



## XÁC ĐỊNH MÀM BỆNH VI BÀO TỬ TRÙNG (*Microsporidia*) NHIỄM TRONG CƠ CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 12/08/2015

Ngày chấp nhận: 26/02/2016

### Title:

Identification of  
*Microsporidia* pathogen  
infected in muscle of catfish  
(*Pangasianodon*  
*hypophthalmus*)

### Từ khóa:

Bào nang, cơ cá tra,  
*Kabatana*, *Microsporidia*

### Keywords:

Cyst, muscle of catfish,  
*Kabatana*, *Microsporidia*

### ABSTRACT

This study was carried out to determine the species composition and infection intensity with microsporidia spores infected in the fry, the fingerling and commercial size of catfish. 473 microsporidia-positive samples were recorded from 578 fish samples collected in An Giang, Can Tho and Vinh Long provinces from April 2013 to November 2014. Fry and fingerling stages had higher infection rates than commercial period. Infection prevalence was 93.3% in the fry stage, 70-96.6% in fingerlings and 40-73.3% in commercial size fish. The infection intensity in fry ranged from 2-14 cysts/fish, 1-119 cyst/fish in fingerling and 1-83 cysts/fish in commercial fish. Histological determination of infected fish muscle showed structure loss and necrotic, the tissues of fish were lysed completely by *Mirosporidia* spores. PCR analysis of fish muscle infected with spores showed the amplification product at the size of 1100 bp. Results of identification by morphological observation together sequenced technique confirmed the infected mirosporidia belonged to *Kabatana* genus.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định thành phần loài và mức độ nhiễm vi bào tử trùng *Microsporidia* nhiễm trong cơ cá tra ở giai đoạn cá hương, cá giống và cá nuôi thương phẩm (cá thịt). Kết quả khảo sát 578 mẫu cá tra thu từ các ao nhiễm bệnh gạo ở An Giang, Cần Thơ và Vĩnh Long từ tháng 4/2013 đến 11/2014 đã ghi nhận 473 mẫu cá nhiễm *Microsporidia*. Giai đoạn cá hương và cá giống có tỷ lệ nhiễm bệnh cao hơn giai đoạn cá thịt. Tỷ lệ nhiễm trong ao cá hương chiếm 93,3%, ao cá giống có tỉ lệ nhiễm 70-96,6%, ao cá thịt nhiễm từ 40-73,3%. Cường độ nhiễm ở cá hương dao động từ 2-14 bào nang/cá, ở cá giống từ 1-160 bào nang/cá và cá thịt từ 1-83 bào nang/cá. Kết quả mô học xác định 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 *Mirosporidia* ly giải hoàn toàn. Phân tích PCR mẫu cơ cá tra bệnh gạo cho thấy vi bào tử trùng nhiễm trong cơ với vạch sản phẩm khuếch đại có kích thước là 1100 bp. Kết quả định danh bằng quan sát hình thái kết hợp giải trình tự gen xác định vi bào tử trùng thuộc giống *Kabatana*.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Xác định mầm bệnh vi bào tử trùng (*Microsporidia*) nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 42b: 101-110.

## 1 GIỚI THIỆU

Cá tra (*P. hypophthalmus*) là một trong những đối tượng thủy sản được nuôi phổ biến và có giá trị kinh tế ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Quá trình nuôi cá tra cũng thường xuyên gặp trở ngại về bệnh. Trong đó, vi bào tử trùng *Microsporidia* có thể gây thiệt hại về kinh tế cho nghề nuôi cá tra. Thực tế cho thấy bệnh do vi bào tử trùng nhiễm trong cơ cá tra ở dạng bào nang hình tròn hoặc bầu dục, màu trắng sữa nên còn được gọi là bệnh “gạo”. Bệnh không làm cho cá chết nhưng làm cá gầy yếu, giảm giá trị thương phẩm và sản phẩm thịt cá không tiêu thụ được.

Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy bệnh gạo thường xuất hiện trong các ao nuôi cá tra từ giai đoạn cá giống đến giai đoạn nuôi cá thịt, bệnh gạo xuất hiện quanh năm, không theo mùa vụ (Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011). Kết quả nghiên cứu của một số tác giả nước ngoài ghi nhận vi bào tử trùng *Microsporidia* ký sinh trong tổ chức cơ quan của cá thường có dạng bào nang màu trắng sữa. Một số loài có khả năng kích thích làm tế bào nhiễm bệnh trương to. Lúc cá nhiễm nặng có thể nhìn thấy rõ các bào nang rất lớn trên thân cá (Lom and Dykova, 1992; Keeling and Slamovits, 2004; Rodriguez-Tovar, 2004). Hiện nay, các phương pháp thường được sử dụng như soi tươi, nhuộm mẫu, cắt mô cũng được thực hiện để chẩn đoán nhanh cá bị nhiễm vi bào tử trùng *Microsporidia* (Woo, 2006; Anane and Attouchi, 2010). Bên cạnh đó, phương pháp realtime PCR và multiplex PCR cũng đang được ứng dụng rộng rãi để phát hiện *Microsporidia* nhiễm trên cá (Castillon *et al.*, 2000; Sokolova *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2005; Ghost and Weiss, 2009).

Hiện nay, chưa có nhiều nghiên cứu về đặc điểm bệnh học của vi bào tử trùng gây bệnh gạo trên cá tra nuôi ở ĐBSCL. Vì vậy, nghiên cứu “Xác định mầm bệnh vi bào tử trùng (*Microsporidia*) nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là cần thiết để làm tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn về bệnh gạo trên cá tra.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương pháp thu và bảo quản mẫu

Thu mẫu được tiến hành từ tháng 4/2013 đến tháng 11/2014 tại 3 tỉnh An Giang (AG), Cần Thơ (CT) và Vĩnh Long (VL). Mỗi địa điểm thu 5 ao cá giống, 2-3 ao cá thịt. Chọn các ao cá nhiễm bệnh gạo, thu ngẫu nhiên 30 con/ao cá giống và 15

con/ao cá thịt. Riêng ở Cần Thơ thu 1 ao cá hương nhiễm gạo. Thu mẫu cá còn sống hoặc vừa mới chết, tiến hành tách (phi lê) cơ cá, dùng dao cắt phần cơ bị nhiễm bào nang gạo cho vào dung dịch Formol trung tính 10%, sau 24 giờ tiến hành rửa mẫu cho đến hết formol thì chuyển sang trữ trong cồn 70% cho đến khi phân tích mô học. Trên cùng mẫu cá bệnh, một số phần cơ khác có bào nang gạo và không có bào nang gạo được trữ trong ethanol 100% để chiết tách DNA dùng cho phân tích PCR.

### 2.2 Phương pháp phân tích mẫu

#### 2.2.1 Soi tươi và nhuộm mẫu

**Soi tươi:** Mẫu cá trước khi phân tích được cân trọng lượng và đo chiều dài. Tiến hành phi lê phần cơ của cá, dùng đĩa petri ép mẫu cơ cá và quan sát mẫu dưới ánh sáng đèn neon hoặc ánh sáng mặt trời để tìm các túi bào nang màu trắng sữa lẫn trong cơ cá. Thu bào nang bằng cách loại bỏ các phần cơ xung quanh bào nang, sau đó để lên lame sạch, dùng kim mũi giáo chọc thủng bào nang. Ép tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi quang học ở các độ phóng đại 10X, 40X, 100X.

**Nhuộm mẫu:** Phết mẫu bào nang gạo, để khô tiêu bản ở nhiệt độ phòng. Nhuộm Giemsa tiêu bản mẫu theo phương pháp Garcia (2002).

**Định danh:** Theo khóa phân loại của Lom and Dykova (1992); Lom and Dykova (2005), Woo (2006) và Barber *et al.* (2009).

Xác định tỉ lệ nhiễm và cường độ nhiễm: Theo Margollis *et al.* (1982)

$TLN (\%) = \left[ \frac{\text{tổng số cá nhiễm bệnh}}{\text{tổng số cá kiểm tra}} \times 100 \right]$

$CĐN = \text{số bào nang/cơ cá.}$

#### 2.2.2 Phân tích mô học

Các mẫu cơ cá nhiễm bào nang trữ trong cồn 70% sẽ được xử lý qua 3 giai đoạn: loại nước, làm trong mẫu, tẩm paraffin. Sau đó mẫu được đúc khối và cắt với độ dày từ 5-7 $\mu$ m rồi nhuộm theo phương pháp Mayer's với Hematoxyline & Eosin và nhuộm Giemsa (Robert, 1989). Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi lần lượt ở độ phóng đại 10X, 40X và 100X và chụp hình tiêu bản đặc trưng.

#### 2.2.3 Phân tích PCR (Taggart *et al.*, 1992)

**Chiết tách DNA:** Phần cơ cá nhiễm từ 1-2 bào nang được cho vào ống eppendorf và nghiền nhuyễn với 600  $\mu$ l lysis buffer (0,5 M NaCl; 0,001 EDTA; 1% SDS; 0,8 Triton; 0,1 M Tris-HCL, 40  $\mu$ l SDS 10% và 2,5  $\mu$ l Proteinase K (40 mg/ml).

Đảo ống 25 lần. Ủ mẫu 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó cho vào 2,5 µl RNase (2 mg/ml). Đảo ngược ống 25 lần. Ủ dung dịch ở 37°C trong 30 phút. Phần dung dịch này được cho tác dụng với Chloroform-Isoamyl (24:1), Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1), Isopropanol lạnh, cồn 70% lạnh qua nhiều công đoạn tiếp theo. Sau quá trình ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút ở công đoạn cuối cùng, thì rút bỏ phần dịch trong và thu được phần kết tủa bên dưới là DNA của mẫu. Phơi ống vài giờ ở nhiệt độ phòng rồi cho 50 µl TE buffer (10 mM Tris, 1 mM 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. Hàm lượng DNA được tính theo công thức:

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

Phương pháp PCR: Mỗi phản ứng PCR gồm: 49 µl PCR master mix (Dung dịch đệm IX, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 100µM, Taq DNA polymerase 1,25 U, Mỗi HG4F 0,1µM (5'-CGGCTTAATTTGACTCAAC-3') và mỗi HG4R 0,1µM (5'-TCTCCTTGGTCCGTGTTCAA-3') (Gatehouse and Malone, 1998), 1 µl DNA từ mẫu cá. Phản ứng PCR kèm theo 2 phản ứng đối chứng (đối chứng dương: mẫu dương tính đối với *Misrosporidia* sp, đối chứng âm: mẫu âm tính đối với *Misrosporidia* sp). Hàm lượng DNA để thực hiện phản ứng PCR của đề tài là 500 µg/ml. Điều kiện phản ứng gồm (1) Bước 1 (một chu kỳ): 94°C trong 5 phút; (2) Bước 2 (35 chu kỳ): 94°C trong 1 phút, 50°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút, lặp lại chu kỳ trên 35 lần; (3) Bước 3 (1 chu kỳ): 72°C trong 10 phút. Quá trình điện di được thực hiện với dung dịch TAE 0,5 X 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. Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel Biorad. Căn cứ vào thang DNA 100 bp hoặc 1 kb plus để xác định trọng lượng phân tử của đoạn DNA đã khuếch đại. Mẫu hiện vạch tương ứng với vạch 1100 bp thì mẫu dương tính với *Misrosporidia* sp.

#### 2.2.4 Phương pháp giải trình tự

Sản phẩm PCR của vi bào tử trùng *Microsporidia* được gửi đến Công ty sinh học Nam Khoa để giải trình tự DNA trực tiếp thông qua hệ thống giải trình tự mao quản tự động (CEQ 8000, Beckman Coulter).

Phương pháp so sánh các trình tự: DNA của *Microsporidia* sau khi giải trình tự được so sánh với trình tự DNA của các loài *Microsporidia* đã được định danh trên ngân hàng gen, bằng chương trình BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

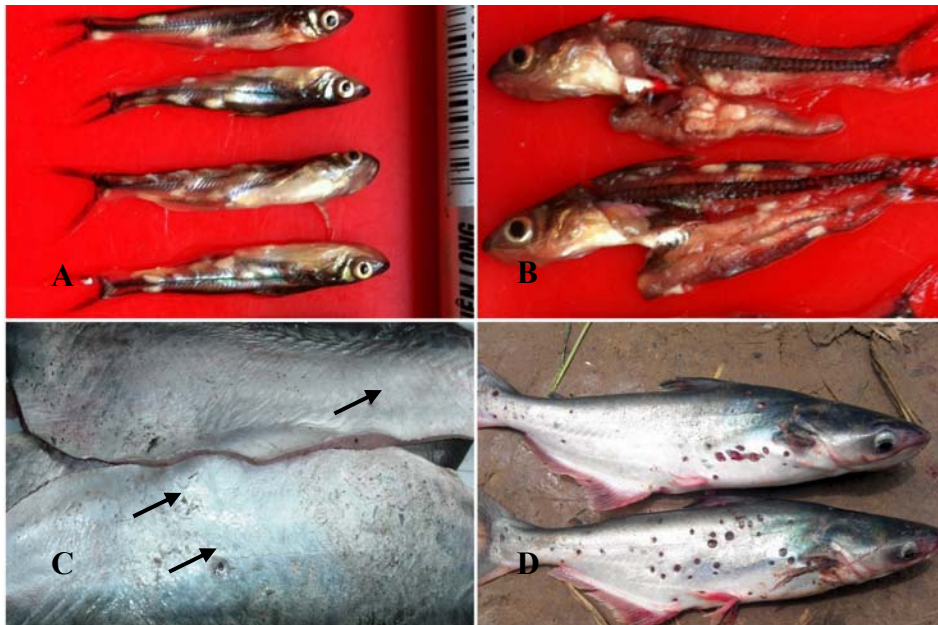
### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Dấu hiệu bệnh lý

Quan sát dấu hiệu lâm sàng của 578 mẫu cá tra thấy có sự khác biệt giữa 3 nhóm cá hương (30 mẫu), cá giống (428 mẫu) và cá thịt (120 mẫu). Cơ thịt cá ở giai đoạn cá hương có kích thước nhỏ, trong suốt nên có thể nhìn thấy rõ các bào nang gạo màu trắng sữa rất to ký sinh bên trong (Hình 1A). Khi tách lớp cơ, các bào nang có lớp màng bao khá ổn định, không bị vỡ (Hình 1B). Giai đoạn cá giống và cá thịt nhiễm vi bào tử trùng, một số trường hợp trên da cá xuất hiện những vết nhỏ li ti (Hình 1C), hoặc có một vài đến rất nhiều vết hoại tử tròn lõm sâu vào trong cơ của cá.

Sau khi tách phần cơ của cá, hầu hết các bào nang tồn tại trong cơ dưới dạng những túi tròn hoặc hình thoi hoặc những vết dài, bên trong chứa chất lỏng màu trắng sữa, đôi khi có màu hơi vàng, với đường kính bào nang từ 2-9 mm. Đặc biệt, ở một số mẫu cá nhiễm bào nang bệnh gạo nặng, các bào nang hình hạt gạo này từ màu trắng sữa sẽ chuyển sang màu nâu hoặc ở giữa bào nang gạo có chấm màu đen nhỏ, sau đó màu đen lan rộng dần hết bào nang. Các bào nang thường có xu hướng tập trung nhiều ở phần cơ gần lớp da của cá.

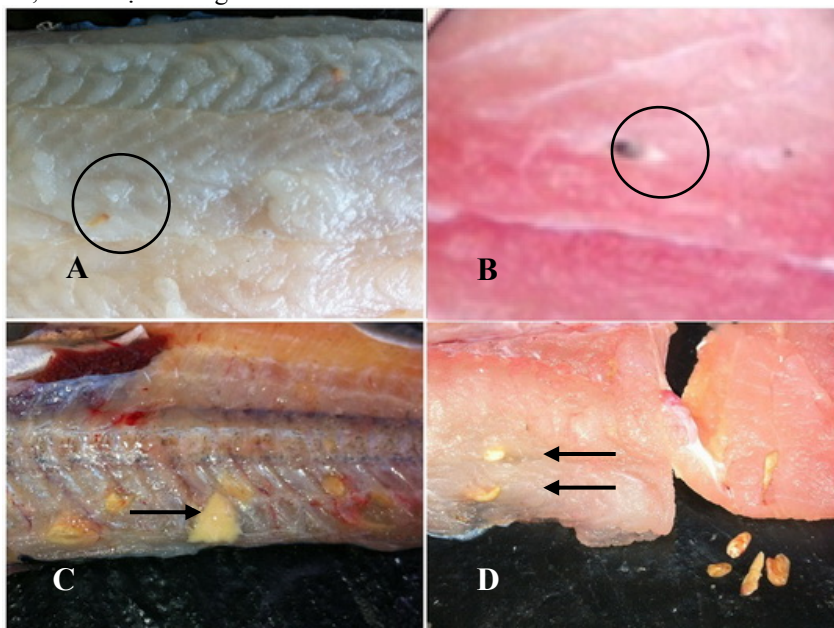
Ở những ao cá thịt nhiễm vi bào tử trùng *Microsporidia* trong thời gian dài, các bào nang gạo chuyển sang màu vàng, đông vón lại và vẫn nằm trong cơ cá. Các bào nang này có thể được tách ra khỏi phần cơ của cá. Hoặc những mẫu cá bị dị hình cũng nhiễm vi bào tử trùng *Microsporidia*.



**Hình 1: A&B: cá hương nhiễm gao; C&D: Cá thịt nhiễm gao có nhiều lỗ thủng trên da**

Kết quả quan sát dấu hiệu bệnh lý về cá tra bệnh gao Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011, 2012), các mẫu nhiễm gao thu từ thời điểm tháng 4/2013 đến tháng 11/2014 có những dấu hiệu đặc trưng hơn như trên da cá có nhiều thương tổn, xuất hiện những lỗ tròn từ nhỏ

đến rất to (không phải là dấu hiệu lở loét) kèm xuất huyết, bên trong bào nang gao (kích cỡ 2-9 mm) là chất dịch đặc có màu trắng sữa hoặc hơi vàng kem. Một số bào nang có vết màu vàng, sau chuyển dần sang màu đen.



**Hình 2: A: Cá thịt nhiễm gao nâu; B: Cá thịt nhiễm gao đen; C&D: Cá thịt nhiễm gao, gao bị xơ cứng thành mảng**

### 3.2 Ti lệ nhiễm và cường độ nhiễm

Bằng phương pháp soi tươi, kết quả phân tích 578 mẫu cá ở Cần Thơ, An Giang và Vĩnh Long đã phát hiện 473 mẫu nhiễm vi bào tử trùng *Microsporidia*. Trong đó, kiểm tra 30 mẫu cá hương thu ở Cần Thơ cho thấy có đến 28 mẫu nhiễm bào nang gạo, tỉ lệ nhiễm chiếm 93,3%, cường độ nhiễm dao động từ 2-14 bào nang/cá.

Ở cả 3 tỉnh, mẫu cá giống luôn có tỉ lệ nhiễm và cường độ nhiễm cao hơn cá thịt. Tỉ lệ nhiễm trên cá giống ở Cần Thơ từ 70-83,3%, cường độ nhiễm dao động từ 1-181 bào nang/cá, cá giống ở An Giang có tỉ lệ nhiễm khá cao, chiếm từ 86,6-96,6% và cường độ nhiễm từ 1-160 bào nang/cá. Mẫu cá ở Vĩnh Long có tỉ lệ nhiễm 73,3-93,3% và cường độ nhiễm từ 1-83 bào nang/cá. Đối với cá thịt, tỉ lệ nhiễm trên mẫu ở Cần Thơ từ 66,6-80%, cường độ nhiễm từ 1-70 bào nang/cá. Tỉ lệ nhiễm trên mẫu cá ở An Giang chiếm từ 46,6-86,6% và cường độ nhiễm từ 1-44 bào nang/cá. Mẫu cá ở Vĩnh Long có tỉ lệ nhiễm từ 40-73,3% và cường độ nhiễm từ 1-76 bào nang/cá.

Nhìn chung, tỉ lệ nhiễm ở các ao cá giống dao động từ 70-96,6% 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. Không có sự khác biệt mức độ nhiễm gạo theo vùng nuôi ở An Giang, Cần Thơ và Vĩnh Long. 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

**Bảng 1: Đặc điểm mô học của các tiêu bản**

| Tỉnh      | Giai đoạn | Số mẫu | Số mẫu cắt mô | Đặc điểm mô học  |
|-----------|-----------|--------|---------------|--|
| Cần Thơ   | 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                                      |
| Vĩnh Long | 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                                      |
| An Giang  | 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  |
| Tổng      |           | 195    | 65            |  |

Tiêu bản mô ở Hình 3B, C cho thấy màng bào nang gồm một lớp mô liên kết khá dày, màng bảo vệ các bào tử *Microsporidia* bên trong và kết nối với các bó cơ để giữ vững chắc bào nang. Khi nhuộm mẫu cơ với H&E thì các bào tử sẽ bắt màu tím của Haematoxyline. Vì vậy, ở giai đoạn bào

nhien mà chỉ tập trung thu mẫu ở những ao đã nhiễm bệnh gạo, vì vậy mức độ nhiễm cao hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011). Theo đó, nghiên cứu này ghi nhận tỷ lệ nhiễm chỉ dao động từ 40-85,7% và cường độ nhiễm từ 0-9 bào nang/cá.

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 nang gạo. Tuy nhiên, đề tài chọn ngẫu nhiên 65 mẫu cơ cá giống và cá thịt theo tỉ lệ mẫu thu được và tiến hành cắt mô. Đặc điểm mô học được trình bày trong Bảng 2.

Quan sát tiêu bản mô Hình 3A 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, vi 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. Ngoài ra, ở giai đoạn khởi phát này không quan sát thấy sự xuất hiện các đại thực bào trong hệ thống miễn dịch tự nhiên của cá. 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 từ bên ngoài.

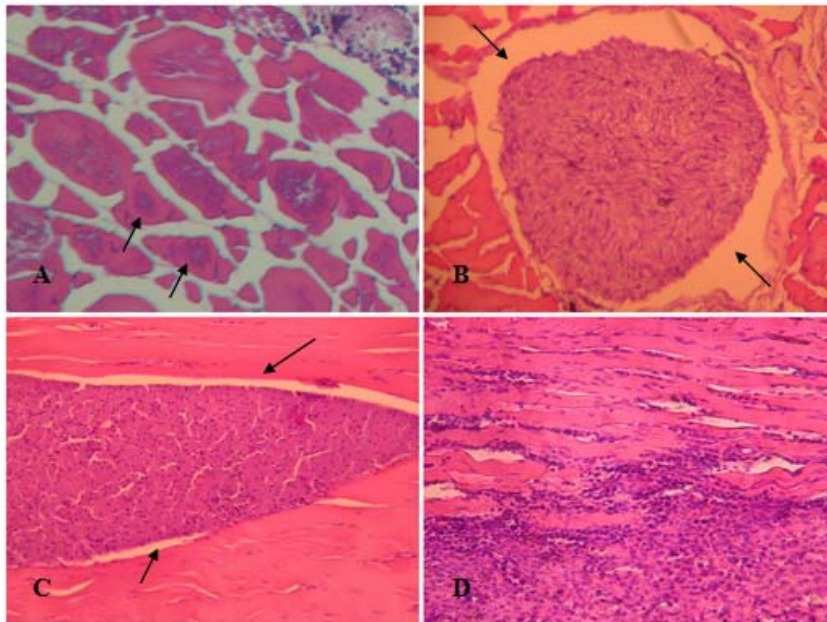
nang, các vi bào tử *Microsporidia* rất khó bị tiêu diệt.

Kết quả ghi nhận sự biến đổi cấu trúc mô học của đề tài khá tương đồng với kết quả của nhiều nghiên cứu trước đây trên các loài cá nhiễm *Microsporidia* (Shaw and Kent, 1999). Các tiêu bản mô cơ cho thấy các bào tử hình thành bên trong tế

bào cơ, 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. Sợi cơ bị phá hủy nghiêm trọng trong một thời gian dài trước khi tất cả các tế bào chất của tế bào trong các sợi cơ bị phân giải. Ở giai đoạn cuối cùng, cấu trúc bên trong sợi cơ được thay thế bằng các bào tử và được bảo vệ bởi chính màng sợi cơ đó.

Kết quả nghiên cứu đặc điểm mô bệnh học của cá *Pangasius sutchi* ở Thái Lan nhiễm *Kabatana*

*arthuri* cho thấy các bào tử *K. arthuri* gây ra những thay đổi thoái hóa nghiêm trọng trong các bó cơ xung quanh thân cá (Dykova and Lom, 2000). Theo kết quả nghiên cứu của Joh et al., (2007) trên loài cá chình *Anguilla japonica* ở Hàn Quốc nhiễm *Heterosporis anguillarum* đã ghi nhận sự xuất hiện các bào nang tiên khởi trong các sợi cơ ở giai đoạn đầu của quá trình nhiễm bệnh. Bên cạnh đó, quá trình ly giải các sợi cơ, sự xuất hiện các bào nang tiên khởi với kích thước và hình dạng khác nhau cũng được ghi nhận bên trong các bó cơ.



**Hình 3: Tiêu bản cắt mô cơ cá tra nhiễm bào nang gạo (20X)**

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

### 3.3 Kết quả định danh vi bào tử trùng

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. 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 40X nhận thấy phần cực nang của các bào tử bắt màu xanh của thuốc nhuộm Giemsa.

**Bảng 2: 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  | 2-9 mm                                      |

Nhìn chung, qua kết quả soi tươi, dựa vào khóa phân loại và mô tả của Lom and 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. Theo Lom *et al.* (2001), Dykova and Lom (2000), *Kabatana* sp. nội ký sinh trong các mô cơ vân, cơ trơn của cá, có kích thước nhỏ nhất trong nhóm vi bào tử trùng, dao động từ 2x3 µm. 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 mm bên trong các sợi cơ của cá (Sprague, 1992; Lom and Nilsen, 2003).

**3.4 Kết quả phân tích PCR và giải trình tự gen**

Mười hai mẫu cơ cá tra (gồm cá hương, cá giống và cá thịt) có nhiễm và không nhiễm bào nang gạo được chọn ngẫu nhiên để phân tích PCR (Bảng 4).

**Bảng 3: 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) |
| Tổng      |           | 12         |           |  |

Mẫu được chiết tách DNA và phân tích PCR sử dụng môi 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 5) cho thấy 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 1100 bp khá mờ, điều này cho thấy có lẽ 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 có thể các mẫu cơ này 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.

Theo kết quả nghiên cứu của một số tác giả ngoài nước, phương pháp PCR đã được ứng dụng

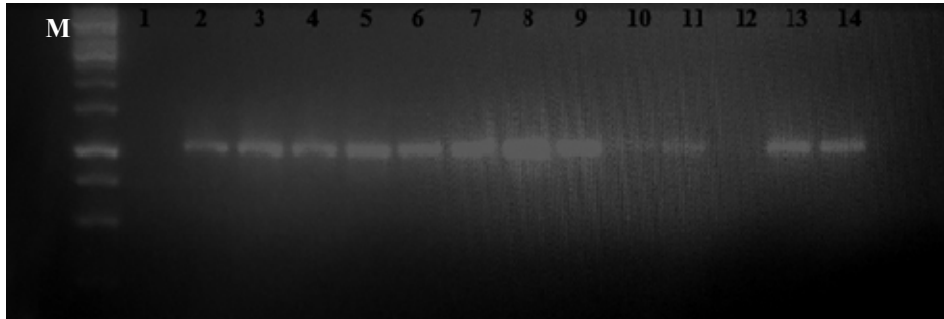
để phát hiện mầm bệnh *Microsporidia* nhiễm trên cá nuôi ở giai đoạn sớm để có biện pháp phòng trị hiệu quả hơn. Kết quả nghiên cứu của Castillon *et al.* (2000) đã sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện 3 loài vi bào tử trùng *Glugea anomala*, *G. stephani*, *G. americanus*. Ngoài ra, realtime PCR và multiplex PCR cũng đạt nhiều kết quả khả thi trong phát hiện các loài vi bào tử trùng *Microsporidia* thuộc giống *Thelohania*, *Enterocytozoon* và *Encephalitozoon* từ các mẫu tươi hoặc mẫu đã qua xử lý formol (Dowd *et al.*, 1998; Sokolova *et al.*, 2004; Ghost and Weiss, 2009).

Thông qua kết quả PCR từ đề tài, có thể thấy được khả năng ứng 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. 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.

Để xác định chính xác thành phần giống loài vi bào tử trùng ký sinh trong bào nang gạo của cá tra, từ kết quả điện di đề tài chọn 5 mẫu đã khuếch đại PCR thể hiện vạch tương đối rõ ràng ở 1100 bp (Giếng 3, 5, 8, 9, 13) để giải trình tự sản phẩm PCR. 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% (836/997 base) so với trình tự gen của giống *Kabatana*, với số đăng ký trên ngân

hàng gen quốc tế là FJ843105.1 (Casal *et al.*, 2010) (Hình 5). Do kết quả giải trình tự nucleotide của các mẫu thấp nên không thể xác định chính xác đến

mức độ loài. Tuy nhiên, theo kết quả so sánh có thể nhận thấy vi bào tử trùng *Microsporidia* phân lập từ cá bệnh gạo là *Kabatana* sp.



**Hình 4: Kết quả điện di qui trình 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

Kabatana sp. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gb|FJ843105.1](#) Identities 836/997 (84%)

```

Query 1 ATAGTCCAATGATCAAGTAAGCCTAGTACCGGATAGATCAGAGAGTGGTGCATGGCGTT 60
Sbjct 935 ATAG-CCAATGATCAAGTAAGCCTAGTACCGGATAGATCAGAGAGTGGTGCATGGCGTT 993
Query 61 ATCAACTAGTGAGGTGACTTTTGGGTTAAATCCGTTAAGTAGTGAGATCCCTAGGGTTGG 120
Sbjct 994 ATCAACTAGTGAGGTGACTTTTGGGTTAAATCCGTTAAGTAGTGAGATCCCTAGGGTTGG 1053
Query 121 CTAATAATGTGATGCTTATGTGTTATGTGTTGAAGCTATATCGACAGGAGCGAGAAGCGC 180
Sbjct 1054 CTAATAATGTGATGCTTATGTGTTATGTGTTGAAGCTATATCGACAGGAGCGAGAAGCGC 1113
Query 181 CGGAAGGAAGGGGCAAGAACAGSTCAGTGTATGCCCTTAGGAGGTATGGCTGCACGGCGCA 240
Sbjct 1114 CGGAAGGAAGGGGCAAGAACAGSTCAGTGTATGCCCTTAGGAGGTATGGCTGCACGGCGCA 1173
Query 241 CGGAAGGAAGGGGCAAGAACAGSTCAGTGTATGCCCTTAGGAGGTA-TGG-GCTGCAC-GC 297
Sbjct 1174 CT-AC---AGTGGTTACAATAGATATTTTATAGAAGTAA-ATGTAATCGAGAGGGAATGA 1228
Query 298 GCA--GTAATGTGCA CAGAACGAGGAATTGCTAGTAATCGTTATCTCACTAAAAGCGA 355
Sbjct 1229 GCACTGTAATGTGCA CAGAACGAGGAATTGCTAGTAATCGTTATCTCACTAAAAGCGA 1288
Query 356 TGAATGTCTCCCTGTTCTTTGTACACACCCGCGCTTATCGAAAATGGAACAGGTGC 415
Sbjct 1289 TGAATATGTCCCTGTTCTTTGTACACACCCGCGCTTATCGAAGATGGAACAGGTGC 1348
Query 416 GAAACAAGTGAAGCGAGTGAAGTGCAGGGTCTTAGATCTGATACAAAGTCGTAAACAAGCGAG 475
Sbjct 1349 GAACAAAGCGAAGCGAGTGAAGTGCAGGGTCTTAGATCTGATACAAAGTCGTAAACAAGCGAG 1408
Query 476 CTGTAGGAAAACCTGTAGCTGGATCAAACAGAAAACAGAAAAAAAAAAAAA-agaataaaa 534
Sbjct 1409 CTGTAGGAAAACCTGTAGCTGGATCAA-CA-----AGAAAACAAGCAATACAAG-AAAA 1461
Query 535 aaGAATTAATGATAATAAATGATACCACCCCA-GGATCGTTGGTCTCTCTGACGAT 593
Sbjct 1462 A-G-----GA-----GATACCACACAAGGGATCGTTGGTCTCTCTGACGAA 1504
Query 594 GAAGGGCGCATTATTTTGCAGAAATGCACAATAATTAGCGACTATGATCATTGTGTGGGCC 653
Sbjct 1505 GAAGGGCGTTGCGAGATACGAAAAGCATGAGAG-TAGCGCATATGATCAT-GTGT--GCC 1560
Query 654 TGAATAGTGTCTTTAGAAAACATGATTACTCCTCGGAATTAAGCATATGAATAAAGGAAG 713
Sbjct 1561 TGAATAGTGTTAGATACTAACACGGATACCTCTGGAATTAAGCATATGATTAAGGAAG 1620
Query 714 GAAAAGAAAACCAACAGGGATTCCTCATAGTACGGCGAGTGAACAGGGAAGATCCCAATAG 773
Sbjct 1621 GAAAAGAAAACCAACAGTGTATTCCTCATAGTACGGCGAGTGAACAGGGAAGATCCCAATAG 1680
Query 774 TGTAATCTGACTAAATTA--TTAGAAGATGTCAATGTAATCTACTAGAAGATGTCAAA 831
Sbjct 1681 TGTAATCTGA--AAITTAATTTAGATGTGTCAAAGTA-T-C-ATTATACA-G--AAT 1732
Query 832 AAATGATTTTATAAATACCTGAGAAAGGTGCGGATAAAGGGTGATAGCCCGTATGTTAA 891
Sbjct 1733 -AATCATAGTAGAAATATCTGGAAAAGATATACTATAGAGGGTGATAGTCCCATATATTTAT 1791
Query 892 GTCATGTGGTATGATGCGATATGAGTAGTGTGCTTGGTAATGCACGGTGAAGAGGTT 951
Sbjct 1792 GTTGTCTTGTATGATGCGATATGAGTAGTGTGCTTGGTAATGCACGGTGAAGAGGTT 1851
Query 952 GTGATGTTCTCTAAGACTAAATTAAGAGAGAGACCGATAGGAGA 997
Sbjct 1852 GTGATGTTCTCTAAGACTAAAT-AC-AGCGAGGCGCCGTTAG-AGA 1895
    
```

**Hình 5: Trình tự đoạn gen của vi bào tử trùng *Microsporidia* phân lập từ cá bệnh gạo so sánh với trình tự gen trong Ngân hàng gen bằng chương trình BLASTN (số hiệu Genbank là gb|FJ843105.1)**



#### 4 KẾT LUẬN

Giai đoạn cá hương và cá giống có tỷ lệ nhiễm bệnh cao hơn giai đoạn cá thịt. Tỷ lệ nhiễm trên ao cá hương là 93,3%, trên cá giống thấp nhất là 70% và cao nhất là 96,6%. Đối với cá nuôi thịt thì tỉ lệ nhiễm từ 40-73,3%. Cường độ nhiễm ở cá hương dao động từ 2-14 bào nang/cá, ở cá giống từ 1-160 bào nang/cá và cá thịt từ 1-83 bào nang/cá. Mô học: 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 *Mirosporidia* ly giải hoàn toàn. Một số vùng cơ xuất hiện bào nang tiên khởi.

Quan sát đặc điểm hình thái kết hợp với so sánh trình tự gen từ sản phẩm PCR có kích thước là 1100 bp đã xác định vi bào tử *Kabatana* sp. nhiễm trong cơ cá tra.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anane, S. and H. Attouchi, 2010. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*. 34: 450-464.

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.

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). *Journal parasitol.* 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. *Aquat Org.* 40: 125-129.

Dowd, S.E., C.P. Gerba, F.J. Enriquez and A.L. Pepper, 1998. PCR Amplification and species determination of Microsporidia in formalin-fixed feces after immunomagnetic separation. *Applied And Environmental Microbiology*. 64: 333-336.

Dykova, I. and J. Lom, 2000. Histopathology of *Kabatana arthuri* (Microspora) infection in

*sutchi* catfish, *Pangasius sutchi*. *Folia Parasitologica*. 47: 161-166.

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*.

Gatehouse H.S. and L.A. Malone. 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis*(Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J. Invert. Pathol.* 71: 97-105.

Joh, S.J., Y.K. Kwon, M.C. Kim, M.J. Kim, H.M. Kwon, J.W. Park, J.H.K won and J.H. Kim, 2007. Heterosporis anguillarum infections in farm cultured eels (*Anguilla japonica*) in Korea. *J. Vet. Sci.* 8: 147-149.

Keeling, J and H. Slamovits, 2004. Simplicity and Complexity of Microsporidian Genomes. <http://ec.asm.org/content/3/6/1363.short>.

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 F. Nilsen, 2003. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *International Journal for Parasitology*. 33: 107-127.

Lom, J. and I. Dykova, 1992. Protozoan parasites of fishes. Elsevier, Amsterdam.

Lom, J. and I. Dykova, 2005. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitologica*. 52: 69-81.

Lom, J., F. Nilsen and S. Urawa, 2001. Redescription of *Microsporidium takedai* (Awakura, 1974) as *Kabatana takedai* (Awakura, 1974) comb. n. *Dis Aquat Org.* 44: 223-230

Lom, J., I. Dykova and K. Tonguthai, 1999. *Kabatai* agen. n., a new genus proposed for Microsporidium spp. infecting trunk muscles of fishes. *Dis Aquat Org.* 38: 39-46

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.
- Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Kết quả nghiên cứu bước đầu về bệnh gạo 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.
- Robert, R.J, 1989. *Fish pathology. Intitude of Aquaculture*, University of Stirling. Bailliere Tindall, London. 318pp.
- 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*.
- 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.
- Sokolova, Y.Y., I.M. Sokolov and J.R. Fuxa, 2004. Identification of Microsporidia infections in nature: light microscopy or PCR. *Protistology*. 3: 273-281.
- Sprague, V., J. J. Becnel and E. I. Hazard, 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 285-395.
- 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.
- Woo, P.T.K., 2006. *Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections* University of Guelph Canada. pp 205-230. Stoskopf, M.K., 1993. *Fish medicine*. W. B. Saunders Company. p. 832-839.