

NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI SÁN *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS* DƯỚI KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ QUÉT

Morphological Study of *Echinococcus granulosus* Using the Scanning Electron Microscope

Nguyễn Thị Lan¹, Phạm Thanh An¹, Phạm Ngọc Doanh², Tatsuo Nasu³

¹ Khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

² Viện Công nghệ sinh học Việt Nam

³ Trường Đại học Miyazaki, Nhật Bản

Địa chỉ email tác giả liên lạc: lanjp2000@yahoo.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tiến hành quan sát và mô tả các đặc điểm hình thái học của 25 mẫu sán dây trưởng thành loài *Echinococcus granulosus* dưới kính hiển vi điện tử quét. Kết quả cho thấy, cơ thể sán trưởng thành gồm 5 đốt, kích thước cơ thể 0,8 - 1,35 mm. Chiều dài đầu sán 0,06 - 0,22 mm và chiều rộng là 0,04 - 0,121 mm. Đường kính mõm 30,5 - 89,1 μ m và có 20 - 32 móc bám nhỏ được xếp thành hai hàng. Chiều dài đốt chửa 0,33 - 0,62 mm. Toàn bộ cơ thể sán được bao phủ bởi hai loại lông tơ khác nhau rõ rệt. Lông tơ bao phủ phần cơ thể sán được mô tả lần đầu tiên trong nghiên cứu này.

Từ khóa: *Echinococcus granulosus*, hình thái, kính hiển vi điện tử quét, lông tơ, SEM.

SUMMARY

Morphology of 25 adult flat worms of *Echinococcus granulosus* was observed and described using the scanning electron microscope (SEM). Results showed that the flat worm body was 0.8 - 1.35 mm in length and consisted of 5 segments. The scolex was 0.06 - 0.22 mm in length and 0.04 - 0.121 mm in width. The rostellum, which was 30.5 - 89.1 μ m in diameter, was armed with two rows of 20 - 32 tiny hooks. The gravid segment was 0.33 - 0.62 mm in length. The body surface of the adult worms was covered with 2 different types of microtriches. The microtriches covering the worm body was described for the first time in this study.

Key words: *Echinococcus granulosus*, flat worm, microtriches, SEM.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sán dây *Echinococcus granulosus* thuộc giống *Echinococcus*, bộ Cyclophyllidea là loài sán nguy hiểm gây ra bệnh Echinococcosis. Đây là một trong những bệnh ký sinh trùng truyền lây rất nguy hiểm giữa người và động vật (Thompson and Lymbery, 1988). Sán trưởng thành ký sinh trong ruột non của vật chủ cuối cùng là các loài động vật họ nhà chó, mèo thường gây ra các triệu chứng viêm ruột, gầy còm, giảm ăn... Tác hại trực tiếp

lên vật chủ cuối cùng không lớn nhưng các đốt sán chứa đầy trứng sán có khả năng gây nhiễm có thể tự động bò ra bên ngoài phát tán vào môi trường xung quanh. Khi các vật chủ trung gian là các loài động vật có xương sống, trong đó có cả người ăn phải trứng sán sẽ tạo thành các nang sán trong các cơ quan nội tạng quan như gan, phổi, thận, não... gây ra các triệu chứng rất nặng nề, có thể gây tử vong nếu không được can thiệp kịp thời (McManus và cs., 2003).

Bệnh lưu hành trên tất cả các châu lục của thế giới, đặc biệt ở một số khu vực Trung và Đông Á, châu Âu, Nam Mỹ, Bắc Phi, gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người và động vật và gây thiệt hại kinh tế cho người chăn nuôi (Jenkins và cs., 2005; Torgerson, 2003).

Sử dụng kính hiển vi quang học mô tả hình thái ký sinh trùng hiện vẫn là phương pháp phổ biến. Tuy nhiên loại kính này có giới hạn phân giải cao nên không quan sát được những vi cấu trúc. Kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope - SEM) có giới hạn phân giải thấp cho phép quan sát được các vi cấu trúc của mẫu vật, đã được ứng dụng trong định loài và quan sát hình thái ký sinh trùng dựa trên hình thái cơ thể, như, vị trí lỗ hậu môn, vòng gai,... (Grzebyk and Sako, 1998; Fernanda và cs., 2004).

Nghiên cứu hình thái sán giống *Echinococcus*, một số tác giả đã sử dụng SEM mô tả quá trình phát triển và kích thước móc bám của ấu trùng sán *Echinococcus granulosus* (Antoniou and Tselentis, 1993), quan sát sự biến đổi hình thái khi xử lý với thuốc trị sán (George và cs., 1981; Mirjam và cs., 2004). Tuy nhiên gần như chưa có nghiên cứu ứng dụng SEM mô tả chi tiết hình thái dạng sán trưởng thành.

Trong bài báo này, chúng tôi mô tả chi tiết các đặc điểm hình thái sán trưởng thành của sán *Echinococcus granulosus* dưới kính hiển vi điện tử quét góp phần bổ sung một số hiểu biết về hình thái sán trưởng thành này mà các tài liệu có được cho đến nay chưa hoặc còn ít đề cập. Đặc điểm hình thái chi tiết thu được sẽ làm cơ sở để so sánh và phát hiện điểm khác biệt giữa các loài dưới kính hiển vi điện tử quét, từ đó làm cơ sở cho việc phân loại các loài sán trong giống *Echinococcus* dựa vào hình thái sẽ trở nên chính xác hơn.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu và nguồn gốc mẫu

Mẫu sán sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Viện nghiên cứu Thú y và Động vật nuôi, Đại học Qinghai, Trung Quốc.

Mẫu sán là sán *Echinococcus granulosus* trưởng thành thu tại Qinghai, Trung Quốc.

Mẫu sán được thu từ ruột non của các loài chó nuôi, lưu giữ trong dung dịch formol 10% và bảo quản lạnh cho đến khi sử dụng.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

Quá trình xử lý mẫu và kết quả được tiến hành tại bộ môn Giải phẫu - Bệnh lý, Trường Đại học Miyazaki, Nhật Bản và Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu hình thái sán bằng kính hiển vi điện tử quét

Cho sán trưởng thành vào túi đựng mẫu (5 sán/túi). Sau đó tuân tự tiến hành các bước:

- Trước tiên, để giữ cấu trúc nguyên vẹn, mẫu được cố định đầu tiên bằng dung dịch glutaraldehyde 2,5% trong đệm phosphate 0,13M trong khoảng 3 - 5 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa lại mẫu bằng dung dịch đệm phosphate 0,13M một vài lần. Sau đó, mẫu được chuyển sang dung dịch osmium tetroxide (OsO_4) 1% khoảng 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Rửa lại mẫu bằng nước cất một vài lần. Tiếp theo, tiến hành loại nước khỏi mẫu thông qua các nồng độ ethanol 30%, 50%, 70%, 90% và sau cùng là acetone 80% và 100%. Mỗi nồng độ từ 5 - 7 giờ. Sau đó, loại acetone và làm khô mẫu tới điểm tới hạn bởi thiết bị làm khô sử dụng khí CO_2 dạng lỏng (Critical Point Drying) và gắn mẫu trên block kim loại chuyên dụng nhờ lớp keo DOTITE. Cuối cùng, mẫu được phủ nhuộm với muối kim loại nặng, palladium vàng,

trên máy phun bắn ion Hitachi E-1030 và tiến hành quan sát trên kính hiển vi điện tử quét S-4100M, Hitachi, Japan.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tiến hành quan sát 25 mẫu sán *Echinococcus granulosus* trưởng thành thu ở Qinghai qua kính hiển vi điện tử quét, kết quả cho thấy: cơ thể sán có 5 đốt (Hình 1), được chia thành hai phần chủ yếu là đầu sán và các đốt sán sinh sản. Hai phần này được kết nối với nhau bởi phần cổ nhỏ.

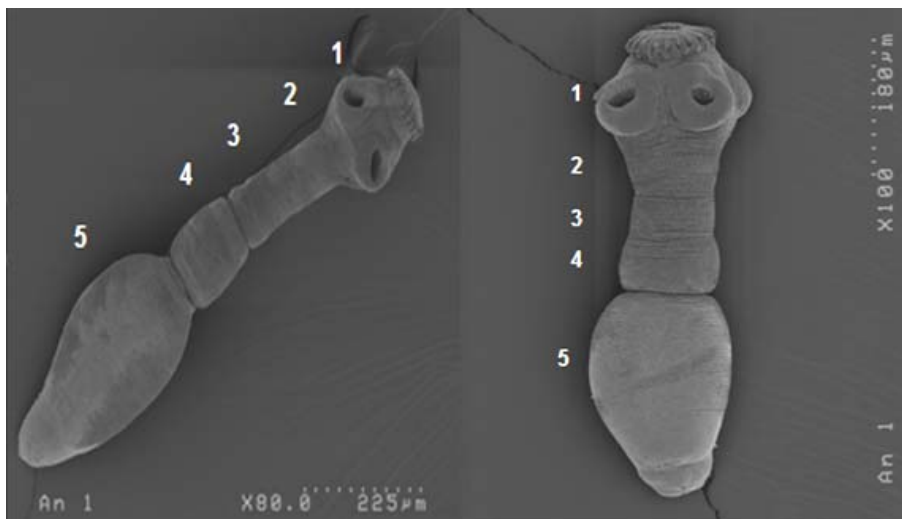
Đầu sán hình bầu dục mang 4 giác bám hình oval hay bầu dục. Trên giác bám không có móc bám. Đỉnh đầu có mồm nhô cao, trên mồm này có các móc bám cong nhỏ được xếp thành hai hàng so le nhau (Hình 2A và 2B).

Đốt cổ nối liền sau phần đầu của sán, lần lượt đến đốt chưa thành thực, đốt thành thực và cuối cùng là đốt già (đốt chữa).

Đốt già có chiều dài lớn hơn chiều rộng, đây là đốt dài và có kích thước lớn nhất, chiếm gần nửa chiều dài của sán. Lỗ sinh dục thông ra bên ngoài ở phần cuối của đốt già (Hình 3).

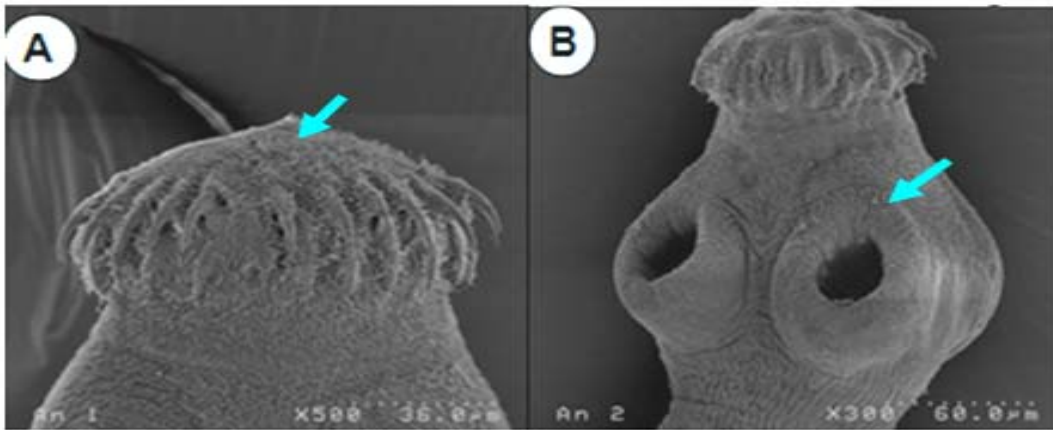
Toàn bộ cơ thể sán được bao phủ bởi hai loại lông khác nhau về hình thái. Lông bao phủ từ gốc mồm đến cuối cơ thể là loại lông dày, ngắn (dài khoảng 1 μ m), không kết nối với nhau ở tận cùng, được sắp xếp rất chặt chẽ và đều đặn trông giống như thảm cỏ (Hình 5C và D). Ngược lại, loại lông thứ hai bao phủ toàn bộ mồm sán mỏng và dài hơn, chúng được kết nối với nhau tạo thành các nút, điểm tại phần cuối của lông (Hình 4A và 4B). Loại lông này giống với hình thái của lông tơ được mô tả bởi Antoniou và Tselentis (1993) khi quan sát quá trình phát triển của ấu trùng sán từ các bọc sán thành dạng sán trưởng thành trong phòng thí nghiệm dưới kính hiển vi điện tử quét. Các tác giả cho rằng, loại lông tơ này có thể đóng vai trò như là bộ phận nhận cảm cho sán. Tuy nhiên, loại lông bao phủ trên bề mặt cơ thể sán quan sát được trong nghiên cứu này chưa từng được miêu tả ở sán trưởng thành. Chức năng của chúng cần được nghiên cứu thêm, chúng tôi cho rằng chúng có thể đóng vai trò giúp hấp thu chất dinh dưỡng qua bề mặt cơ thể sán, điều hòa hoạt động bài tiết, nhận cảm,... của sán.

Kết quả hình ảnh sán dưới kính hiển vi điện tử quét

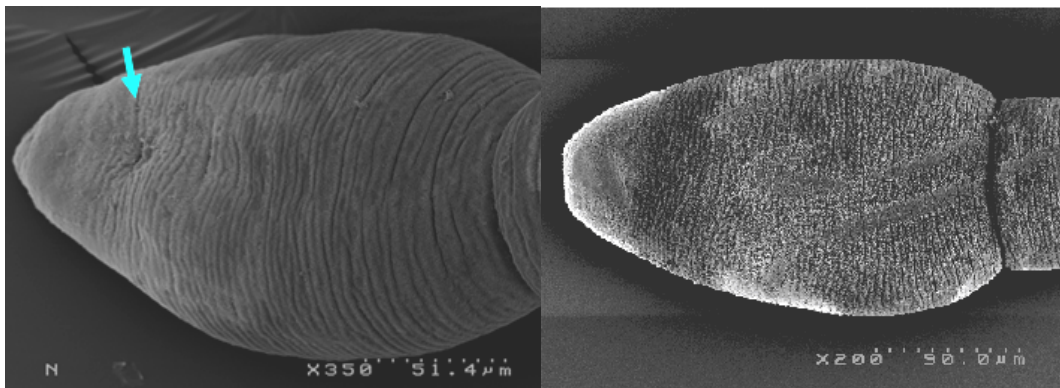


Hình 1. Sán trưởng thành với 5 đốt sán

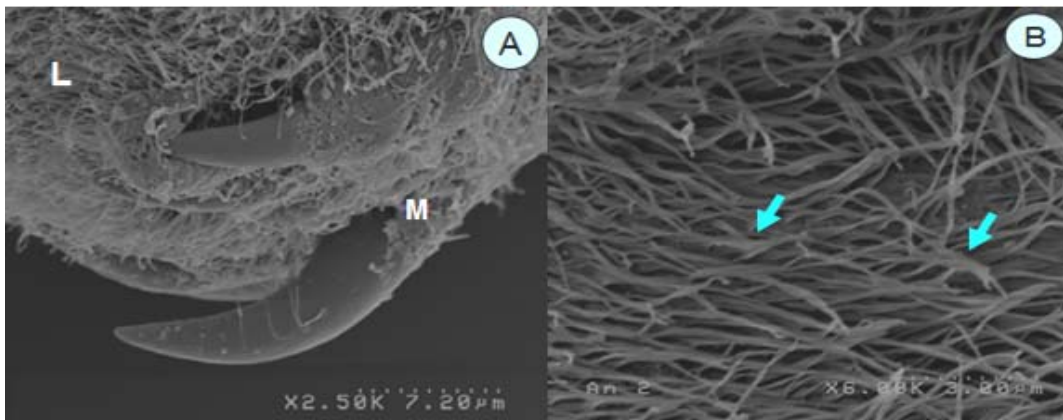
1- đầu sán; 2- đốt cổ; 3- đốt chưa thành thực; 4- đốt thành thực; 5- đốt già



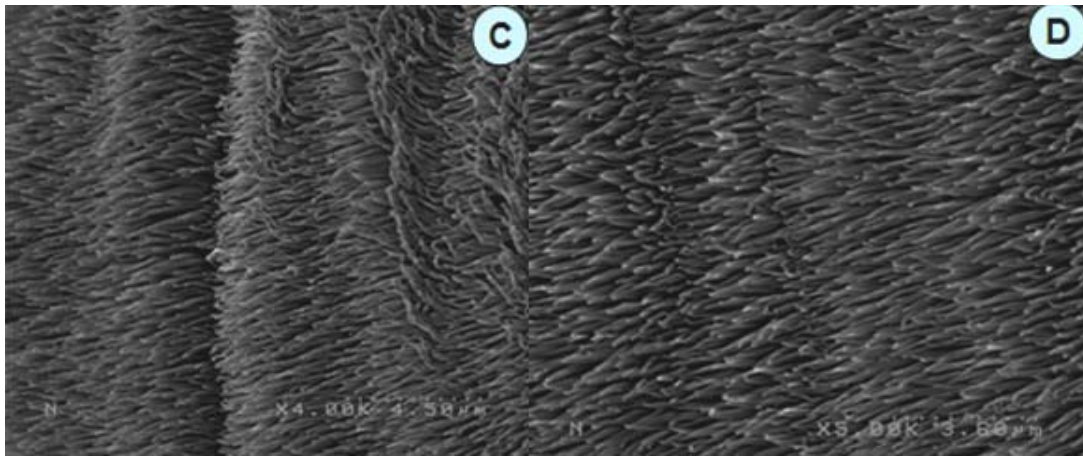
Hình 2. A. Mồm sán mang các móc bám nhỏ
B. Giác bám hình oval



Hình 3. Đốt già (Mũi tên: vị trí lỗ sinh dục thông ra ngoài cơ thể)



Hình 4. A. Lông tơ mồm (L), Móc bám (M); B. Lông tơ bao phủ phần mồm sán được phóng đại (Mũi tên: điểm giao nhau của các lông)



Hình 5. Lông tơ bao phủ trên bề mặt cơ thể với độ phóng đại khác nhau

Kết quả phân tích các mẫu sán thu được (Bảng 1) cho thấy, chiều dài cơ thể trung bình của sán đạt $1,03 \pm 0,18$ mm (mẫu nhỏ nhất là 0,8 mm và lớn nhất đạt 1,35 mm). Chiều dài đốt sán chứa là 0,33 - 0,62 mm (trung bình là $0,44 \pm 0,08$ mm), chiếm tỷ lệ 1/3 cơ thể sán.

Đầu sán có chiều dài là 0,06 - 0,22 mm ($0,13 \pm 0,03$ mm) và chiều rộng là 0,04 - 0,121 mm ($0,08 \pm 0,01$ mm). Đường kính giác bám đạt 16,2 - 35,4 μm ($27,20 \pm 5,51$ μm). Đường kính mõm sán 30,5 - 89,1 μm ($68,90 \pm 14,90$ μm) và có từ 20 - 32 móc cong nhỏ.

Qua bảng 1 cho thấy, kích thước sán trưởng thành nghiên cứu rất nhỏ, từ 0,8 - 1,35 mm. Theo Thompson và Lymbery (1988), kích thước sán *Echinococcus granulosus* quan sát dưới kính hiển vi quang học rất biến động từ 2,0 - 11,0 mm phụ thuộc vào từng giai đoạn phát triển của sán cũng như bị ảnh hưởng bởi các yếu tố ngoại cảnh khác như vùng địa lý, phản ứng của cơ thể vật chủ... Conchedda và cs. (2006) gây bệnh thí nghiệm trên chuột nhảy (*Meriones unguiculatus*) và quan sát toàn bộ quá trình xâm nhập, phát triển và sinh sản của sán.

Bảng 1. Một số đặc điểm hình thái chi tiết của sán *Echinococcus granulosus*

STT	Tính trạng	Kích thước	$\bar{X} \pm SD$	δ^2	Cv%
1	Đốt sán		5		
2	Chiều dài cơ thể (mm)	0,8 - 1,35	$1,03 \pm 0,18$	0,032	17,5
3	Chiều dài đốt chứa (mm)	0,33 - 0,62	$0,44 \pm 0,08$	0,006	18,2
4	Chiều dài đầu (mm)	0,06 - 0,22	$0,13 \pm 0,03$	0,001	23,08
5	Chiều rộng đầu (mm)	0,04 - 0,121	$0,08 \pm 0,01$	0,0001	12,5
6	Đường kính giác bám (μm)	16,2 - 35,4	$27,20 \pm 5,51$	30,36	20,26
7	Đường kính mõm (μm)	30,5 - 89,1	$68,90 \pm 14,90$	222,01	21,62
8	Móc bám		$25,04 \pm 3,37$	11,37	13,46

Chú thích: \bar{X} : giá trị trung bình; SD: Độ lệch chuẩn; δ^2 : Phương sai; Cv%: Hệ số biến động.

Các tác giả này đã chứng minh trong cơ thể vật chủ cuối cùng tồn tại nhiều giai đoạn phát triển khác nhau của sán, từ ấu trùng sau khi xâm nhiễm vào đường tiêu hóa sẽ phát triển, kích thước cơ thể tăng dần từ ~ 350 µm sau vài ngày gây nhiễm và đạt trên 3,2 mm lúc sán thành thực. Sự hình thành đầy đủ các đốt sán được quan sát tương đối sớm, ở ngày thứ 21 đến ngày thứ 27 trong quá trình phát triển. Do đó, chúng tôi cho rằng kích thước cơ thể sán kiểm tra trong nghiên cứu này nhỏ so với kích thước của loài *Echinococcus granulosus* đã công bố là do mẫu sán được thu ở giai đoạn non, đang phát triển nên kích thước chưa đạt tối đa, cần tiến hành thu thập thêm mẫu sán ở các giai đoạn phát triển sau. Số lượng móc bám của các mẫu sán nghiên cứu là 20 - 32 móc. So sánh với kết quả nghiên cứu của Hussain và cs. (2005) trên các sán trưởng thành thu từ trâu, bò, cừu, lạc đà, dê là 27 - 50 cho thấy, số lượng móc bám của mỗi sán biến thiên tương đối lớn, có sự biến đổi giữa các loài vật chủ khác nhau. Đặc điểm này cần được chú ý trong phân loại.

Kính hiển vi điện tử quét giới hạn phân giải thấp có thể quan sát được các vi cấu trúc và thu được hình ảnh rất rõ nét nên đã có nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng để phân loại và nhận diện loài dựa trên các sai khác cấu trúc chi tiết như hình thái cơ thể, nhú, vị trí lỗ hậu môn, vòng gai,... (Grzebyk and Sako, 1998; Fernanda và cs., 2004). Tuy nhiên, việc sử dụng kính này để phân loại các loài sán trưởng thành giống *Echinococcus* vẫn còn ít được đề cập. Do sự hạn chế về mặt kỹ thuật, trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa mô tả được các đặc điểm cấu tạo bên trong cơ thể sán như cấu tạo hệ thống cơ quan sinh dục sán, số lượng tinh hoàn,... và xác định kích thước của móc bám, những đặc điểm này đã được sử dụng phổ biến trong phân loại giữa các loài ký sinh trùng khác nhau và giữa các loài trong giống *Echinococcus* mà các công

trình nghiên cứu trước đã sử dụng. Những kết quả hình thái bên ngoài được miêu tả trong nghiên cứu này bổ sung hiểu biết về hình thái sán trưởng thành *Echinococcus granulosus*. Do vậy các nghiên cứu trong tương lai cần quan sát hình thái bên ngoài và bên trong của các sán trưởng thành còn lại trong giống để làm cơ sở so sánh và xác định loài ký sinh trùng nguy hiểm này.

Giống *Echinococcus* là một giống lớn, được phân loại dựa trên phương pháp kiểm tra các đặc tính hình thái học, còn gặp rất nhiều hạn chế như các mẫu sinh vật được thu có thể đang ở giai đoạn phát triển khác nhau, không thể xác định chính xác những sinh vật có hình thái bên ngoài tương đối giống nhau nhưng lại có những đặc điểm về di truyền và sinh học khác nhau. Hơn nữa không có nghiên cứu nào đánh giá được mức độ biến đổi đặc điểm hình thái của cùng một loài nhưng ở vùng địa lý hay các vật chủ khác nhau, cũng như việc áp dụng các biện pháp kiểm tra khác nhau. Những hạn chế đó đã dẫn đến nhiều nhầm lẫn trong việc phân loại loài sinh vật này (Kumaratilake and Thompson, 1928; Thompson and Lymbery, 1988). Để kết quả phân loại sán chính xác, các nghiên cứu cần phải kết hợp với việc phân tích các đặc tính sinh học phân tử của chúng, bởi vì hệ gen của sinh vật có tính ổn định tương đối cao, ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường, đồng thời có thể tiến hành phân tích mẫu vật ở bất kỳ giai đoạn nào trong chu kỳ sống từ trứng đến trưởng thành.

Ở Việt Nam, bệnh do các loài giun sán là bệnh rất phổ biến ở đàn chó và các gia súc ăn thịt. Một số loài sán dây gây hại cho chó cũng là tác nhân gây bệnh cho người và một số loài thú khác. Rất nhiều tác giả đã quan tâm điều tra và nghiên cứu về bệnh giun sán trên chó. Cho đến nay đã có 8 loài sán dây phổ biến đã được xác định: *Diphyllobothrium mansonii*, *Diphyllobothrium reptans*, *Dipylidium caninum*, *Taenia hydatigena*,

Taenia pisiformis, *Multiceps multiceps*, *Echinococcus granulosus*, *MEsocestoides lincolus* (Quế Anh, 2008). Tuy nhiên hầu như chưa có các thông tin dịch tễ về dịch bệnh trên người cũng như trên các loài gia súc. Tháng 8 năm 2007 tại Bệnh viện Lao và bệnh phổi Trung ương đã ghi nhận một trường hợp bệnh nhân nam giới mắc bệnh do ấu trùng loài *Echinococcus granulosus* gây ra (Ngô Thế Quân và cs., 2007). Điều này cho thấy, loài sán này đang hiện diện ở Việt Nam. Do đó cần có những điều tra cụ thể để biết được sự tồn tại và phân bố của loài sán dây nguy hiểm này từ đó thực hiện các biện pháp phòng chống bệnh cho cộng đồng và cho đàn gia súc.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng kính hiển vi điện tử quét chúng tôi đã mô tả được một số đặc điểm hình thái chi tiết của sán trưởng thành *Echinococcus granulosus*. Sán trưởng thành gồm 5 đốt, kích thước toàn cơ thể 0,8 - 1,35 mm. Chiều dài đầu sán 0,06 - 0,22 mm và chiều rộng là 0,04 - 0,121 mm. Đường kính mõm 30,5 - 89,1 μ m và có 20 - 32 móc bám. Chiều dài đốt chứa 0,33 - 0,62 mm. Đầu sán được bao phủ bởi lông tơ mõm, mảnh, dài và kết nối với nhau. Phần thân sán được bao phủ bởi lông tơ thân, dày, ngắn hơn, sắp xếp chặt chẽ và đều đặn và không nối với nhau. Lông tơ bao phủ phần cơ thể sán được mô tả lần đầu tiên trong nghiên cứu này. Sán trưởng thành được quan sát còn non nên kích thước cơ thể nhỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Antoniou M., Y. Tselentis (1993). Studies on *Echinococcus granulosus* using the scanning electron microscope. *Parasitol Res* 79:537-546.

Fernanda P. B., C.M.W. Renata, T. Tiana, A.D.C. Geraldo (2004). Scanning electron microscopy study of *Trichostrongylus axei*. *Parasitol Res* 94:158-161.

George A. Conder, Alan A. Marchiondo, and Ferron L. Andersen (1981). Effect of Praziquantel on Adult *Echinococcus granulosus* In Vitro: Scanning Electron Microscopy. *Z Parasitenkunde* 66: 191-199.

Grzebyk D. and Y. Sako (1998). Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal ADN sequences, Morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. *Nov.* *J. Phycol* 34: 1055-1068.

Husain A., A. Maqbool, A. Tanveer and A. Anees (2005). Studies on morphology of *Echinococcus granulosus* from different animal-dog origin. *Punjab Univ. J. Zool* 20(2): 151-157.

McManus, D.P., W. Zhang, J. Li, P.B. Bartley (2003). *Echinococcosis*. *Lancet* 362, 1295 -1304.

Mirjam W., F. Jean, R. Paul, H. Andrew (2004). In vitro effects of nitazoxanide on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(3):609 -616.

Jenkins D.J., T. Romig, C.A. Thompson (2005). Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp. - a global update. *International Journal for Parasitology* 35: 1205-1219.

Thompson, R.C.A. and A.J. Lymbery (1988). The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology* 27: 210-263.

Torgerson P. R. (2003). Economic effects of *Echinococcosis*. *Acta Tropical* 85:113-118.

Quế Anh (2008). Bệnh sán dây ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. <http://tuyenquangkhcn.org.vn>. Cập nhật 22/4/2008.

Ngô Thế Quân (2007). Ấu trùng sán chó gây bệnh kén nước ở phổi - Lần đầu tiên được phát hiện ở Việt Nam. <http://www.bvlaobp.org>. Cập nhật 11/2/2007.