitology*, 126, 97–102.
- Monagang, S.R., M.L. Kent, V.G. Watral, R.J. Kaufman, L.E.J. Lee and N.C. Bols, 2009. Animal cell cultures in microsporidial research: their general roles and their specific use for fish microsporidia. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 15: 210-220.

- Monaghan, S.R., R.L. Rumney, N.T.K. Vo, N.C. Bols and L.E.J. Lee, 2010. In vitro growth of microsporidia *Anncaliia algerae* in cell lines from warm water fish. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 16: 112-120.
- Monaghan, S.R.M., 2011. Use of Fish Cell Cultures for the Study and Cultivation of *Microsporidia*. A thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Biology. Waterloo, Ontario, Canada.
- Morrison, C.M. and V. Sprague, 1981. Electron microscopical study of a new genus and new species of microsporidia in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases*. 4: 15–32.
- Morsy, K., F. Abdel-Ghaffar, H. Mehlhorn, A.R. Bashtar and R. Abdel-Gaber, 2012. Ultrastructure and molecular phylogenetics of a new isolate of *Pleistophora pagri* sp. nov. (Microsporidia, *Pleistophoridae*) from *Pagrus pagrus* in Egypt. *Parasitology Research*. 111:1587-1597.
- Nayaka, A.R.N., 2016. Effect of new microsporidian infection on the relevant economic characters of silkworm and its management. Ph.D. Thesis: Studies on the newly isolated microsporidian species (NIK-5hm) infecting silkworm.
- Nepszy, S.J. and A.O. Dechtiar, 1972. Occurrence of *Glugea hertwigi* in Lake Erie rainbow smelt (*Osmerus mordax*) and associated mortality of adult smelt. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 29: 1639–1641.
- Noga, E.J., 2010. Fish disease, diagnosis and treatment. Blackwell Publishing.
- Ortega, Y.R., M.P. Torres, S.V. Exel, L. Moss and V. Cama, 2007. Efficacy of a sanitizer and disinfectants to inactivate *Encephalitozoon intestinalis* spores. *Journal Food Protection*. 70: 681-4.
- Ortega, Y.R., M.Amy, T.P.Maria and C. Vitaliano, 2008. Efficacy of gaseous Chlorine dioxide as a sanitizer against *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* and *Encephalitozoon intestinalis* on produce. *Journal of Food Protection*. 12: 2384-2595.
- Penley, C.A., S.W. Willis, and S.G. Sickler, 1989. Comparative antimicrobial efficacy of soft and rigid gas permeable contact lens solutions against *Acanthamoeba*. *The CLAO Journal*. 15: 257-260.
- Peng, Y., T.F. Lee-Pullen, K. Heel, A.H. Millar, B. Baer, 2013. Quantifying spore viability of the honey bee pathogen *Nosema apis* using flow cytometry. *Cytometry Part A*. 85: 454-462.
- Peyghan, R., L. Nabavi, K. Jamshidi and S. Akbari, 2009. Microsporidian infection in lizardfish, *Saurida undosquamis* of Persian Gulf. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. 10: 180-191.
- Pomport-Castillon, C., J.F. De Jonckheere and B. Romestand, 2000. Ribosomal DNA sequences of *Glugea anomala*, *G. stephani*, *G. americanus* and *Spraguea lophii* (Microsporidia): phylogenetic reconstruction. *Dis Aquat Org*. 40: 125–129.



- Prasertsri, S., C. Limsuwan and N. Chuchird, 2009. The effects of Microsporidian (*Thelohania*) infection on the growth and histopathological changes in pond-reared pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart journal*. 43: 680 – 688.
- Ptaszynska, A.A., G. Borsuk, W. Mułenko and K. Olszewski, 2013. Impact of ethanol on *Nosema* spp. infected bees. *Med. Weter*. 69 (12): 736-740.
- Ralphs, J.R. and R.A Matthews, 1986. Hepatic microsporidiosis due to *Microgemma hepaticus* n.g., n.sp. in juvenile grey mullet *Chelon labrosus*. *Journal of Fish Diseases*. 9: 225-242.
- Redondo, M.J., O. Palenzuela and P. Alvarez-Pellitero, 2003. *In vitro* studies on viability and proliferation of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases Of Aquatic Organisms*. 55: 133–144.
- Ridoux, O. and M. Drancourt, 1998. In vitro susceptibilities of the microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Encephalitozoon intestinalis* to Albendazole and its sulfoxide and sulfone metabolites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapeutics*. 42: 3301–3303.
- Robert, R.J. 1989. *Fish pathology*. Intitute of Aquaculture, University of Stirling. Bailliere Tindall, London. 318pp.
- Rodriguez-Tovar, L.E., G.M. Wright, D.W. Wadowska, D.J. Speare and J.F. Markham, 2002. Ultrastructural study of the early development and localization of *Loma salmonae* in the gills of experimentally infected rainbow trout. *Journal of Parasitology*. 88: 244–253.
- Rodriguez-Tovar, L.E., G.M. Wright, D.W. Wadowska, D.J. Speare and J.F. Markham, 2004. Ultrastructural study of the late stages of *Loma salmonae* development in the gills of experimentally infected rainbow trout. *Journal of Parasitology*. 89: 464–474.
- Rodriquez-Tovar, 2004. predictive modelling of post-onset xenomagrowth during microsporidial gill disease (*Loma salmonae*) of salmonids Weiss, louis M and Vossbrinck, Charles R. 1998. *Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects*.
- Rooijen, V.N. and R.V. Nieuwmegen, 1978. Fluorochrome staining of multilamellar liposomes. *Stain Technol*. 53(6): 307-310.
- Sanchez, J.G., D.J. Speare, R.J.F. Markham, G.M. Wright and F.S.B. Kibenge, 2001. Localization of the initial developmental stages of *Loma salmonae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Pathology*. 38: 540–546.
- Santillana-Hayat, M., C. Sarfati, S. Fournier, F. Chau, R. Porcher, J.M. Molina and F. Derouin, 2002. Effects of chemical and physical agents on viability and infectivity of *Encephalitozoon intestinalis* determined by cell culture

- and flow cytometry. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 46: 2049–2051.
- Santoro, G.F., M.G. Cardoso, L.G.L. Guimaraes, A.P.S.P. Salgado, R.F.S.M. Barreto and M.J. Soares, 2007. Effect of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: *Kinetoplastida*) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*. 100: 783-790.
- Schmahl, G, A. Toukhy and F.A. Ghaffar, 1990. Transmission electron microscopic studies on the effects of toltrazuril on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (*Microsporidia*) infecting the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Parasitology Research*. 76: 700-706.
- Schmahl, G. and J. Benini, 1998. Treatment of fish parasites. II. Effects of different benzimidazole derivatives (Albendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (*Microsporidia*) : ultrastructural aspects and efficacy studies. *Journal of Parasitology Research*. 84: 41–49.
- Schmahl, G. and J. Senaud, 1996. Effects of an asymmetric triazine derivative, HOE 092 V, on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (*Microsporidia*) parasitic in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Parasitol Resistance*. 82: 225-229.
- Seeley, K.R, P.D. Gillespie and B.A. Weeks. 1990. A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. *Marine Environmental Research*; 30:123-8.
- Selzer, P.M., 2009. Antiparasitic and Antibacterial Drug Discovery. From Molecular Targets to Drug Candidates. British Library Cataloguing Publication.
- Shaw, R.W. and M.L. Kent, 1999. Fish *Microsporidia*. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*, Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. pp. 418-446.
- Shaw, R.W., M.L. Kent and M.L. Adamson, 2001. Phagocytosis of *Loma salmonae* (*Microsporidia*) spores in Atlantic salmon (*Salmo salar*), a resistant host, and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), a susceptible host. *Fish Shellfish Immunol*. 11: 91–100.
- Sheehy, D.J. and M.P. Sissenwine and S.B. Saila, 1974. Ocean pout parasites. *Marine Fisheries Review*. 36: 29–33.
- Silvany, R.E., J.M. Dougherty, J.P. McCulley, T.S. Wood, R.W. Bowman, and M.B. Moore, 1990. The effect of currently available contact lens disinfection systems on *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga*. *Ophthalmology*. 97: 286-290.
- Silveira, H. and E.U. Canning, 1995. In vitro cultivation of the human microsporidium *Vittaforma corneae*: development and effect of Albendazole. *Folia parasitologica*. 42: 241-250.

- Sivropoulou, A., E. Papanicolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis, 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Oreganum* essential oils. *Journal Agriculture Food Chemiscal.* 44: 1202-1205.
- Sokolowski, M.B.C., C.I. Abramson and D.P.A. Craig, 2012. Ethanol Self administration in Free-Flying Honeybees (*Apis mellifera* L.) in an Operant Conditioning Protocol. *Ethanolism: Clinical and Experimental Research.* 36: 1568-1577.
- Speare, D.J., F. Athanassopoulou, J. Daley and J.G. Sanchez, 1999. A Preliminary Investigation of Alternatives to Fumagillin for the Treatment of *Loma salmonae* Infection in Rainbow Trout. *Journal of Comparative Pathology.* 121: 241–248.
- Speare, D.J., G. Ritter and H. Schmidt, 1998. Quinine hydrochloride treatment delays xenoma formation and dissolution in rainbow trout challenged with *Loma salmonae*. *Journal of Comparative Pathology.* 119: 459–465.
- Sprague, V. and J. Etvavra, 1977. Systematics of the Microsporidia. Plenum Press New York and London. 16: 39-45.
- Sprague, V., J.J. Becnel and E.I. Hazard, 1992. Taxonomy of phylum *Microspora*. *Crit. Rev. Microbiology.* 18: 285–395.
- Stoskopf, M.K., 1993. Fish medicine. W. B. Saunders Company. p. 832-839.
- Taggart, J. B., R. A. Hynes., P. A. Podohl and A. Ferguson, 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolate from salmonid fishes. *Journal of fish Biology* 40: 963-965.
- Tonguthai, K., S. Chinabut, T. Somsiri, P. ChanratChakoo and S. Kanchanakhan. 1999. Diagnostic Procedures for Finish Diseases. Aquatic Animal (Health Research institute (AAHRI). Department of fisheries kasetsart University campus Bangkok, Thailand.
- Tourtip, S., S. Wongtripop, G.D. Stentiford, K.S. Bateman, S. Sriurairatana, J. Chavadej, K. Sritunyalucksana and B. Withyachumnarnkul, 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: *Enterocytozoonidae*). Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology.* 102: 21–29.
- Thien, P.C., Dalsgaard, A., Olsen, A., Murrell, K. D., 2007. Prevalence of fishborne zoonotic parasites in important cultured fish species in the Mekong Delta, Vietnam. *Parasitology Research.* 101:1277-1284.
- Thomas, V. 2013. Sensitivity and Resistance of Protozoa to Microbicides. In: Fraise, A.P. (ed), J.Y. Maillard and S.A. Sattar. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. A John Wiley and Sons Publication.
- Thu, N.D., Dalsgaard, A., Ly Thi Thanh Loan, Murrell, K. D. 2007. Survey for zoonotic liver and intestinal trematode metacercariae in cultured and wild fish in An Giang Province, Vietnam. *The Korean journal of parasitology,* 45(1): 45–54.

- Thuy, D.T., Kania, P., Buchmann, K. 2010. Infection status of zoonotic trematode metacercariae in Sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam: Associations with season, management and host age. *Aquaculture*. 302(1-2): 19–25.
- Vagelli, A., A. Paramá, M.L. Sanmartín and J. Leiro, 2005. *Glugea vincentiae* n. sp. (*Microsporidia: Glugeidae*) infecting the Australian marine fish *Vincentia conspersa* (Teleostei: Apogonidae). *The Journal of Parasitology*. 91(1):152-157.
- Videira, M., G. Casal, S. Rocha, E. Gonçalves, C. Azevedo, M. Velasco and E.R. Matos, 2015. *Potasporea aequidens* n. sp. (*Microsporidia, Tetramicridae*), a parasite infecting the freshwater fish *Aequidens plagiозonatus* (Teleostei, *Cichlidae*) from Brazil. *Parasitology Research*. 114: 2435-2442.
- Waller, T., 1980. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Laboratory animal science*. 13:277–285.
- Weiss, L.M. and J.J. Becnel, 2014. *Microsporidia Pathogens of Opportunity*. Wiley and Sons, Inc.
- Weber, R., R.T. Bryan, D.A. Schwartz and R.L. Owen, 1994. Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Research*. 7: 426-61.
- West, K., R. Miles, M.L. Kent and J.K. Frazer, 2014. Unusual fluorescent granulomas and myonecrosis in *Danio rerio* infected by the microsporidian pathogen *Pseudoloma neurophilia*. *Zebrafish*. 11: 283-290.
- Wolk, D.M., C.H. Johnson, E.W. Rice, M.M. Marshall, K.F. Grahn, C.B. Plummer and C.R. Sterling, 2000. A spore counting method and cell culture model for Chlorine disinfection studies of *Encephalitozoon syn. septata intestinalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1266–1273.
- Wongtavatchai, J., P.A. Conrad and R.P. Hedrick, 1995. In vitro characteristics of the microsporidian: *Enterocytozoon salmonis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2: 401–405.
- Woo, P.T.K., 2006. *Fish diseases and disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. University of Guelph Canada. pp 205-230.
- Yan, P., T. F. Lee-Pullen, K. Heel, A., K. Heel, A. H. Millar, B. Baer, 2013. Quantifying spore viability of the Honey Bee pathogen *Nosema apis* using flow cytometry. *Centre for Intergrative Bee Research. The University of Western Australia*. pp 454-462.
- Zhengyong, W., W. Zhengyong, L. Fupin, L. Jianrong, L. Wenchu, Z. Yangsheng, T. Peichan and H. Ziran, 2010. Inactivation and mechanisms of Chlorine dioxide on *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 134–139.



## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1: Kết quả định danh dòng 1F bằng phương pháp giải trình tự

#### A: Kết quả giải trình tự dòng 1F (836 nucleotide)

```
CACTAGATGTTTTCGGTCATCCTACTTCTTCTCTATCGGTCTCTCTTTAGTA
TTTAGTCTTAGATGAACACTGCCACCTCTTCACCGTGCATTACCGAGCAC
AGCTACTCATAAACACGAACAAATGATTAAATACGGGGCTATCACCCCTCT
ATGGCACACCTTCTCAGATGTTTCTAAAATCATTTTATTCTTGACATCTTC
TACTAAAAAAGTAGAATTACACTATTGGACTCTTCCCTGTTCACTCGCCG
CTACTATGGGAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTTCCTTTATTCATATGCTTA
ATTCCGAGGAGTAATCATGTTCAAAGAACACTATTCAGGCACACACATTC
ATCGTTTTGACTTATGTGCATTTTCGCAAATAATGCGCCCTTCATCGTCAA
GAGAACCAAACGATCCCTTGTGTGTGGTATCAATTATTATCATTAATTC
TTTTTTATCTTTTTTGGTTTTTTTTCTGTTTGATCCAGCTACAGGTTCTCCTA
CAGCTGCCTTGTTACGACTTGTATCAGATCTAGAACCCTGCACTCACTCG
CTTTCACCTGTTTCGCACCTGGTTCCATCTTCGATAACGACGGGCGGTGTGT
ACAAAGAACAGGGACACATTCATCGCTTCTTATTGAGATAACGATTACTA
GCAATTCCTCGTTCCTGTGCACATTACAGTGCTCATTCCCTCTTGATCACA
TTTATTTCTTTTTTGTCTTTGTTGTGACCACTGTAGTGCGCGTGCAGCCCA
TACCTCCTAAGGGCATCACTGACCTGTTCTTGCCCCTTCCTTCCGGCGCTT
CTCGCTCCTGTCGATATCTAAAAT
```

#### B: Tỷ lệ tương đồng của dòng 1F với dòng *Kabatana sp.* FJ843105.1

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Kabatana sp. GC-2009a small subunit ribosomal RNA gene</a>	767	767	97%	0.0	84%	<a href="#">FJ843105.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Potaspora aequidens small subunit ribosomal RNA gene_p</a>	723	723	95%	0.0	84%	<a href="#">KP404613.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Potaspora morhaphis small subunit ribosomal RNA gene ar</a>	717	717	95%	0.0	83%	<a href="#">EU534408.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Spraguea sp. Sdu-2008 genes for small subunit ribosomal f</a>	643	643	98%	1e-180	82%	<a href="#">AB623034.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Microqemma sp. WWC-2015 18S ribosomal RNA gene and</a>	599	599	98%	3e-167	81%	<a href="#">KJ865404.1</a>

#### C: Kết quả so sánh trình tự của dòng 1F với dòng *Kabatana sp.* FJ843105.1

```
Query 12      TTCGGTCATCCTACTTCTTCTCTATCGGTCTCTCTTTAGTATTTAGTCTTAGATGAACAC 71
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1913    TTCGGTCGTCCTACTTATCTCTATCGGTCTCTCGCT-GTATTTAGTCTTAGATGAACAT 1855

Query 72      TGCCACCTCTTCACCGTGCATTACCGAGCACAGCTACTCATA-AACA-CGA-AC-A-AAT 126
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1854    CACCACCTCTTCACCGTGCATTACCAAGCACAACACTACTCATATCGCATCAATACAAGAAC 1795

Query 127     GA-TTAA-ATACGGGGCTATCACCCCTCTATGGCACACCTTCTCAGATGTTTCTA--A--A 180
              |  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1794    AACATAATATATGGGACTATCACCCCTCTATAGTATATCTTTCCAGATATTTCTACTATGA 1735

Query 181     --A-TCATTT-T-AT--T-C-TTGACATCTTCTACTAAAAAA-GT-AGAATTACACTATT 229
```



AGGAGAACCTGTATCTGGGTCTAACAGAAAAAACCCAAAAAGATAAAA  
 AAAAATTTTTTGATAATAATTGTTACCCCCCCCAGGGGTCGTTTGGGTTT  
 CTTGACGATGAAAGGGGCATTATTTTTTGAAAAGCACATAAAATAAAAA  
 AAGAAAGTGGGTGGCCGAAAAATGTTCTTTTAACATGATTACTCCTCCGA  
 ATTTTGCATATGAATAAAGGAAGGAAAAAAACCCCCAGGGGTCCCCTA  
 ATAGCGGCGAGTGGACAGGGGAGAGTCCCATAGTGTAATTTTTCTTTTTT  
 TTAGAAGATGTCCAGAATAAAATGATTTTTTAAATACCTGAGAAAGTGTG  
 TCCTATAGGGTGATAGTCCCCATTTAACATTTGTTTCGTGTTTATGAGAA  
 GCTGTGCTCCG

**B: Tỷ lệ tương đồng của dòng 11F với dòng *Kabatana sp.* EU682928.1**

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Kabatana sp. JI-2008 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	584	584	50%	9e-163	91%	<a href="#">EU682928.1</a>
<a href="#">Kabatana takedai 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	584	584	51%	9e-163	90%	<a href="#">AF356222.1</a>
<a href="#">Kabatana sp. JS-2012 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	575	575	51%	6e-160	90%	<a href="#">JQ062989.1</a>
<a href="#">Spraguea lophii small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	542	542	53%	6e-150	88%	<a href="#">AF056013.1</a>
<a href="#">Glugea americanus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	531	531	53%	1e-146	88%	<a href="#">AF056014.1</a>

**C: Kết quả so sánh trình tự của dòng 11F với dòng *Kabatana sp.* EU682928.1**

```

Query   4      GTGAGCGTAGTACGCGATAGGTCAGAGAGTGGTGCATGGCCGTTATCGACTAGTGGGGTG
63
      |||
Sbjct  913    GTGAGCGTAGTACGCGATAGGTCAAAGAGTGGTGCATGGCCGTTATCGACTAGTGGGGTG
972

Query   64      ACCTTTGGGTTAAGTCCGCGAAGTAGTGAGATCCCTAGGATTCTAAAttttttAAGATT
123
      |||
Sbjct  973    ACCTTTGGGTTAAGTCCGCAAAGTAGTGAGATCCCTAGGATTCTGCATGCAC--AAGTGT
1030

Query   124     TTT-ATATCGACAGGAGCGAGAAACGCCGAAAGAAAGGGCAAGAACAGGGCAGTGATGC
182
      |||
Sbjct  1031   GCAGATATCGACAGGAGCGAGAAGCGCCGGAAGGAAGGGCAAGAACAGGTCAAGTATGC
1090

Query   183     CCTTTGAGGG-ATGGGCTGCACGCGCACTACAGTGGGCACAACaaaaacaaaaaaaaaa
241
      |||
Sbjct  1091   CCTTA-GATGGTATGGGCTGCACGCGCACTACAGTGGTCACAACAAAAACAAGACAGAAA
1149

Query   242     TAAATGTGATCAAAAGGAATGAGCACTGTAATGTGCACAGGAACGAGGAATTGCTAGTA
301
      |||
Sbjct  1150   TAAATGTGATCGAGAGGAATGAGCACTGTAATGTGCACAGGAACGAGGAATTGCTAGTA
1209

Query   302     ATCGTTATCTCACTAAAAACGATGAAAGTGTCCCTGTTCTTTGTACACACCGCCCGTGC
361
  
```







```

Query 654 TAACGATTACTAACAATTCCTCGTTCCTGTGCACATTACAGTGCTCATTCCCTCTTGATC
713
      |||
Sbjct 1272 CAACGATTACTAGCAATTCCTCGTTCCTGTGCACATTACAGTGCTCATTCCCTCTCGATT
1213

Query 714 ACATTTATTTCTTTTTTGTCTTTGTTGTGACCCTGTAGTGCGCGTGCAGCCCATACCTC
773
      |||
Sbjct 1212 ACATTTACTTCTATAAAAATATCTATGTAAACCCTGTAGTGCGCGTGCAGCCCATACCAT
1153

Query 774 CTAAGGGCATCACTGACCTGTTCTTGCCCTTCCTTCCGGCGCTTCTCGCTCCTGTGCGAT
833
      |||
Sbjct 1152 CTAAGGGCATCACTGACCTGTTCTTGCCCTTCCTTCCGGCGCTTCTCGCTCCTGTGCGAT
1093

Query 834 AT 835
      ||
Sbjct 1092 AT 1091

```

**Phụ lục 4: Kết quả định danh dòng 3R bằng phương pháp giải trình tự**

**A: Kết quả giải trình tự dòng 3R (879 nucleotide)**

---

```

ATTTCACTAGATGTTTTCGGTCATCCTACTTCTTCTCTATCGGTCTCTCTTT
AGTATTTAGTCTTAGATGAACACTGCCACCTCTTCACCGTGCATTACCGA
GCACAGCTACTCATAAACACGAACAAATGATTAATACGGGACTATCAC
CCTCTATGGCACACCTTCTCAGATGTTTCTAAAATCATTTTATTCTTGACA
TCTTCTACTAAAAAAGTAGAATTACACTATTGGACTCTTCCCTGTTCACTC
GCCGCTACTATGGGAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTTCTTTATTCATAT
GCTTAATTCCGAGGAGTAATCATGTTCAAAGAACAATTCAGGCACACA
CATTCATCGTTTTGACTTATGTGCATTCGCAAATAATGCGCCCTTCATC
GTCAAGAGAACCAAACGATCCCTTGTGTGTGGTATCAATTATTATCATTA
AATTCTTTTTATCTTTTTTGGTTTTTTTCTGTTTGATCCAGCTACAGGTTT
TCCTACAGCTGCCTTGTTACGACTTGTATCAGATCTAGAACCCTGCACTC
ACTCGCTTTCACTTGTTCGCACCTGGTTCCATCTTCGATAACGACGGGCG
GTGGGGACAAAGAACAGGGACACATTCATCGCTTCTTATTGAGATAACG
ATTACTAGCAATTCCTCGTTCCTGTGCACATTACAGTGCTCATTCCCTCTT
GATCACATTTATTTCTTTTTTGTCTTTGTTGTGACCACTGTAGTGGGCGTG
CAGCCCATACCTCCTAAGGGCATCACTGACCTGTTCTTGCCCTTCCTTCC
GGCGCTTCTCGCTCCTGTGCGATATCTAAAATCTTAAAAAAATTTAGAATC
CTAGGGATCTCACTACTTCG

```

---





AATTCCTCGTTCCTGTGCACATTACAGTGCTCATTCCCTCTTGATCACATTT  
 ATTTCTTTTTGTCTTTGTTGTGACCACTGTAGTGCGCGTGCAGCCCATAACC  
 TCCTAAAGGCATCACTGACCTGTTCTTGCCCCTTCCTCCGGCGCTTCTCG  
 CTCCTGTCGATATCTAAAATCTTAAAAAATTTA

**B: Tỷ lệ tương đồng của dòng 7R với dòng *Kabatana* sp. JQ062989.1**

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Kabatana sp. JS-2012 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc</a>	547	547	38%	1e-151	97%	<a href="#">JQ062989.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Microsporidium sp. PBT small subunit ribosomal RNA gene, partial seque</a>	514	514	95%	1e-141	79%	<a href="#">GU124636.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Microsporidia sp. GC-2010 small subunit ribosomal RNA gene, partial seq</a>	490	490	40%	2e-134	92%	<a href="#">GQ868443.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Spraguea sp. MB2010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	475	475	38%	6e-130	93%	<a href="#">JQ820238.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Spraguea sp. MB2011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	431	431	35%	1e-116	92%	<a href="#">JQ820239.1</a>

**C: Kết quả so sánh trình tự của dòng 7R với dòng *Kabatana* sp. JQ062989.1**

```

Query  511   TACAGCTG-CCTTGTACGACTTGTATCAAATCTAGAACCCCTGCACTCACTCGCTTTCAC
569
      |||
Sbjct 1305   TACAGCTGCCCTTGTACGACTTGTATCAGATCTAGAACCCCTGCACTCACTCGCTTTCAC
1246

Query  570   TTGTTTCGCACCTGGTTCCATCTTCGATAACGACGGGCGGTGTGTACAAAGAACAGGGACA
629
      |||
Sbjct 1245   TTGTTTCGCACCTGGTTCCATCTTCGATAACGACGGGCGGTGTGTACAAAGAACAGGGACA
1186

Query  630   CATTCATCGCTTCTTAGTGAGATAACGATTACTAGCAATTCCTCGTTCCTGTGCACATTA
689
      |||
Sbjct 1185   CATTCATCGCTTCTTAGTGAGATAACGATTACTAGCAATTCCTCGTTCCTGTGCACATTA
1126

Query  690   CAGTGCTCATTCCCTCTTGATCACATTTATTTCTTTTTGTCTTTGTTGTGACCACTGTA
749
      |||
Sbjct 1125   CAGTGCTCATTCCCTCTCGATCACATTTATTTSTGGTTTGTGTTTGTGTTGTGACCACTGTA
1066

Query  750   GTGCGCGTGCAGCCCATAACCTCCTAAAGGCATCACTGACCTGTTCTTGCCCCTTCCTTCC
809
      |||
Sbjct 1065   GTGCGCGTGCAGCCCATAACCATCTAAGGCATCACTGACCTGTTCTTGCCCCTTCCTTCC
1006

Query  810   GCGCTTCTCGCTCCTGTCGATATCT 835
      |||
Sbjct 1005   GCGCTTCTCGCTCCTGTCGATATCT 980
  
```

**Phụ lục 6: Tỷ lệ nhiễm (%) vi bào tử trùng trên cá tra ở các tỉnh thu mẫu**

Loại cá	An Giang	Cần Thơ	Vĩnh Long
Cá hương	0	93,3±0,0	0
Cá giống	92,6±5,5	78,7±4,9	88±9,0
Cá thịt	66,6±28,3	77,7±10,2	51,1±19,2

**Phụ lục 7: Thời gian (phút) và nồng độ (%) gây bất hoạt bào tử của ethanol và formaline**

Hóa chất	Nồng độ (%)						
	70	65	60	55	50	45	40
Ethanol	3,58	4,1	4,27	6,38	7,53	9,53	29,13
	3,48	3,95	4,07	6,26	7,33	9,03	28,58
	3,28	3,65	3,82	5,91	6,93	8,73	28,18
Formalin	3,43	6,08	12,47	13,95	15,6	17,33	32,45
	3,33	5,93	12,27	13,83	15,4	16,83	31,9
	3,13	5,63	12,02	13,48	15	16,53	31,5

**Phụ lục 8: Thời gian (phút) và nồng độ (%) gây bất hoạt bào tử của 4 loại hóa chất**

Hóa chất	Nồng độ (%)						
	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Clorin	6,42	7,12	12,22	15,63	17,18	18,08	40
	6,32	6,97	12,02	15,51	16,98	17,58	39,45
	6,12	6,67	11,77	15,16	16,58	17,28	39,05
Iodine	7,42	10,25	15,58	17,7	19,35	22,33	32,25
	7,32	10,1	15,38	17,58	19,15	21,83	31,7
	7,12	9,8	15,13	17,23	18,75	21,53	31,3
Clorin dioxide	1,58	5,33	7,08	10,62	12,3	15,45	17,75
	1,48	5,18	6,88	10,5	12,1	14,95	17,2
	1,28	4,88	6,63	10,15	11,7	14,65	16,8
Oxy già	1,08	2,75	4,04	10,62	12,53	13,08	15,58
	1,05	2,57	4	10,5	12,33	12,58	15,03
	1,03	2,33	4,05	10,15	11,93	12,28	14,63

**Phụ lục 9: Mật độ tế bào thận ( $\times 10^6$  bào tử/ml) trong môi trường L15**

Giếng	Thời gian nuôi cấy (giờ)						
	0	6	12	18	24	36	48

Giếng nuôi 1	7,3	7,2	7	7	6,5	6,5	6,4
Giếng nuôi 2	7,2	7,1	6,7	6,7	6,5	6,3	6,3
Giếng nuôi 3	7,3	7,1	6,8	6,5	6,5	6,5	6,5
<b>Trung bình</b>	<b>7,27</b>	<b>7,13</b>	<b>6,83</b>	<b>6,73</b>	<b>6,50</b>	<b>6,43</b>	<b>6,40</b>
<b>ĐLC</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,15</b>	<b>0,25</b>	<b>0,00</b>	<b>0,12</b>	<b>0,10</b>

**Phụ lục 10: Tỷ lệ (%) sợi cơ phát triển/tổng số sợi cơ quan sát trong môi trường L15**

Giếng	Thời gian nuôi cấy (giờ)						
	0	6	12	18	24	36	48
Giếng nuôi 1	0	0	9,68	11,29	51,61	58,06	72,58
Giếng nuôi 2	0	0	9,52	12,70	57,14	63,49	71,43
Giếng nuôi 3	0	0	10,45	11,94	52,24	62,69	70,15
<b>Trung bình</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9,88</b>	<b>11,98</b>	<b>53,66</b>	<b>61,41</b>	<b>71,39</b>
<b>ĐLC</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,50</b>	<b>0,70</b>	<b>3,03</b>	<b>2,93</b>	<b>1,22</b>

**Phụ lục 11: Tỷ lệ (%) tế bào thận cá nhiễm bào tử trong môi trường L15 (x 10<sup>6</sup> bào tử/ml)**

Giếng	Thời gian nuôi cấy (giờ)						
	0	2	4	6	8	10	12
Giếng nuôi 1	0	14,29	22,86	47,62	80,95	100	100
Giếng nuôi 2	0	9,09	23,64	65,45	80,00	100	100
Giếng nuôi 3	0	11,65	22,33	72,82	84,47	100	100
<b>Trung bình</b>	<b>0</b>	<b>11,68</b>	<b>22,94</b>	<b>61,96</b>	<b>81,81</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>ĐLC</b>	<b>0</b>	<b>2,60</b>	<b>0,66</b>	<b>12,96</b>	<b>2,35</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

**Phụ lục 12: Tỷ lệ (%) sợi cơ nhiễm bào tử cảm nhiễm trong môi trường L15**

Giếng	Thời gian nuôi cấy (giờ)						
	0	2	4	6	8	10	12
Giếng nuôi 1	0	4,84	16,13	61,29	75,81	98,39	100
Giếng nuôi 2	0	6,85	19,18	57,53	84,93	95,89	100
Giếng nuôi 3	0	10,77	26,15	52,31	81,54	96,92	100
<b>Trung bình</b>	<b>0</b>	<b>7,49</b>	<b>20,49</b>	<b>57,04</b>	<b>80,76</b>	<b>97,07</b>	<b>100,00</b>
<b>ĐLC</b>	<b>0</b>	<b>3,02</b>	<b>5,14</b>	<b>4,51</b>	<b>4,61</b>	<b>1,25</b>	<b>0,00</b>



**Phụ lục 13: Tỷ lệ (%) bào tử *Kabatana* sp. bị ức chế bởi albendazole và fumagillin**

Tế bào	Nồng độ kháng sinh ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0	3	4	5
<b>Albendazole</b>				
Tế bào thận	0,00	15,24	38,76	100,00
Tế bào cơ	0,00	14,45	32,53	100,00
<b>Fumagillin</b>				
Tế bào thận	0,00	19,29	26,45	96,16
Tế bào cơ	0,00	11,53	34,31	97,87

**Phụ lục 14: So sánh thống kê thời gian của các nồng độ ethanol gây bất hoạt bào tử**  
ANOVA

TG	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1432.767	6	238.794	2.493E3	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	1434.108	20			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: TG

	(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.45333	.25269	.094	-.9953	.0886
		3	-.60667*	.25269	.031	-1.1486	-.0647
		4	-2.73667*	.25269	.000	-3.2786	-2.1947
		5	-3.81667*	.25269	.000	-4.3586	-3.2747
		6	-5.65000*	.25269	.000	-6.1920	-5.1080
		7	-25.18333*	.25269	.000	-25.7253	-24.6414
	2	1	.45333	.25269	.094	-.0886	.9953
		3	-.15333	.25269	.554	-.6953	.3886
		4	-2.28333*	.25269	.000	-2.8253	-1.7414
		5	-3.36333*	.25269	.000	-3.9053	-2.8214
		6	-5.19667*	.25269	.000	-5.7386	-4.6547
		7	-24.73000*	.25269	.000	-25.2720	-24.1880
	3	1	.60667*	.25269	.031	.0647	1.1486
		2	.15333	.25269	.554	-.3886	.6953
		4	-2.13000*	.25269	.000	-2.6720	-1.5880
		5	-3.21000*	.25269	.000	-3.7520	-2.6680
		6	-5.04333*	.25269	.000	-5.5853	-4.5014
		7	-24.57667*	.25269	.000	-25.1186	-24.0347
	4	1	2.73667*	.25269	.000	2.1947	3.2786
		2	2.28333*	.25269	.000	1.7414	2.8253
		3	2.13000*	.25269	.000	1.5880	2.6720
5		-1.08000*	.25269	.001	-1.6220	-.5380	
6		-2.91333*	.25269	.000	-3.4553	-2.3714	
7		-22.44667*	.25269	.000	-22.9886	-21.9047	
5	1	3.81667*	.25269	.000	3.2747	4.3586	
	2	3.36333*	.25269	.000	2.8214	3.9053	
	3	3.21000*	.25269	.000	2.6680	3.7520	
	4	1.08000*	.25269	.001	.5380	1.6220	
	6	-1.83333*	.25269	.000	-2.3753	-1.2914	
	7	-21.36667*	.25269	.000	-21.9086	-20.8247	
6	1	5.65000*	.25269	.000	5.1080	6.1920	
	2	5.19667*	.25269	.000	4.6547	5.7386	
	3	5.04333*	.25269	.000	4.5014	5.5853	
	4	2.91333*	.25269	.000	2.3714	3.4553	

	5	1.83333*	.25269	.000	1.2914	2.3753
	7	-19.53333*	.25269	.000	-20.0753	-18.9914
7	1	25.18333*	.25269	.000	24.6414	25.7253
	2	24.73000*	.25269	.000	24.1880	25.2720
	3	24.57667*	.25269	.000	24.0347	25.1186
	4	22.44667*	.25269	.000	21.9047	22.9886
	5	21.36667*	.25269	.000	20.8247	21.9086
	6	19.53333*	.25269	.000	18.9914	20.0753

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 15: So sánh thống kê thời gian các nồng độ formalin gây bất hoạt bào tử**

**ANOVA**

TG	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1547.139	6	257.856	2.692E3	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	1548.480	20			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: TG

	(I) TN (J) TN		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1	2	-2.58333*	.25269	.000	-3.4462	-1.7205
		3	-8.95667*	.25269	.000	-9.8195	-8.0938
		4	-10.45667*	.25269	.000	-11.3195	-9.5938
		5	-12.03667*	.25269	.000	-12.8995	-11.1738
		6	-13.60000*	.25269	.000	-14.4628	-12.7372
		7	-28.65333*	.25269	.000	-29.5162	-27.7905
	2	1	2.58333*	.25269	.000	1.7205	3.4462
		3	-6.37333*	.25269	.000	-7.2362	-5.5105
		4	-7.87333*	.25269	.000	-8.7362	-7.0105
		5	-9.45333*	.25269	.000	-10.3162	-8.5905
		6	-11.01667*	.25269	.000	-11.8795	-10.1538
		7	-26.07000*	.25269	.000	-26.9328	-25.2072
	3	1	8.95667*	.25269	.000	8.0938	9.8195
		2	6.37333*	.25269	.000	5.5105	7.2362
		4	-1.50000*	.25269	.001	-2.3628	-.6372
		5	-3.08000*	.25269	.000	-3.9428	-2.2172
		6	-4.64333*	.25269	.000	-5.5062	-3.7805
		7	-19.69667*	.25269	.000	-20.5595	-18.8338
	4	1	10.45667*	.25269	.000	9.5938	11.3195
		2	7.87333*	.25269	.000	7.0105	8.7362
		3	1.50000*	.25269	.001	.6372	2.3628
5		-1.58000*	.25269	.000	-2.4428	-.7172	
6		-3.14333*	.25269	.000	-4.0062	-2.2805	
7		-18.19667*	.25269	.000	-19.0595	-17.3338	
5	1	12.03667*	.25269	.000	11.1738	12.8995	
	2	9.45333*	.25269	.000	8.5905	10.3162	
	3	3.08000*	.25269	.000	2.2172	3.9428	
	4	1.58000*	.25269	.000	.7172	2.4428	
	6	-1.56333*	.25269	.000	-2.4262	-.7005	
	7	-16.61667*	.25269	.000	-17.4795	-15.7538	
6	1	13.60000*	.25269	.000	12.7372	14.4628	
	2	11.01667*	.25269	.000	10.1538	11.8795	
	3	4.64333*	.25269	.000	3.7805	5.5062	
	4	3.14333*	.25269	.000	2.2805	4.0062	
	5	1.56333*	.25269	.000	.7005	2.4262	

	7		-15.05333*	.25269	.000	-15.9162	-14.1905
	7	1	28.65333*	.25269	.000	27.7905	29.5162
		2	26.07000*	.25269	.000	25.2072	26.9328
		3	19.69667*	.25269	.000	18.8338	20.5595
		4	18.19667*	.25269	.000	17.3338	19.0595
		5	16.61667*	.25269	.000	15.7538	17.4795
		6	15.05333*	.25269	.000	14.1905	15.9162
LSD	1	2	-2.58333*	.25269	.000	-3.1253	-2.0414
		3	-8.95667*	.25269	.000	-9.4986	-8.4147
		4	-10.45667*	.25269	.000	-10.9986	-9.9147
		5	-12.03667*	.25269	.000	-12.5786	-11.4947
		6	-13.60000*	.25269	.000	-14.1420	-13.0580
		7	-28.65333*	.25269	.000	-29.1953	-28.1114
	2	1	2.58333*	.25269	.000	2.0414	3.1253
		3	-6.37333*	.25269	.000	-6.9153	-5.8314
		4	-7.87333*	.25269	.000	-8.4153	-7.3314
		5	-9.45333*	.25269	.000	-9.9953	-8.9114
		6	-11.01667*	.25269	.000	-11.5586	-10.4747
		7	-26.07000*	.25269	.000	-26.6120	-25.5280
	3	1	8.95667*	.25269	.000	8.4147	9.4986
		2	6.37333*	.25269	.000	5.8314	6.9153
		4	-1.50000*	.25269	.000	-2.0420	-.9580
		5	-3.08000*	.25269	.000	-3.6220	-2.5380
		6	-4.64333*	.25269	.000	-5.1853	-4.1014
		7	-19.69667*	.25269	.000	-20.2386	-19.1547
	4	1	10.45667*	.25269	.000	9.9147	10.9986
		2	7.87333*	.25269	.000	7.3314	8.4153
		3	1.50000*	.25269	.000	.9580	2.0420
		5	-1.58000*	.25269	.000	-2.1220	-1.0380
		6	-3.14333*	.25269	.000	-3.6853	-2.6014
		7	-18.19667*	.25269	.000	-18.7386	-17.6547
	5	1	12.03667*	.25269	.000	11.4947	12.5786
		2	9.45333*	.25269	.000	8.9114	9.9953
		3	3.08000*	.25269	.000	2.5380	3.6220
		4	1.58000*	.25269	.000	1.0380	2.1220
		6	-1.56333*	.25269	.000	-2.1053	-1.0214
		7	-16.61667*	.25269	.000	-17.1586	-16.0747
	6	1	13.60000*	.25269	.000	13.0580	14.1420
		2	11.01667*	.25269	.000	10.4747	11.5586
		3	4.64333*	.25269	.000	4.1014	5.1853
		4	3.14333*	.25269	.000	2.6014	3.6853
		5	1.56333*	.25269	.000	1.0214	2.1053

	7	-15.05333*	.25269	.000	-15.5953	-14.5114
7	1	28.65333*	.25269	.000	28.1114	29.1953
	2	26.07000*	.25269	.000	25.5280	26.6120
	3	19.69667*	.25269	.000	19.1547	20.2386
	4	18.19667*	.25269	.000	17.6547	18.7386
	5	16.61667*	.25269	.000	16.0747	17.1586
	6	15.05333*	.25269	.000	14.5114	15.5953

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 16: So sánh thống kê thời gian của các nồng độ clorin gây bất hoạt bào tử**  
ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2243.524	6	373.921	3.904E3	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	2244.865	20			

**Post Hoc Tests**

Multiple Comparisons

tg  
LSD

(I) nt	(J) nt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.633*	.253	.025	-1.18	-.09
	3	-5.717*	.253	.000	-6.26	-5.17
	4	-9.147*	.253	.000	-9.69	-8.60
	5	-10.627*	.253	.000	-11.17	-10.08
	6	-11.360*	.253	.000	-11.90	-10.82
	7	-33.213*	.253	.000	-33.76	-32.67
2	1	.633*	.253	.025	.09	1.18
	3	-5.083*	.253	.000	-5.63	-4.54
	4	-8.513*	.253	.000	-9.06	-7.97
	5	-9.993*	.253	.000	-10.54	-9.45
	6	-10.727*	.253	.000	-11.27	-10.18
	7	-32.580*	.253	.000	-33.12	-32.04
3	1	5.717*	.253	.000	5.17	6.26
	2	5.083*	.253	.000	4.54	5.63
	4	-3.430*	.253	.000	-3.97	-2.89
	5	-4.910*	.253	.000	-5.45	-4.37
	6	-5.643*	.253	.000	-6.19	-5.10
	7	-27.497*	.253	.000	-28.04	-26.95
4	1	9.147*	.253	.000	8.60	9.69
	2	8.513*	.253	.000	7.97	9.06
	3	3.430*	.253	.000	2.89	3.97
	5	-1.480*	.253	.000	-2.02	-.94
	6	-2.213*	.253	.000	-2.76	-1.67
	7	-24.067*	.253	.000	-24.61	-23.52
5	1	10.627*	.253	.000	10.08	11.17
	2	9.993*	.253	.000	9.45	10.54
	3	4.910*	.253	.000	4.37	5.45
	4	1.480*	.253	.000	.94	2.02
	6	-.733*	.253	.012	-1.28	-.19
	7	-22.587*	.253	.000	-23.13	-22.04
6	1	11.360*	.253	.000	10.82	11.90
	2	10.727*	.253	.000	10.18	11.27
	3	5.643*	.253	.000	5.10	6.19
	4	2.213*	.253	.000	1.67	2.76
	5	.733*	.253	.012	.19	1.28
	7	-21.853*	.253	.000	-22.40	-21.31
7	1	33.213*	.253	.000	32.67	33.76

2	32.580*	.253	.000	32.04	33.12
3	27.497*	.253	.000	26.95	28.04
4	24.067*	.253	.000	23.52	24.61
5	22.587*	.253	.000	22.04	23.13
6	21.853*	.253	.000	21.31	22.40

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 17: So sánh thống kê thời gian của các nồng độ iodine gây bất hoạt bào tử**  
ANOVA

tg	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1167.760	6	194.627	2.032E3	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	1169.101	20			

**Post Hoc Tests**



Multiple Comparisons

tg  
LSD

(I) nt	(J) nt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.763*	.253	.000	-3.31	-2.22
	3	-8.077*	.253	.000	-8.62	-7.53
	4	-10.217*	.253	.000	-10.76	-9.67
	5	-11.797*	.253	.000	-12.34	-11.25
	6	-14.610*	.253	.000	-15.15	-14.07
	7	-24.463*	.253	.000	-25.01	-23.92
2	1	2.763*	.253	.000	2.22	3.31
	3	-5.313*	.253	.000	-5.86	-4.77
	4	-7.453*	.253	.000	-8.00	-6.91
	5	-9.033*	.253	.000	-9.58	-8.49
	6	-11.847*	.253	.000	-12.39	-11.30
	7	-21.700*	.253	.000	-22.24	-21.16
3	1	8.077*	.253	.000	7.53	8.62
	2	5.313*	.253	.000	4.77	5.86
	4	-2.140*	.253	.000	-2.68	-1.60
	5	-3.720*	.253	.000	-4.26	-3.18
	6	-6.533*	.253	.000	-7.08	-5.99
	7	-16.387*	.253	.000	-16.93	-15.84
4	1	10.217*	.253	.000	9.67	10.76
	2	7.453*	.253	.000	6.91	8.00
	3	2.140*	.253	.000	1.60	2.68
	5	-1.580*	.253	.000	-2.12	-1.04
	6	-4.393*	.253	.000	-4.94	-3.85
	7	-14.247*	.253	.000	-14.79	-13.70
5	1	11.797*	.253	.000	11.25	12.34
	2	9.033*	.253	.000	8.49	9.58
	3	3.720*	.253	.000	3.18	4.26
	4	1.580*	.253	.000	1.04	2.12
	6	-2.813*	.253	.000	-3.36	-2.27
	7	-12.667*	.253	.000	-13.21	-12.12
6	1	14.610*	.253	.000	14.07	15.15
	2	11.847*	.253	.000	11.30	12.39
	3	6.533*	.253	.000	5.99	7.08
	4	4.393*	.253	.000	3.85	4.94
	5	2.813*	.253	.000	2.27	3.36
	7	-9.853*	.253	.000	-10.40	-9.31
7	1	24.463*	.253	.000	23.92	25.01

2	21.700*	.253	.000	21.16	22.24
3	16.387*	.253	.000	15.84	16.93
4	14.247*	.253	.000	13.70	14.79
5	12.667*	.253	.000	12.12	13.21
6	9.853*	.253	.000	9.31	10.40

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 18: So sánh thống kê thời gian các nồng độ clorin dioxide gây bất hoạt bào tử**  
ANOVA

tg	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	564.829	6	94.138	982.848	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	566.170	20			

**Post Hoc Tests**

Multiple Comparisons

tg  
LSD

(I) nt	(J) nt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-3.683*	.253	.000	-4.23	-3.14
	3	-5.417*	.253	.000	-5.96	-4.87
	4	-8.977*	.253	.000	-9.52	-8.43
	5	-10.587*	.253	.000	-11.13	-10.04
	6	-13.570*	.253	.000	-14.11	-13.03
	7	-15.803*	.253	.000	-16.35	-15.26
2	1	3.683*	.253	.000	3.14	4.23
	3	-1.733*	.253	.000	-2.28	-1.19
	4	-5.293*	.253	.000	-5.84	-4.75
	5	-6.903*	.253	.000	-7.45	-6.36
	6	-9.887*	.253	.000	-10.43	-9.34
	7	-12.120*	.253	.000	-12.66	-11.58
3	1	5.417*	.253	.000	4.87	5.96
	2	1.733*	.253	.000	1.19	2.28
	4	-3.560*	.253	.000	-4.10	-3.02
	5	-5.170*	.253	.000	-5.71	-4.63
	6	-8.153*	.253	.000	-8.70	-7.61
	7	-10.387*	.253	.000	-10.93	-9.84
4	1	8.977*	.253	.000	8.43	9.52
	2	5.293*	.253	.000	4.75	5.84
	3	3.560*	.253	.000	3.02	4.10
	5	-1.610*	.253	.000	-2.15	-1.07
	6	-4.593*	.253	.000	-5.14	-4.05
	7	-6.827*	.253	.000	-7.37	-6.28
5	1	10.587*	.253	.000	10.04	11.13
	2	6.903*	.253	.000	6.36	7.45
	3	5.170*	.253	.000	4.63	5.71
	4	1.610*	.253	.000	1.07	2.15
	6	-2.983*	.253	.000	-3.53	-2.44
	7	-5.217*	.253	.000	-5.76	-4.67
6	1	13.570*	.253	.000	13.03	14.11
	2	9.887*	.253	.000	9.34	10.43
	3	8.153*	.253	.000	7.61	8.70
	4	4.593*	.253	.000	4.05	5.14
	5	2.983*	.253	.000	2.44	3.53
	7	-2.233*	.253	.000	-2.78	-1.69
7	1	15.803*	.253	.000	15.26	16.35

2	12.120*	.253	.000	11.58	12.66
3	10.387*	.253	.000	9.84	10.93
4	6.827*	.253	.000	6.28	7.37
5	5.217*	.253	.000	4.67	5.76
6	2.233*	.253	.000	1.69	2.78

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 19: So sánh thống kê thời gian các nồng độ hydrogen peroxide gây bất hoạt bào tử**  
ANOVA

tg	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	667.680	6	111.280	1.162E3	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	669.021	20			

**Post Hoc Tests**

Multiple Comparisons

tg  
LSD

(I) nt	(J) nt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.603*	.253	.032	-1.15	-.06
	3	-1.087*	.253	.001	-1.63	-.54
	4	-9.477*	.253	.000	-10.02	-8.93
	5	-11.317*	.253	.000	-11.86	-10.77
	6	-11.700*	.253	.000	-12.24	-11.16
	7	-14.133*	.253	.000	-14.68	-13.59
2	1	.603*	.253	.032	.06	1.15
	3	-.483	.253	.076	-1.03	.06
	4	-8.873*	.253	.000	-9.42	-8.33
	5	-10.713*	.253	.000	-11.26	-10.17
	6	-11.097*	.253	.000	-11.64	-10.55
	7	-13.530*	.253	.000	-14.07	-12.99
3	1	1.087*	.253	.001	.54	1.63
	2	.483	.253	.076	-.06	1.03
	4	-8.390*	.253	.000	-8.93	-7.85
	5	-10.230*	.253	.000	-10.77	-9.69
	6	-10.613*	.253	.000	-11.16	-10.07
	7	-13.047*	.253	.000	-13.59	-12.50
4	1	9.477*	.253	.000	8.93	10.02
	2	8.873*	.253	.000	8.33	9.42
	3	8.390*	.253	.000	7.85	8.93
	5	-1.840*	.253	.000	-2.38	-1.30
	6	-2.223*	.253	.000	-2.77	-1.68
	7	-4.657*	.253	.000	-5.20	-4.11
5	1	11.317*	.253	.000	10.77	11.86
	2	10.713*	.253	.000	10.17	11.26
	3	10.230*	.253	.000	9.69	10.77
	4	1.840*	.253	.000	1.30	2.38
	6	-.383	.253	.152	-.93	.16
	7	-2.817*	.253	.000	-3.36	-2.27
6	1	11.700*	.253	.000	11.16	12.24
	2	11.097*	.253	.000	10.55	11.64
	3	10.613*	.253	.000	10.07	11.16
	4	2.223*	.253	.000	1.68	2.77
	5	.383	.253	.152	-.16	.93
	7	-2.433*	.253	.000	-2.98	-1.89
7	1	14.133*	.253	.000	13.59	14.68

2	13.530*	.253	.000	12.99	14.07
3	13.047*	.253	.000	12.50	13.59
4	4.657*	.253	.000	4.11	5.20
5	2.817*	.253	.000	2.27	3.36
6	2.433*	.253	.000	1.89	2.98

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 20: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt vi bào tử của albendazole, fumagillin và TNP-470**

Hóa chất	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	5	4	3	2	1	0,5	0,1
Albendazole	3,33	3,67	3,25	5,62	6,75	7,5	12,25
	3,23	3,52	3,05	5,5	6,55	7	11,7
	3,03	3,22	2,8	5,15	6,15	6,7	11,3
Fumagillin	4,17	5,58	5,75	5,33	7,25	12,42	14,17
	4,07	5,43	5,55	5,21	7,05	11,92	13,62
	3,87	5,13	5,3	4,86	6,65	11,62	13,22
TNP-70	5,5	5,75	6,5	7,25	7,75	9,33	14,25
	5,4	5,6	6,3	7,13	7,55	8,83	13,7
	5,2	5,3	6,05	6,78	7,15	8,53	13,3

**Phụ lục 21: So sánh thống kê thời gian của các nồng độ albendazole gây bất hoạt bào tử**

ANOVA					
tg	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	172.416	6	28.736	300.018	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	173.757	20			

**Post Hoc Tests**  
**Multiple Comparisons**

tg  
LSD

(I) nt	(J) nt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.27333	.25269	.298	-.8153	.2686
	3	.16333	.25269	.528	-.3786	.7053
	4	-2.22667*	.25269	.000	-2.7686	-1.6847
	5	-3.28667*	.25269	.000	-3.8286	-2.7447
	6	-3.87000*	.25269	.000	-4.4120	-3.3280
	7	-8.55333*	.25269	.000	-9.0953	-8.0114
2	1	.27333	.25269	.298	-.2686	.8153
	3	.43667	.25269	.106	-.1053	.9786
	4	-1.95333*	.25269	.000	-2.4953	-1.4114
	5	-3.01333*	.25269	.000	-3.5553	-2.4714
	6	-3.59667*	.25269	.000	-4.1386	-3.0547
	7	-8.28000*	.25269	.000	-8.8220	-7.7380
3	1	-.16333	.25269	.528	-.7053	.3786
	2	-.43667	.25269	.106	-.9786	.1053
	4	-2.39000*	.25269	.000	-2.9320	-1.8480
	5	-3.45000*	.25269	.000	-3.9920	-2.9080
	6	-4.03333*	.25269	.000	-4.5753	-3.4914
	7	-8.71667*	.25269	.000	-9.2586	-8.1747
4	1	2.22667*	.25269	.000	1.6847	2.7686
	2	1.95333*	.25269	.000	1.4114	2.4953
	3	2.39000*	.25269	.000	1.8480	2.9320
	5	-1.06000*	.25269	.001	-1.6020	-.5180
	6	-1.64333*	.25269	.000	-2.1853	-1.1014
	7	-6.32667*	.25269	.000	-6.8686	-5.7847
5	1	3.28667*	.25269	.000	2.7447	3.8286
	2	3.01333*	.25269	.000	2.4714	3.5553
	3	3.45000*	.25269	.000	2.9080	3.9920
	4	1.06000*	.25269	.001	.5180	1.6020
	6	-.58333*	.25269	.037	-1.1253	-.0414
	7	-5.26667*	.25269	.000	-5.8086	-4.7247
6	1	3.87000*	.25269	.000	3.3280	4.4120
	2	3.59667*	.25269	.000	3.0547	4.1386
	3	4.03333*	.25269	.000	3.4914	4.5753
	4	1.64333*	.25269	.000	1.1014	2.1853
	5	.58333*	.25269	.037	.0414	1.1253
	7	-4.68333*	.25269	.000	-5.2253	-4.1414

7	1	8.55333*	.25269	.000	8.0114	9.0953
	2	8.28000*	.25269	.000	7.7380	8.8220
	3	8.71667*	.25269	.000	8.1747	9.2586
	4	6.32667*	.25269	.000	5.7847	6.8686
	5	5.26667*	.25269	.000	4.7247	5.8086
	6	4.68333*	.25269	.000	4.1414	5.2253

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 22: So sánh thống kê thời gian của các nồng độ fumagillin gây bất hoạt bào tử**  
ANOVA

tg	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	253.251	6	42.208	440.677	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	254.592	20			

**Post Hoc Tests**



Multiple Comparisons

tg  
LSD

(I) nt	(J) nt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-1.34333*	.25269	.000	-1.8853	-.8014
	3	-1.49667*	.25269	.000	-2.0386	-.9547
	4	-1.09667*	.25269	.001	-1.6386	-.5547
	5	-2.94667*	.25269	.000	-3.4886	-2.4047
	6	-7.95000*	.25269	.000	-8.4920	-7.4080
	7	-9.63333*	.25269	.000	-10.1753	-9.0914
2	1	1.34333*	.25269	.000	.8014	1.8853
	3	-.15333	.25269	.554	-.6953	.3886
	4	.24667	.25269	.346	-.2953	.7886
	5	-1.60333*	.25269	.000	-2.1453	-1.0614
	6	-6.60667*	.25269	.000	-7.1486	-6.0647
	7	-8.29000*	.25269	.000	-8.8320	-7.7480
3	1	1.49667*	.25269	.000	.9547	2.0386
	2	.15333	.25269	.554	-.3886	.6953
	4	.40000	.25269	.136	-.1420	.9420
	5	-1.45000*	.25269	.000	-1.9920	-.9080
	6	-6.45333*	.25269	.000	-6.9953	-5.9114
	7	-8.13667*	.25269	.000	-8.6786	-7.5947
4	1	1.09667*	.25269	.001	.5547	1.6386
	2	-.24667	.25269	.346	-.7886	.2953
	3	-.40000	.25269	.136	-.9420	.1420
	5	-1.85000*	.25269	.000	-2.3920	-1.3080
	6	-6.85333*	.25269	.000	-7.3953	-6.3114
	7	-8.53667*	.25269	.000	-9.0786	-7.9947
5	1	2.94667*	.25269	.000	2.4047	3.4886
	2	1.60333*	.25269	.000	1.0614	2.1453
	3	1.45000*	.25269	.000	.9080	1.9920
	4	1.85000*	.25269	.000	1.3080	2.3920
	6	-5.00333*	.25269	.000	-5.5453	-4.4614
	7	-6.68667*	.25269	.000	-7.2286	-6.1447
6	1	7.95000*	.25269	.000	7.4080	8.4920
	2	6.60667*	.25269	.000	6.0647	7.1486
	3	6.45333*	.25269	.000	5.9114	6.9953
	4	6.85333*	.25269	.000	6.3114	7.3953
	5	5.00333*	.25269	.000	4.4614	5.5453
	7	-1.68333*	.25269	.000	-2.2253	-1.1414
7	1	9.63333*	.25269	.000	9.0914	10.1753

2	8.29000*	.25269	.000	7.7480	8.8320
3	8.13667*	.25269	.000	7.5947	8.6786
4	8.53667*	.25269	.000	7.9947	9.0786
5	6.68667*	.25269	.000	6.1447	7.2286
6	1.68333*	.25269	.000	1.1414	2.2253

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .

**Phụ lục 23: So sánh thống kê thời gian của các nồng độ TNP-70 gây bất hoạt bào tử**  
ANOVA

tg	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	151.620	6	25.270	263.832	.000
Within Groups	1.341	14	.096		
Total	152.961	20			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

tg  
LSD

(I) nt	(J) nt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.18333	.25269	.480	-.7253	.3586
	3	-.91667*	.25269	.003	-1.4586	-.3747
	4	-1.68667*	.25269	.000	-2.2286	-1.1447
	5	-2.11667*	.25269	.000	-2.6586	-1.5747
	6	-3.53000*	.25269	.000	-4.0720	-2.9880
	7	-8.38333*	.25269	.000	-8.9253	-7.8414
2	1	.18333	.25269	.480	-.3586	.7253
	3	-.73333*	.25269	.012	-1.2753	-.1914
	4	-1.50333*	.25269	.000	-2.0453	-.9614
	5	-1.93333*	.25269	.000	-2.4753	-1.3914
	6	-3.34667*	.25269	.000	-3.8886	-2.8047
	7	-8.20000*	.25269	.000	-8.7420	-7.6580
3	1	.91667*	.25269	.003	.3747	1.4586
	2	.73333*	.25269	.012	.1914	1.2753
	4	-.77000*	.25269	.009	-1.3120	-.2280
	5	-1.20000*	.25269	.000	-1.7420	-.6580
	6	-2.61333*	.25269	.000	-3.1553	-2.0714
	7	-7.46667*	.25269	.000	-8.0086	-6.9247
4	1	1.68667*	.25269	.000	1.1447	2.2286
	2	1.50333*	.25269	.000	.9614	2.0453
	3	.77000*	.25269	.009	.2280	1.3120
	5	-.43000	.25269	.111	-.9720	.1120
	6	-1.84333*	.25269	.000	-2.3853	-1.3014
	7	-6.69667*	.25269	.000	-7.2386	-6.1547
5	1	2.11667*	.25269	.000	1.5747	2.6586
	2	1.93333*	.25269	.000	1.3914	2.4753
	3	1.20000*	.25269	.000	.6580	1.7420
	4	.43000	.25269	.111	-.1120	.9720
	6	-1.41333*	.25269	.000	-1.9553	-.8714
	7	-6.26667*	.25269	.000	-6.8086	-5.7247
6	1	3.53000*	.25269	.000	2.9880	4.0720
	2	3.34667*	.25269	.000	2.8047	3.8886
	3	2.61333*	.25269	.000	2.0714	3.1553
	4	1.84333*	.25269	.000	1.3014	2.3853
	5	1.41333*	.25269	.000	.8714	1.9553
	7	-4.85333*	.25269	.000	-5.3953	-4.3114
7	1	8.38333*	.25269	.000	7.8414	8.9253

2	8.20000*	.25269	.000	7.6580	8.7420
3	7.46667*	.25269	.000	6.9247	8.0086
4	6.69667*	.25269	.000	6.1547	7.2386
5	6.26667*	.25269	.000	5.7247	6.8086
6	4.85333*	.25269	.000	4.3114	5.3953

\*. khác biệt có ý nghĩa ở  $p=0.05$ .