

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.233

XÁC ĐỊNH SỰ HIỆN DIỆN CỦA MÀM BỆNH KÝ SINH TRÙNG VÀ VI KHUẨN TRÊN ÉCH THÁI LAN (*Rana sp.*) BỊ BỆNH TRƯNG BỤNG

Nguyễn Thị Thu Hằng^{1*}, Lê Thanh Siêng² và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Công ty TNHH Kỹ thuật - Sinh học Quốc tế Thăng Long

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thu Hằng (email: ntthang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 14/06/2022

Ngày duyệt đăng: 20/06/2022

Title:

Determine the presence of parasitic and bacterial pathogens in the Thai frog (*Rana sp.*) with hydrocoelom

Từ khóa:

Aeromonas hydrophila, *Cilliphora*, *Pseudomonas putida*, *Rana sp.*, trưng bụng

Keywords:

Aeromonas hydrophila, *Cilliphora*, hydrocoelom, *Pseudomonas putida*, *Rana sp.*

ABSTRACT

The study was conducted to figure out parasitic and bacterial pathogens infected frog (*Rana sp.*) with hydrocoelom. Results on 110 frog samples collected in Dong Thap province from April 2021 to January 2022 showed that frogs were often infected by 9 Cilliphora species such as *Balantidium coli*, *B. elongatum*, *B. entozoon*, *B. honghuensis*, *Cepedea longa*, *C. magna*, *Opalina natalensis*, *O. ranarum*, and *Zelleriella binucleata*. The bacterial identification results identified 77 bacterial isolates, which were 2 species including *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida*. *P. putida* had the highest infection rate (74%). Histological results showed that liver tissue had signs of cellulitis, damaged structures, pancreatic islet areas were congested necrosis, and loss of structure. The renal tissue showed the expression of swelling, inflammation, and congestion. The renal tubular structures and Bowman's capsules were altered, ruptured, and enlarged. The intestinal tissue showed that epithelium was ruptured, cells were loss of structure, and *Cilliphora* species were present. The folds of the intestinal mucosa were stuck and many places of congestion. The lung tissue showed that inflammation, hemorrhage, and congestion in the lungenbronchus and septum structures.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm hiểu mầm bệnh ký sinh trùng và vi khuẩn ký sinh trên ếch (*Rana sp.*) bị bệnh trưng bụng. Kết quả kiểm tra 110 mẫu ếch thu tại Đồng Tháp từ tháng 4/2021 đến 02/2022 cho thấy ếch bệnh thường nhiễm 9 loài trùng lông gồm *Balantidium coli*, *B. elongatum*, *B. entozoon*, *B. honghuensis*, *Cepedea longa*, *C. magna*, *Opalina natalensis*, *O. ranarum* và *Zelleriella binucleata*. Kết quả định danh vi khuẩn đã xác định được 77 chủng thuộc 2 loài là *Aeromonas hydrophila* và *Pseudomonas putida*. Trong đó, loài vi khuẩn *P. putida* có tỷ lệ nhiễm cao nhất (74%). Kết quả mô học cho thấy mô gan có biểu hiện viêm, mất cấu trúc, vùng đảo tụy xung huyết, hoại tử và mất cấu trúc. Mô thận sưng tấy, viêm mô và xung huyết. Cấu trúc ống thận và nang Bowman's bị biến đổi, vỡ và phình to. Mô ruột có lớp biểu mô bị phá vỡ, các tế bào bị mất cấu trúc và có sự hiện diện của trùng lông. Các nếp gấp ở niêm mạc ruột bị dính lại và nhiều nơi xung huyết. Mô phổi có hiện tượng bị viêm, xuất huyết và xung huyết ở các phế nang phổi và các vách ngăn.

1. GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long là vùng nuôi trồng thủy sản trọng điểm, hàng năm cung cấp một lượng sản phẩm thủy sản đáng kể cho nước nhà với tổng sản lượng đạt khoảng hơn 7,7 triệu tấn, trong đó nuôi trồng chiếm từ 55-60% (Hải, 2019). Cùng với nghề nuôi cá tra, cá điêu hồng, cá rô, cá lóc,.. đang phát triển thì nuôi ếch đang được người dân quan tâm và trở thành đối tượng nuôi mới ở một số tỉnh trong vùng. Các tỉnh An Giang, Cần Thơ, Đồng Tháp và Sóc Trăng diện tích nuôi đang tăng nhanh. Chỉ riêng huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp, diện tích nuôi ếch đã phát triển hơn 40 ha. Ước tính, trung bình mỗi năm địa phương có thể cung cấp 5.000 tấn ếch thương phẩm (Nhật, 2020).

Ếch bắt đầu được nuôi thương phẩm từ năm 2004 ở tỉnh Đồng Tháp. Ếch là loài lưỡng cư có tốc độ tăng trọng nhanh, khả năng sử dụng thức ăn chế biến tốt và tỷ lệ sống cao. Nguồn thức ăn của ếch rất phong phú và có thể nuôi hoàn toàn bằng thức ăn công nghiệp với nhiều loại mô hình nuôi khác nhau. Thịt ếch trắng hồng, dai và thơm ngon là nguồn cung cấp đạm động vật cho con người, có giá trị thương phẩm cao. Ếch được chế biến nhiều món ngon ở các nước châu Á (Chung, 2007).

Sự phát triển nhanh của nghề nuôi và gia tăng mật độ nuôi dẫn đến tăng dịch bệnh, trong đó bệnh do vi khuẩn và ký sinh trùng là phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng nhất. Sự gia tăng dịch bệnh đã làm ếch nuôi chết hàng loạt gây ra thiệt hại lớn về kinh tế cho người nuôi (Thủy, 2007). Các bệnh thường gặp ở mô hình nuôi ếch hiện nay chủ yếu là bệnh phù mắt, quẹo cổ, lở loét, đỏ thân và trương bụng; nếu không áp dụng kịp thời các biện pháp điều trị thì ếch bỏ ăn dẫn đến suy kiệt và chết. Hiện nay, các nghiên cứu về bệnh trên ếch nuôi thương phẩm còn rất hạn chế. Bên cạnh đó, những thông tin về đặc điểm bệnh học của vi khuẩn gây bệnh và các biện pháp phòng trị bệnh vẫn còn rời rạc và chưa được công bố chính thức. Trong lúc nghề nuôi phát triển nhanh chóng, môi trường nuôi ngày càng bất lợi, diễn biến dịch bệnh phức tạp thì việc hiểu rõ về các mầm bệnh trên ếch càng trở nên cấp thiết. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu mầm bệnh ký sinh trùng và vi khuẩn ký sinh trên ếch bệnh trương bụng ở các vùng nuôi trọng điểm, làm cơ sở để phòng trị bệnh cho ếch.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu và bảo quản mẫu

Mẫu được thu trực tiếp từ 10 hộ nuôi ếch ở xã Mỹ Đông và Mỹ An huyện Tháp Mười tỉnh Đồng

Tháp từ tháng 4/2021 đến tháng 02/2022. Mỗi hộ nuôi thu 7-10 con là ếch còn sống và có dấu hiệu bệnh lý trương bụng và một số ếch khỏe không có dấu hiệu bệnh lý làm đối chứng. Mỗi ếch được xem là một mẫu. Ếch được vận chuyển sống về phòng thí nghiệm bằng thùng nhựa hoặc thùng xốp có chứa nước và phân tích trong ngày.

2.2. Phương pháp phân tích mẫu

2.2.1. Phương pháp làm tiêu bản kính phết

Mẫu phổi, gan, thận và dịch bụng được lấy phết tiêu bản, để khô ở nhiệt độ phòng; cố định mẫu trong methanol 1 phút (trữ mẫu ở ngăn mát tủ lạnh, nếu chưa nhuộm mẫu ngay lập tức). Nhuộm mẫu theo phương pháp Humason (1979) Và đọc kết quả dưới kính hiển vi ở vật kính 40x và 100x có giọt dầu soi kính.

2.2.2. Phương pháp phân tích ký sinh trùng

Các dấu hiệu bên ngoài cơ thể ếch được quan sát và ghi nhận, sau đó giải phẫu ếch và kiểm tra nội ký sinh ở xoang nội quan, dạ dày, mật, ruột ếch, làm tiêu bản quan sát ở vật kính 10-40x.

Phương pháp xác định mức độ nhiễm ký sinh trùng (KST) (Margolis et al., 1982):

Tỉ lệ nhiễm (%) = số mẫu nhiễm KST/tổng số mẫu kiểm tra × 100

Cường độ nhiễm = số trùng/cơ quan hay thị trường 10x

Trường hợp ếch nhiễm trùng lông có kích thước nhỏ, nội ký sinh trong ruột với số lượng lớn sẽ được xác định cường độ nhiễm ước tính theo dấu (+) từ vài trùng/thị trường 10x; dấu (++) từ 10 đến vài chục trùng/thị trường 10x; dấu (+++) lớn hơn 100 trùng/thị trường 10x; dấu (++++) là rất nhiều trùng/thị trường 10x (Hòa, 1996).

Mẫu được thu, cố định, nhuộm và gắn tiêu bản ký sinh trùng: tiêu bản nguyên sinh động vật (trùng lông nội ký sinh) được thực hiện theo Tonguthai et al. (1999); phết mẫu tiêu bản trùng lông và để khô ở nhiệt độ phòng; cố định mẫu trong hóa chất Methanol trong 1 phút. Nước được khử trong hóa chất GAA và tiến hành nhuộm AgNO₃ (2%), Carmalum, Methy red. Mẫu được rửa bằng benzylalcohol và gắn tiêu bản nhựa canada-balsam.

Định danh ký sinh trùng: ký sinh trùng được phân loại dựa trên các chỉ tiêu hình thái cấu tạo sử dụng tài liệu phân loại ký sinh trùng đơn bào (Protozoa) theo Lom and Dykova (1992), Woo (2006), Kỳ và Tê (2007) và Noga (2010).

2.2.3. Phương pháp phân tích mẫu vi khuẩn

Vi khuẩn được phân lập ở dịch bụng, gan, thận và lá lách trên các môi trường TSA; ủ mẫu ở nhiệt độ 28°C; đọc kết quả sau 24 giờ, mẫu đạt yêu cầu phải có các khuẩn lạc tách rời nhau và tách rỗng mẫu cấy.

Nuôi cấy thuần chủng mẫu đã phân lập: dựa vào hình dạng và màu sắc của khuẩn lạc để xác định các chủng vi khuẩn thuần.

Định danh vi khuẩn dựa vào các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa: Chọn các chủng vi khuẩn thuần để định danh dựa theo phương pháp của Buller (2004). Các đặc điểm sinh lý sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang Cowan and Steel (Barrow & Feltham, 1993). Các chỉ tiêu về hình thái gồm có: hình dạng và màu sắc của khuẩn lạc, khả năng di động của vi khuẩn, nhuộm gram để kiểm tra tính rỗng của vi khuẩn. Các chỉ tiêu về sinh lý gồm phản ứng oxidase và catalase. Từ kết quả xác định được đặc điểm hình thái, chọn các chủng vi khuẩn cùng nhóm Gram âm định danh bằng bộ kit API-20E (BIOMÉRIEUX, Pháp).

2.2.4. Phương pháp mô học

Mẫu mô ở các cơ quan như gan, thận, phổi và ruột được thu và cố định trong dung dịch 10% neutral buffer formalin (NBF). Mẫu được xử lý qua các giai đoạn: loại nước, làm trong mẫu và tẩm paraffin. Sau đó, mẫu được đúc khối, cắt với độ dày từ 4-6 µm và nhuộm Haematoxylin và Eosin, Giemsa. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi lần lượt ở độ phóng đại 100x, 200x và 400x và chụp hình tiêu bản đặc trưng.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được thu thập và xử lý để vẽ đồ thị, biểu bảng, viết báo cáo bằng phần mềm Microsoft Excel và Microsoft Word.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu mẫu ếch *Rana* sp. bệnh trương bụng

3.1.1. Số lượng mẫu ếch bệnh

Mẫu ếch bệnh được thu ở tỉnh Đồng Tháp, là địa phương có nghề nuôi ếch Thái Lan *Rana* sp. phát triển mạnh trong vùng. Trong 10 hộ nuôi phỏng vấn thông tin kỹ thuật và thu mẫu ếch có biểu hiện bệnh và mẫu ếch khỏe để làm mẫu đối chứng. Kết quả có 110 mẫu ếch được thu, trong đó có 97 mẫu ếch bệnh và 13 mẫu ếch khỏe. Phần lớn các mẫu thu được là ếch có biểu hiện của bệnh trương bụng và trương bụng kèm biểu hiện đỏ đuôi xuất huyết. Theo đó, mẫu ếch bệnh trương bụng có xu hướng nhiều hơn, trong

khí chỉ có khoảng 21 mẫu ếch thu được có biểu hiện triệu chứng bệnh kết hợp. Các mẫu ếch bệnh do vi khuẩn thường được ghi nhận nhiễm nhiều nhóm ký sinh trùng hơn các mẫu ếch khỏe. Số mẫu ếch nhiễm ký sinh trùng là 99 mẫu, trong đó, hầu hết là các mẫu ếch bệnh do vi khuẩn.

Thời điểm thu mẫu (từ tháng 7 đến tháng 9 vào lúc mưa nhiều liên tục) cũng là giai đoạn mà bệnh trương bụng phát triển mạnh. Do đó, số lượng mẫu ếch bệnh trương bụng với các dấu hiệu đặc trưng phong phú hơn. Từ 97 mẫu ếch có biểu hiện bệnh, 77 chủng vi khuẩn được phân lập từ ếch bệnh trương bụng. Các mẫu ếch khỏe hoặc ếch có biểu hiện bệnh nhưng vẫn còn khỏe, dấu hiệu lâm sàng chưa rõ thì không phân lập được mẫu vi khuẩn thuần trên môi trường nuôi cấy.

3.1.2. Dấu hiệu bệnh lý của ếch *Rana* sp. bệnh trương bụng

Bệnh trương bụng trên ếch nuôi có tần số xuất hiện khoảng 62,7%, cao nhất so với các bệnh khác trên ếch. Bên cạnh đó, mức độ thiệt hại của bệnh cũng khá lớn. Bệnh xảy ra trên hầu hết các giai đoạn nuôi. Nghiêm trọng và thường gặp nhất là ở giai đoạn ếch trưởng thành nuôi trong ao, vèo (diện tích vèo khoảng 70-72m², mật độ nuôi từ 120-140 con/m², thức ăn sử dụng là thức ăn công nghiệp). Sau khoảng 3 tháng nuôi thì ếch đạt với chiều dài từ 6,5-11 cm, giai đoạn này ếch chết nhiều khoảng 10-15 con/ngày với tỷ lệ khoảng 0,18% tổng số ếch nuôi. Bên cạnh đó, theo những kết quả phân tích ếch bệnh cho thấy 90% ếch bệnh thường đi cùng với sự xuất hiện của trùng lông. Trùng lông có thể đóng vai trò là tác nhân gây bệnh thứ cấp góp phần làm cho bệnh trương bụng phát triển và gây thiệt hại cho ếch nhiều hơn.

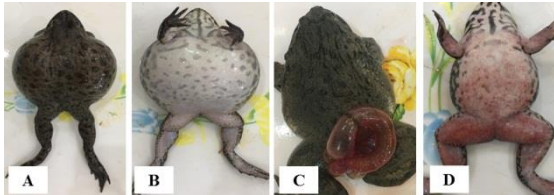
Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài

Ếch bệnh thường có màu sắc cơ thể sẫm màu hơn bình thường, mắt đục hoặc lồi, một số mẫu ếch có dấu hiệu vàng da hoặc xuất huyết dạng chấm trên vùng da bụng và da đùi. Một số mẫu ếch khác cũng có dấu hiệu phù đầu, phù hàm dưới hoặc lồi hậu môn. Dấu hiệu đặc trưng nhất của bệnh là vùng bụng của ếch bị trương to bất thường, kích thước của vòng bụng có thể gấp đôi chiều dài của cơ thể ếch.

Dấu hiệu bệnh lý bên trong

Dấu hiệu đặc trưng là phần bụng ếch trương to, khi giải phẫu phần bụng có chứa nhiều dịch nhầy có lẫn máu trong xoang bụng hoặc chất dịch màu trắng hơi sánh đặc. Bên cạnh đó, một số mẫu ếch có phần da bụng bị dính vào các cơ quan nội tạng, ruột phình

to, trương nước và có thể có xuất huyết. Gan bị xuất huyết hoặc nhạt màu từng cụm trên bề mặt, ngoài ra, gan có thể bị trương to, mềm nhũn. Thận và tỷ tạng xuất huyết, sậm màu hoặc nhạt màu tùy theo giai đoạn bệnh, có thể có dấu hiệu teo nhỏ, thoái hóa. Dịch mật nhạt màu hơn bình thường. Phổi thường trương to, sưng phù, có nhiều dịch, thê tích thường tăng gấp đôi bình thường.



Hình 1. Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài của ếch *Rana* sp. bị bệnh trương bụng (A-D)

(A) mặt lưng của ếch trương bụng, (B) mặt bụng của ếch trương bụng, (C) hậu môn ếch bị lòi, (D) mặt bụng ếch bị xuất huyết dạng chấm



Hình 2. Dấu hiệu bệnh lý bên trong của ếch *Rana* sp. bị bệnh trương bụng (A-D)

(A) dịch màu đỏ máu từ bụng ếch; (B) dịch đặc, trong suốt từ bụng ếch; (C) ruột và gan ếch trương to; (D) phổi ếch trương to

3.2. Kết quả phân tích ký sinh trùng trên ếch *Rana* sp.

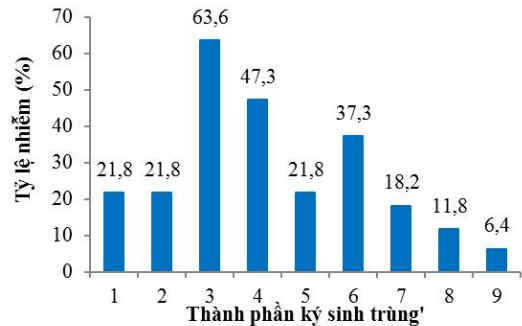
Kết quả kiểm tra 110 mẫu ếch nuôi có 99 mẫu ếch nuôi bị nhiễm ký sinh trùng, xác định được tổng cộng có 9 loài ký sinh trùng thuộc 4 giống, với tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm biến động khác nhau tùy từng giống loài ký sinh trùng. Ruột là cơ quan duy nhất nhiễm ký sinh trùng và đoạn ruột sau là nơi nhiễm nhiều ký sinh trùng nhất với mật độ rất cao. Kết quả phân tích cho thấy tất cả các loài ký sinh trùng nhiễm trên ếch nuôi đều thuộc nhóm nguyên sinh động vật (Protozoa) và thuộc ngành trùng lông Ciliophora, bao gồm:

Balantidium coli, *Balantidium elongatum*, *Balantidium entozoon*, *Balantidium honghuensis* (ngành: Ciliophora; lớp: Litostomeata; bộ: Vestibuliferida; họ: Balantiididae; giống: Balantidium)

Cepedea longa, *Cepedea magna* (ngành: Placidozoa; lớp: Opalineia; bộ: Opalinida; họ: Opalinidae; giống: Cepedea)

Opalina natalensis, *Opalina ranarum* (ngành: Placidozoa; lớp: Opalineia; bộ: Opalinida; họ: Opalinidae; giống: Opalina)

Zelleriella binucleata (ngành: Placidozoa; lớp: Opalineia; bộ: Opalinida; họ: Opalinidae; giống: Zelleriella)

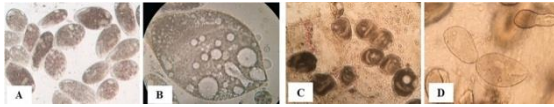


Hình 3. Tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng của ếch Thái lan *Rana* sp.

1: *Balantidium coli*, 2: *B. elongatum*, 3: *B. entozoon*, 4: *B. honghuensis*, 5: *Cepedea longa*, 6: *C. magna*, 7: *Opalina natalensis*, 8: *O. ranarum*, 9: *Zelleriella binucleata*

Theo Densmore and Green (2007), các giống trùng lông Ciliate, Opalinid thường được tìm thấy trong đường tiêu hóa của ếch. Phần lớn các loài ký sinh trùng này tồn tại ở dạng hội sinh và không gây bệnh nghiêm trọng trên ếch và lưỡng cư khác. Tuy nhiên, một số loài khi ký sinh mật độ cao có thể gây ra các tình trạng sức khỏe bất thường cho ếch. Kết quả phân tích cho thấy loài trùng lông *B. entozoon* có tỷ lệ nhiễm cao nhất trong các mẫu phân tích. Với tỷ lệ nhiễm dao động khoảng 63,6%, trùng lông *B. entozoon* thường ký sinh với mật độ dày đặc lên đến (+++) trùng/lame trong các mẫu dịch ruột. Những mẫu ếch mắc hội chứng trương bụng thường được ghi nhận nhiễm với cường độ cao giống trùng lông này. Có thể chúng đóng vai trò là tác nhân thứ cấp, bội nhiễm, làm bệnh trên ếch trở nên nghiêm trọng hơn. Tương tự, loài trùng lông *B. honghuensis* cũng có tỷ lệ nhiễm khá cao, dao động khoảng 47,3%, cường độ nhiễm có thể lên đến (+++) trùng/lame. Tuy nhiên, hai loài trùng lông *B. coli* và *B. elongatum* lại có tỷ lệ nhiễm khá thấp, dao động khoảng 21,8% tổng số mẫu. Cường độ nhiễm của hai loài trùng lông này thường dao động từ (+) đến (++) trùng/lame. Bản chất của loài trùng lông *B. coli*, cũng như các loài trùng lông giống *Balantidium*

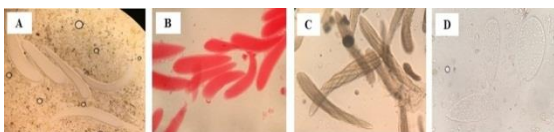
khác là sống hội sinh, chúng chỉ tấn công vào thành ruột để gây bệnh khi niêm mạc ruột bị tổn thương do một nguyên nhân nào đó (Schuster & Ramirez-Avila, 2008). Đây là lần đầu tiên ghi nhận loài trùng lông *B. coli* này ký sinh trên ếch nuôi ở đồng bằng sông Cửu Long.



Hình 4. Hình thái trùng lông *B. entozoon* (A), *B. honghuensis* (B), *B. coli* (C), *B. elongatum* (D)

Tương tự, giống trùng lông *Cepedea* thường được ghi nhận ký sinh phổ biến trên ếch khắp thế giới (Delvinquier et al., 1993), nhưng đây cũng là lần đầu tiên ghi nhận giống trùng lông này ký sinh trên loài ếch nuôi ở Việt Nam. Tuy nhiên, kết quả phân tích ký sinh trùng cho thấy tỷ lệ nhiễm hai loài *C. longa* và *C. magna* khá thấp, dao động lần lượt là 21,8% và 37,3%. Cường độ nhiễm của các loài trùng lông này thường dao động từ (+) đến (++) trùng/lame. Loài *C. magna* và *C. longa* có các đặc điểm hình thái đặc trưng tương đối giống nhau, cơ thể dạng dẹp, thon dài, phần đầu trước tròn, phần sau hơi nhọn, toàn thân bao phủ bởi các lông tơ ngắn mịn. Bên trong chứa nhiều không bào tròn nhỏ và hạt nhân hình cầu. Các đặc điểm này khá tương đồng với ghi nhận của Li et al. (2016) về loài trùng lông này ký sinh trong ruột ếch ở Trung Quốc.

Thêm vào đó, loài trùng lông *Z. binucleata* cũng lần đầu tiên được ghi nhận ký sinh trên ếch ở Việt Nam. Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm của loài trùng lông này rất thấp trong các mẫu ếch nuôi. Tỷ lệ nhiễm dao động khoảng 6,4% và cường độ nhiễm cũng khá thấp, thường chỉ đạt mật độ (+) trùng/lame. Loài *Z. binucleata* có kích thước từ 40 đến 180 μm , hình dạng cơ thể khá tương đồng với các loài thuộc giống *Opalina*, cơ thể dạng dẹp, dạng như chiếc lá, một đầu to tròn, một đầu thon nhọn. Tuy nhiên, các loài thuộc giống *Zelleriella* cơ thể có thêm phần đuôi nhọn, ngắn phân bố ở phần đầu thon nhọn (Tait, 1963; Delvinquier & Marinkelle, 1997).

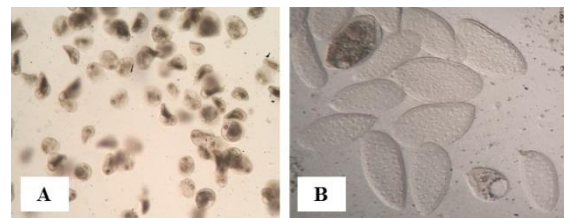


Hình 5. Hình thái trùng lông *C. magna* (A), *C. magna* – mẫu nhuộm methy-red (B), *C. longa* (C), *Z. binucleata* (D)

Bốn loài thuộc nhóm trùng lông được tìm thấy trên ếch Thái Lan là *C. longa*, *C. magna*, *O.*

natalensis và *Z. binucleata* đều thuộc họ Opalinidae. Opalinidae là nhóm động vật nguyên sinh không miệng, có nhiều hạt nhân nhỏ, cơ thể được bao phủ bởi lông mao, thon dài, hình trụ hoặc hình bầu dục. Các giống trùng lông này thường nội ký sinh trong ruột của động vật có xương sống máu lạnh, chủ yếu là động vật lưỡng cư và ít hoặc không gây ra bệnh cho vật chủ (Delvinquier et al., 1991, 1993).

Loài trùng lông *O. natalensis* được ghi nhận ký sinh trong ruột ếch với tỷ lệ nhiễm khá thấp, khoảng 18,2%. Nhưng cường độ nhiễm của loài ký sinh trùng này cũng khá cao, dao động từ (+) đến (+++) trùng/lame trong các mẫu dịch ruột của ếch. Tương tự, loài trùng lông *O. ranarum* cũng được ghi nhận nhiễm trong ruột ếch với tỷ lệ nhiễm khá thấp, chiếm tỉ lệ nhiễm 11,8%. Cường độ nhiễm của loài trùng này trong các mẫu dịch ruột cũng khá thấp, mật độ (+) trùng/lame. Kết quả này khá tương đồng với báo cáo của Layla et al. (2018), trong đó các tác giả ghi nhận nhiều giống loài trùng lông ký sinh trong đường tiêu hóa của loài ếch cây *Rana saharica*. Theo đó, các loài được phát hiện gồm: *O. ranarum*, *Copromonas subtilis*, *Nyctotheus condiformis*, *Cepeda lanceolata*. Tỷ lệ nhiễm thấp được ghi nhận từ 2 đến 20% trong ruột của ếch. Ngoài ra, giống trùng lông *O. ranarum* còn được phát hiện ký sinh trong gan và phổi của ếch với tỷ lệ nhiễm lên đến 50%. Tương tự khi so sánh với nghiên cứu của Al-Khamesi et al. (2018) thì kết quả đề tài ghi nhận cũng khá tương đồng. Theo đó, nghiên cứu này ghi nhận tỷ lệ nhiễm cao các loài trùng lông trên ếch ở các lưu vực các con sông tại Trung Đông. Các loài trùng lông được tìm thấy nhiễm trong ruột của ếch gồm các loài thuộc giống *Balantidium* với tỷ lệ nhiễm từ 23-28% và giống *Opalina* với tỷ lệ nhiễm từ 10-20%.



Hình 6. Hình thái trùng lông *O. natalensis* (A) và *O. ranarum* (B)

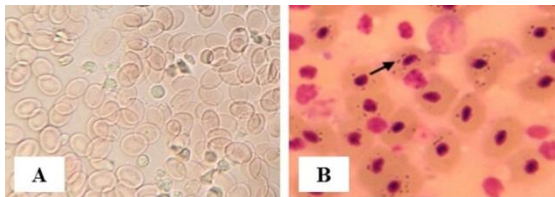
3.3. Kết quả phân lập, định danh vi khuẩn gây bệnh trên ếch *Rana* sp.

3.3.1. Kết quả phết kính

Quan sát mẫu kính phết mẫu máu, thận và tỳ tạng của ếch bệnh cho thấy sự xuất hiện nhiều cụm vi khuẩn hình que, chúng tấn công phá vỡ màng tế bào

hồng cầu, tạo ra nhiều khoảng trống trên tế bào chất, vi khuẩn còn tập trung quanh tế bào hồng cầu tạo thành một vòng tròn. Ngoài ra, còn có nhiều loại tế bào bạch cầu, đồng thời cũng tìm thấy rất nhiều đại thực bào, chúng tạo ra các khoảng trống trên tế bào chất của tế bào bạch cầu. Tế bào bạch cầu bị vi khuẩn phá vỡ màng tế bào và vi khuẩn chui ra khỏi tế bào (Hình 7).

Kết quả cho thấy có sự tồn tại của nhiều vi khuẩn hình que nằm rải rác trên vùng mô phết kính hoặc tập trung thành từng cụm. Các mẫu ở máu cũng cho thấy đại thực bào vi khuẩn. Ngoài ra, một số mẫu thận ếch bệnh phát hiện vi khuẩn xâm nhập vào và phá hủy tế bào làm tế bào bị vỡ. Kết quả này giống như khi mới phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch TSA, các cơ quan phân lập có vi khuẩn hình que.



Hình 7. Kính phết mẫu máu

(A) mẫu máu - soi tươi, (B) vi khuẩn tấn công vào tế bào hồng cầu (mũi tên) - nhuộm Giemsa

3.3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn

Từ 110 mẫu ếch (13 mẫu ếch khỏe, 97 mẫu ếch bệnh) nuôi thương phẩm, 77 chủng vi khuẩn được phân lập. Các chủng vi khuẩn được phân lập ở các cơ quan gan, thận, ty tạng, phổi và dịch xoang bụng của ếch có dấu hiệu bệnh lý đơn của bệnh thương bụng. Bên cạnh đó, cũng có các mẫu ếch có dấu hiệu bệnh lý kép như thương bụng + đỏ đùi; thương bụng + đỏ đùi + xuất huyết da.

Bảng 1. Đặc điểm của vi khuẩn phân lập trên ếch *Rana sp.* bị thương bụng

Chỉ tiêu	Kết quả
Số mẫu ếch bệnh	97
Số chủng vi khuẩn	77
Hình dạng khuẩn lạc	Nhỏ/to/tròn/nhẫn
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng trong/đục
Gram	-
Hình dạng vi khuẩn	Hình que ngắn
Di động	+
Oxidase	+
Catalase	+

Kết quả tổng hợp cho thấy từ 97 mẫu ếch có biểu hiện của bệnh thương bụng phân lập được 77 chủng vi khuẩn thuộc 2 giống vi khuẩn khác nhau. Các

chủng vi khuẩn được cấy từ gan, thận, ty tạng, dịch xoang bụng, phổi trên môi trường TSA. Sau 24 giờ ủ ở 28°C, những khuẩn lạc thu được có các đặc điểm tương đồng nhau là tròn, nhỏ hoặc to, đường kính 0,5-2 mm, dạng lồi, rìa trơn láng, màu trắng trong hoặc trắng đục. Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường Mac Conkey có màu hồng nhạt, hồng đậm hoặc không màu (màu vàng của môi trường). Các khuẩn lạc điển hình đã được cấy tách rời, để thu được những khuẩn lạc thuần. Dựa vào hình thái khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA và vi khuẩn nhuộm Gram, đề tài đã xác định được 2 giống vi khuẩn hiện diện trên các mẫu ếch bệnh thương bụng.

3.3.3. Kết quả định danh vi khuẩn phân lập từ ếch bệnh thương bụng

Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh lý cơ bản cho thấy đây là những chủng vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn. Vi khuẩn di động mạnh ở điều kiện nhiệt độ 37°C. Bên cạnh đó, khi khảo sát khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn ở các nồng độ 0, 1, 2, 3% NaCl trong môi trường lỏng BHI (Brain Heart Infusion). Kết quả cho thấy tất cả vi khuẩn có thể sinh trưởng ở môi trường có nồng độ NaCl từ 0 đến 3% và ở điều kiện nhiệt độ 28°C hoặc 37°C. Để định danh đến loài vi khuẩn, đề tài sử dụng bộ kit API 20E. Kết quả các chỉ tiêu API 20E xác định được 77 chủng vi khuẩn phân lập từ ếch bị bệnh thương bụng thuộc nhóm vi khuẩn có các đặc điểm hình thái và sinh hóa đặc trưng như sau:



Hình 8. Kết quả định danh chủng vi khuẩn A3G là vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*

Các chủng vi khuẩn thuộc nhóm 1 thường có khuẩn lạc có kích thước lớn từ 2 đến 3 mm, hình que ngắn và Gram âm, có khả năng di động; có khả năng lên men trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí, cho phản ứng dương tính với catalase, oxidase, ortho-nitrophenyl, arginine, lysine, citrate, indole, Voges-Proskawer, gelatin, glucose, mannitol, sucrose và amygdalin. Ngược lại, vi khuẩn cho các phản ứng âm tính với các chỉ tiêu như ornithine, H₂S, ure, tryptophane, inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose và arabinose. Thông qua phân mềm apiweb, các chủng vi khuẩn thuộc nhóm 1 này được xác định là vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* với độ tin cậy 89,3%.



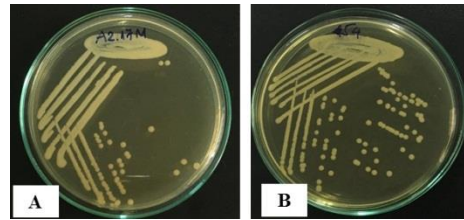
Hình 9. Kết quả định danh chủng vi khuẩn A6LL là vi khuẩn *Pseudomonas putida*

Các chủng vi khuẩn thuộc nhóm 2 thường có dạng que ngắn, Gram âm; di động yếu, không có khả năng lên men trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí, phản ứng dương tính với catalase, oxidase, citrate, arginine, VP; không có khả năng sinh lên men và oxy hóa đường glucose, sinh indole, H₂S và di động yếu. Thông qua phần mềm apiweb, các chủng vi khuẩn thuộc nhóm 2 này được xác định là vi khuẩn *Pseudomonas putida* với độ tin cậy 88,7%.

Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn trên ếch bệnh thương bụng cho thấy đây là một dạng bệnh hội chứng với sự bội nhiễm của nhiều loài vi khuẩn khác nhau (có khoảng 25/97 mẫu ếch bị bội nhiễm). Kết quả khảo sát cho thấy loài vi khuẩn *P. putida* có tỷ lệ nhiễm cao nhất trong các mẫu ếch bệnh, tổng cộng có 57 chủng thuộc loài này được phân lập chủ yếu từ các mẫu gan, thận, dịch xoang bụng của ếch có triệu chứng bệnh. Kế đến là loài vi khuẩn *A. hydrophila* được phân lập từ các mẫu gan ếch bệnh với 20 chủng.

Các đặc điểm mà đề tài ghi nhận được tương tự như mô tả của nhiều nghiên cứu trước đây về vi khuẩn *A. hydrophila* và *P. putida*. Theo đó, *A. hydrophila* là vi khuẩn Gram âm, dạng hình que, di động nhờ tiên mao. Đường kính 0,1-1,0 μm, dài 1,0-3,5 μm, không tạo bào nang, nhiệt độ cực thuận là 28°C, có thể phát triển ở 37°C. Khuẩn lạc trên môi trường TSA có màu trắng đến hồng nhạt, tròn, lồi, rìa trơn; là vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, catalase, oxidase dương tính, lên men đường. Vi khuẩn này dương tính với O/F, nitrate dương tính, không thể phát triển trong môi trường chứa 6,5% NaCl và kháng tự nhiên với ampicillin. *A. hydrophila* là loài vi khuẩn không lên men lactose nên chúng phát triển trên môi trường Mac Conkey cho các khuẩn lạc tròn, trơn nhẵn, có màu vàng giống môi trường nuôi cấy (Inglis et al., 1993; Noga, 2010). Vi khuẩn *P. putida* là giống vi khuẩn Gram âm, hình que, kích thước từ 0,5 đến 1,5 μm, không sinh bào tử, di động bằng tiêm mao. Đây là nhóm vi khuẩn hiếu khí, oxidase dương tính, catalase dương tính, không oxy hóa và không lên men trong môi trường O/F. Chúng có khả năng tạo sắc tố huỳnh quang vàng xanh hoặc xanh trên môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ phát triển rộng từ 4 đến 43°C, vi khuẩn phân bố rộng khắp trong môi

trường nước, đất, có thể gây bệnh trên người, động vật và thực vật. Vi khuẩn thường được phân lập từ bệnh phẩm ở da, gan, thận. Chúng phát triển thành những khuẩn lạc to, tròn, trơn láng, màu trắng đục trên môi trường TSA, hoặc khuẩn lạc màu đỏ có sắc tố tím xanh xung quanh trên môi trường GSP sau khi ủ ở 28°C trong 24 giờ. Vi *P. putida* là loài vi khuẩn không lên men lactose nên chúng phát triển trên môi trường Mac Conkey cho các khuẩn lạc tròn, trơn nhẵn, có màu vàng giống môi trường nuôi cấy (Inglis et al., 1993; Buller, 2004).



Hình 10. Khuẩn lạc của vi khuẩn *A. hydrophila* (A) và *P. putida* (B) trên môi trường TSA

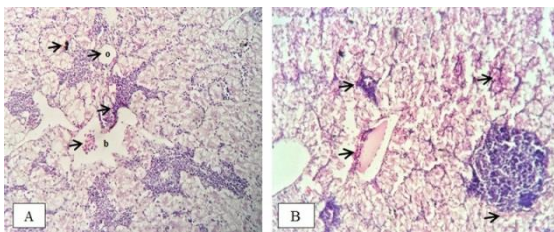
Hội chứng ếch bị thương bụng đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới ghi nhận (Densmore & Green, 2007; Pessier, 2009; Felt et al., 2012; Clancy et al., 2015; Broucke, 2016; Ferreira & Rosa, 2017). Tác nhân gây bệnh được biết đến bao gồm nhiều loài vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn Enterobacteriaceae (Broucke, 2016), tác nhân virus, tác nhân nấm và các yếu tố môi trường (Felt et al., 2012). Kết quả ghi nhận của đề tài khá tương đồng với những ghi nhận của Hird et al. (1983) nghiên cứu về thành phần vi khuẩn nhiễm trên ếch *Rana pipiens* tại Mỹ. Theo đó, loài vi khuẩn *A. hydrophila* được ghi nhận nhiễm trên ếch với tỷ lệ khá cao, khoảng 45,9% số mẫu. Các loài vi khuẩn *Pseudomonas* sp., *S. odorifera*, *Enterobacter cloacae* và *Escherichia coli* cũng được phân lập từ các mẫu ếch bệnh với tỷ lệ nhiễm từ 0,9 đến 8,6% tổng số mẫu. Tương tự, nghiên cứu của Roth et al. (2013) cũng ghi nhận thành phần vi khuẩn rất đa dạng nhiễm trên ếch ở Mỹ. Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm của từng loài vi khuẩn lại rất thấp so với ghi nhận của đề tài. Báo cáo cho thấy vi khuẩn giống *Aeromonas* và *Pseudomonas* chỉ nhiễm khoảng 6,9% tổng số mẫu, trong khi nhóm vi khuẩn *Serratia* chỉ nhiễm 1,5% số mẫu. Tỷ lệ nhiễm này thấp hơn rất nhiều so với kết quả đề tài ghi nhận được.

3.4. Kết quả mô bệnh học trên ếch *Rana* sp. bị bệnh thương bụng

Kết quả quan sát tiêu bản mô gan của ếch bị bệnh thương bụng có thể thấy các tiêu bản mô gan của ếch nhiễm bệnh nặng có sự biến đổi liên kết của các tế bào gan. Tương đồng với các biểu hiện bệnh lý của gan, các mẫu mô gan có biểu hiện của viêm mô bào

rõ rệt. Gan là cơ quan được lựa chọn để kiểm tra mô học bởi vì gan nhiễm bệnh thường cho thấy sự lan tỏa của lympho nội mô với các ổ viêm rải rác. Theo đó, cấu trúc tế bào gan bị phá hủy, sự sắp xếp các tế bào này không còn đều đặn như các mô khỏe. Thêm vào đó, có thể thấy nhiều vùng đảo tụy có biểu hiện xung huyết và hoại tử. Bên cạnh đó, nhiều mẫu mô gan ếch nhiễm nặng còn có thể quan sát thấy một số đảo tụy bị mất cấu trúc do hình thành các không bào lớn; đồng thời xung quanh đó, các mao mạch xuất hiện hiện tượng xung huyết. Quá trình xung huyết kéo dài làm vỡ mạch máu trong tổ chức mô gan, do kích thích đặc biệt từ các mầm bệnh đã làm cho các mao mạch giãn nở và lượng máu lớn hơn bình thường được đưa đến gần ổ dịch viêm, hiện tượng xung huyết được xem là phản ứng đầu tiên của cơ thể đối với tác nhân gây bệnh.

Tương đồng với các biểu hiện bệnh lý của thận, các mẫu mô thận thường biểu hiện sưng tấy và có dấu hiệu viêm mô rõ rệt. Kết quả quan sát các tiêu bản mô thận ếch bị bệnh tương bụng cho thấy, những thay đổi chủ yếu được phát hiện là sự xung huyết và nhiều trung tâm đại thực bào sặc sẫm. Cấu trúc ống thận và các nang Bowman's cũng có sự thay đổi ở những trường hợp ếch bị bệnh nặng. Theo đó, tế bào biểu mô cấu tạo nên ống thận bị biến đổi, ống thận bị mất cấu trúc hoặc bị vỡ cũng được ghi nhận trên hầu hết các mẫu cắt mô. Cùng với đó là sự xuất hiện của nhiều vùng xuất huyết xung quanh các ống thận. Trên một số mẫu mô thận, ta còn có thể quan sát thấy các mạch máu có biểu hiện như bị viêm, do có sự phi đại của tế bào biểu mô thận làm cho ống thận phình to hoặc biến dạng, từ đó làm thu hẹp khoảng cách giữa ống thận và nang Bowman's.

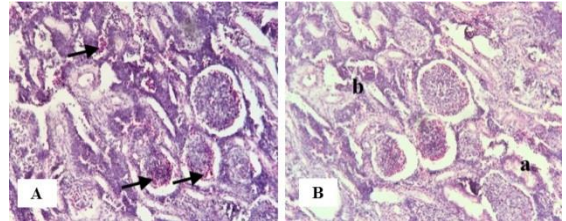


Hình 11. Mẫu mô gan (A và B) của ếch *Rana* sp. bị bệnh tương bụng

mũi tên: vùng xung huyết, xuất huyết; o: các vùng không bào trong mô gan; b: tế bào bị ly giải

Các mẫu mô thận nhiễm bệnh đều có hiện tượng xuất huyết ở những vùng quanh ống thận là do ảnh hưởng của độc tố từ vi khuẩn tiết ra, các mao mạch bị vỡ hoặc tính thấm thấu của mao mạch tăng lên có thể là nguyên nhân chính tác động đến chức năng của thận khi vi khuẩn xâm nhiễm. Hiện tượng xung

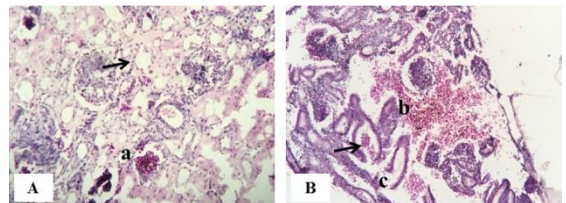
huyết và xuất huyết kéo dài sẽ làm cho mô thận sưng viêm, mất cấu trúc, một số trường hợp hoại tử, ly giải tế bào thận. Từ đó không thực hiện được chức năng bài tiết các chất thải trong quá trình trao đổi chất. Chính vì thế, thận tích tụ các độc tố do vi khuẩn tiết ra, từ đó gây độc cho cơ thể kết hợp với những yếu tố khác làm cho ếch suy yếu.



Hình 12. Mẫu mô thận (A và B) của ếch *Rana* sp. bị bệnh tương bụng

mũi tên: các vùng xuất huyết, xung huyết; a: ống thận xuất huyết, biến dạng; b: ống thận bị vỡ

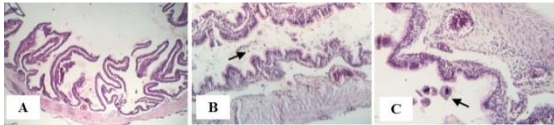
Quan sát tất cả các tiêu bản nhuộm mô thận của ếch bệnh có thể thấy có rất nhiều biểu hiện bất thường trong cấu trúc mô, chứng tỏ vi khuẩn đã tấn công và gây hại chính cho các tế bào thận. Từ đó cho thấy thận của ếch có thể là cơ quan tấn công và gây hại chính của nhóm tác nhân vi khuẩn gây bệnh tương bụng ở ếch. Nhận định này khá tương đồng với kết quả phân lập và định danh vi khuẩn trước đó. Bằng chứng là các mẫu phân lập vi khuẩn ở thận thường rất thuần và phát triển mạnh, ít khi bị nhiễm tạp khuẩn khác. Hầu hết các chủng vi khuẩn được phân lập ở đây đều là giống vi khuẩn *Pseudomonas*.



Hình 13. Mẫu mô thận (A và B) của ếch *Rana* sp. bị bệnh tương bụng

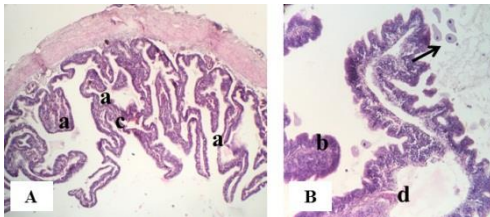
mũi tên: ống thận bị mất cấu trúc, phình to; a: tiểu cầu thận xuất huyết; b: tế bào thận ly giải; c: ống thận bị vỡ

Kết quả quan sát tiêu bản mô ruột của ếch bị bệnh tương bụng có thể thấy lớp biểu mô của ruột bị phá vỡ, với mức độ vừa, các tế bào bên trong thay đổi cấu trúc. Trong hầu hết các tiêu bản mô ruột giữa, ruột sau đều có sự hiện diện của trùng lông ký sinh. Một vài mẫu mô ruột trước cũng có sự hiện diện của trùng lông. Các động mạch, tĩnh mạch không thay đổi về cấu trúc. Các nếp gấp ở niêm mạc ruột có hiện tượng dính lại với nhau, một số tế bào biểu mô bị vỡ.



Hình 14. Mẫu mô ruột trước của ếch *Rana* sp. bị bệnh trương bụng

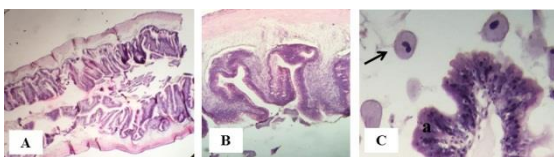
A: mặt cắt ngang; B, C: mặt cắt dọc; mũi tên: trùng lông nội ký sinh



Hình 15. Mẫu mô ruột giữa (A và B: mặt cắt ngang) của ếch *Rana* sp. bị bệnh trương bụng

mũi tên: trùng lông; a: các nếp gấp biến dạng; b: nhung mao bị dính; c: vùng xuất huyết; d: nếp gấp bị phình to

Khi bị tác nhân gây bệnh tấn công, ở đây là vi khuẩn và trùng lông ký sinh, phản ứng miễn dịch làm cho các tế bào sưng lên, xuất huyết và khi tế bào càng sưng to sẽ dẫn đến sự tiếp xúc càng cao giữa các nếp gấp niêm mạc ruột này, từ đó làm suy giảm chức năng hấp thu dinh dưỡng. Ngoài ra, do bụng ếch bệnh chứa 1 khối chất dịch nhầy với thể tích lớn nên chúng tạo ra áp lực chèn ép rất lớn lên thành ruột. Từ đó cho thấy các tiêu bản mô ruột thường xuất hiện nhiều nơi xung huyết ở biểu mô thành ruột. Bên cạnh đó, còn có nhiều mẫu ruột bị biến dạng, kích thước bên trong lòng ruột giảm đáng kể, các nhung mao trên biểu mô bị ép chặt lại gần với nhau.

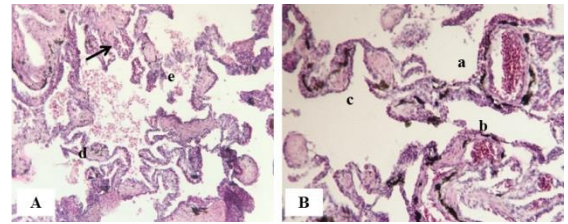


Hình 16. Mẫu mô ruột sau của ếch *Rana* sp. bị bệnh trương bụng

A: mặt cắt dọc; B, C: mặt cắt ngang; mũi tên: trùng lông; a: nhung mao bị ép chặt

Quan sát mặt cắt ngang của các mẫu mô phổi ở ếch bị bệnh trương bụng cho thấy phổi có hiện tượng bị viêm và xung huyết do sự chèn ép quá mức của khối dịch trong xoang bụng. Các vách ngăn bị viêm nên có thể thấy chúng dày lên rõ rệt, các khoang chứa rất nhiều các khối tế bào đơn nhân tự do, tế bào lympho, hồng cầu và tương bào. Trong đó, nhiều tế bào đơn nhân có biểu hiện sưng phồng. Các vách ngăn thường được bao phủ bởi một biểu mô mỏng,

chúng dày lên rõ rệt bởi một lớp viêm. Các tế bào phổi với các hạt sẫm màu trong tế bào chất của chúng bao phủ các mao mạch. Thành phổi với tập hợp các tế bào lympho, cho thấy các tương bào.



Hình 17. Mẫu mô phổi (A và B) của ếch *Rana* sp. bị bệnh trương bụng

mũi tên: vùng xuất huyết, a: động mạch, b: tĩnh mạch, c: phế nang, d: vách ngăn bị xẹp, e: ly giải tế bào

Trong phổi của một số ếch bị bệnh, các phế nang phổi có sự mở rộng bất thường, thành bị dày lên bởi tập hợp các tế bào đại thực bào, bạch cầu hạt và các tế bào bị ly giải. Tuy dịch tràn khắp xoang bụng của những cá thể ếch bị bệnh nhưng trong các mẫu mô phổi không có sự xuất hiện của hiện tượng tràn dịch trong các xoang phổi. Biểu hiện thường gặp nhất là tình trạng xuất huyết và xung huyết ở các phế nang phổi và các cấu trúc vách ngăn.

Nhìn chung, các ghi nhận biến đổi cấu trúc mô học của các cơ quan trên ếch bị bệnh trương bụng khá tương đồng với nhiều báo cáo trước đây về biểu hiện bệnh trương bụng của ếch ở nhiều nơi trên thế giới (Wright & Whitaker, 2001; Uchiyama & Yoshizawa, 2002; Pessier, 2009; Zhang et al., 2020). Rối loạn tích tụ chất lỏng ở động vật lưỡng cư hay ếch bị trương bụng, thường gặp trên quan sát lâm sàng, nhưng chưa được hiểu rõ. Ếch bị bệnh trương bụng hay còn gọi là hydrocoelom, là sự tích tụ của chất lỏng tự do trong khoang cơ thể của ếch (Pessier, 2009). Theo đó, nhận định của Clancy et al. (2015) cho rằng, bất kỳ sự xáo trộn nào đối với hệ thống thận đều có thể gây ra sự tích tụ chất lỏng ở ếch. Các nguyên nhân được ghi nhận gây ra chứng trương bụng ở ếch có thể kể đến là bệnh thận do nhiễm vi khuẩn. Các thay đổi trong cấu trúc mô học của nghiên cứu này ghi nhận bao gồm: thay đổi nang thận, viêm cầu thận, biến đổi hình ống các cầu thận, tắc nghẽn, viêm và phù nề biểu mô ruột, tăng sản đại thực bào sắc tố ở gan, u hạt ưa axit và tình trạng viêm ở các mẫu mô phổi.

Các báo cáo của Vannevel (2006), Gentz (2007) và Pessier (2009) nhận định rằng bệnh cổ trương hay trương bụng trên ếch có thể do các bệnh về tim mạch, gan và cả bệnh thận do nhiễm vi khuẩn. Đây là một phát hiện phổ biến ở các loài lưỡng cư hoang

đã bị nuôi nhốt. Nghiên cứu của Seixas Filho et al. (2010) đã quan sát sự thoái hóa hoặc tiêu biến của tế bào chất trong tế bào gan của ếch ở các giai đoạn nòng nọc và trưởng thành và nhận thấy rằng sự thay đổi này vẫn hiện diện trong gan của những con bố mẹ. Các tác giả cũng có những báo cáo trong đồng về các tổn thương mô bệnh học ở các mô cơ quan. Theo đó, các biểu hiện này bao gồm: sự hiện diện của các tế bào sắc tố, sự thoái hóa của tế bào gan và u hạt trong gan, cầu thận tăng sản và kiềm hóa, viêm ống thận, xuất huyết ống thận và sự đông máu trong thận. Các tác giả cũng đề cập rằng những thay đổi về màu sắc và cấu trúc trong mô cơ quan cũng được quan sát thấy như trong trường hợp của nghiên cứu này.

Những ghi nhận của nghiên cứu này cho thấy các tổn thương cấp tính đến mãn tính và tái phát, trong trường hợp này, có thể do quá trình phát sinh độc tố của vi khuẩn gây ra. Những tổn thương ở gan và thận có thể cản trở quá trình trao đổi chất của ếch, dẫn đến rối loạn chuyển hóa protein và hậu quả là tổn thương thận như phì đại nang Bowman's và cầu thận giảm sản, biến dạng, mất cấu trúc và sự thoái hóa của chúng. Điều này có thể gây ra hoại tử và các vôi hóa loạn dưỡng khi bệnh diễn tiến nặng hơn (Hipolito, 2004; Seixas Filho et al., 2008, 2010). Số lượng lớn các tế bào hắc tố và các tế bào mất cấu trúc được quan sát thấy như mô gan và thận bị tổn thương nhiều hơn, có thể là do độc tính của vi khuẩn. Ngoài ra, các nang mao của ruột bị tổn thương và kết dính có thể là do tác động của trùng lông ký sinh. Các nhà nghiên cứu khác cũng đã báo cáo về sự hiện diện này (Vannevel, 2006; Pessier, 2009). Nghiên cứu của Mangus et al. (2008) cũng có những báo cáo về tổn thương thận hiện diện ở 150 trong số 408 (36,8%) trường hợp ếch bị trưng bụng. Các kết quả quan sát mô học được ghi nhận bao gồm: viêm thận kẽ (42,9%), tiếp theo là khoáng hóa (30,2%), thoái hóa ống thận (17,5%), giãn ống thận và tăng tiết (15,9%), phì protein (14,3%), xuất huyết thận (14,3%) và nang ống thận (11,1%).

Nghiên cứu của Seixas et al. (2019) cho rằng, bệnh cổ trương hay bệnh trưng bụng ở ếch là một bệnh lý đặc trưng bởi sự thoát mạch của chất lỏng từ các mạch máu và sự tích tụ của nó trong khoang bụng, do một số yếu tố liên quan gây ra. Các ghi nhận của các tác giả khá tương đồng với những ghi nhận của nghiên cứu này. Theo đó, cầu thận, hầu hết là giảm sản, biến dạng với nang Bowman's mở rộng và nhiều khu vực bị hyalin hóa hoặc xuất huyết. Một số lượng lớn cấu trúc hình ống có chất hyalin hóa ái toan mạnh phân bố khắp các mô thận. Những biểu

hiện này không ghi nhận được trên ếch trưng bụng ở Việt Nam. Phân tích cũng cho thấy các u hạt trong các giai đoạn phát triển khác nhau, nhiều u có biểu hiện hoại tử trung tâm. Mô gan cho thấy một lượng lớn tế bào sắc tố trong nhu mô và dấu hiệu của tình trạng viêm gan đơn bào lympho rõ rệt, cũng như một số tế bào gan có nhân phân giải, phân ly và hoại tử. Báo cáo này cho rằng, bệnh cổ trương trên ếch có thể là do các tổn thương quan sát thấy ở các cơ quan này gây ra.

Gần đây, báo cáo của Womble et al. (2020) cũng ghi nhận nhiều đặc điểm trong biến đổi cấu trúc mô học của ếch bị trưng bụng. Loài ếch sừng *Lepidobatrachus laevis* nuôi nhốt bị hoại tử, trưng bụng cũng có các biểu hiện thay đổi về thận, bao gồm sự kết hợp khác nhau của sự phân bào biểu mô ống, tế bào chứa hai nhân, nhân tế bào mở rộng và không bào trong tế bào chất; bệnh thận đa nang và ung thư biểu mô thận. Thêm vào đó là tình trạng teo cầu thận hoặc giãn cầu thận dẫn đến bệnh thận đa nang đến ung thư biểu mô thận. Phân tích này là mô tả đầu tiên về tổn thương mô học được xác định trong quần thể ếch *L. laevis* nuôi nhốt, cung cấp cái nhìn mới về các quá trình bệnh tự phát xảy ra ở loài này để sử dụng trong chẩn đoán bệnh và quản lý lâm sàng.

4. KẾT LUẬN

Kết quả kiểm tra 110 mẫu ếch thu tại Đồng Tháp từ tháng 4/2021 đến 02/2022 cho thấy ếch bệnh thường nhiễm 9 loài trùng lông: *Balantidium coli*, *B. elongatum*, *B. entozoon*, *B. honghuensis*, *Cepedea longa*, *C. magna*, *Opalina natalensis*, *O. ranarum*, *Zelleriella binucleata*. Kết quả định danh vi khuẩn đã xác định được 77 chủng vi khuẩn thuộc 2 loài gồm: *Aeromonas hydrophila* và *Pseudomonas putida*. Trong đó, loài vi khuẩn *P. putida* có tỷ lệ nhiễm cao nhất (74%). Kết quả mô học cho thấy mô gan có biểu hiện viêm, mất cấu trúc, vùng đảo tụy xung huyết, hoại tử, mất cấu trúc. Mô thận sưng tấy, viêm mô, xung huyết. Cấu trúc ống thận và nang Bowman's bị biến đổi, bị vỡ, phình to. Mô ruột có lớp biểu mô bị phá vỡ, các tế bào mất cấu trúc, có sự hiện diện của trùng lông. Các nếp gấp ở niêm mạc ruột bị dính lại, nhiều nơi xung huyết. Mô phổi có hiện tượng bị viêm, xuất huyết, xung huyết ở các phế nang phổi và các vách ngăn.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Công ty TNHH Kỹ thuật - Sinh học Quốc tế Thăng Long đã hỗ trợ nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Khamesi, M. B., Salman, I. S., Abid, S. A., & Ibrahim, S. M. (2018). Study prevalence and effect of internal parasites and histopathological changes on common frogs at Baghdad city. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 49(3), 445-451.
- Barrow, G. I., & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel is manual for the identification of medical bacteria third edition*. Cambridge University press. Cambridge.
- Broucke, F. V. (2016). *Bloating bij amfibieën: mogelijke oorzaken, behandeling en preventie. Literatuurstudie in het kader van de Masterproef*. Faculteit Diergeneeskunde. Universiteit Gent.
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animal: A practical identification manual*. CABI publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851997384.0000>
- Clancy, M. M., Clayton, L. A., & Hadfield, C. A. (2015). Hydrocoelom and lymphedema in dendrobatid frogs at National Aquarium, Baltimore: 2003–2011. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(1), 18-26. <https://doi.org/10.1638/2014-0171.1>
- Chung, N. (2007). *Kỹ thuật nuôi ếch thịt và sinh sản ếch giống*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Delvignier, B. L. J., & Marinkelle, C. J. (1997). Opalinidae (Slopalinida) in South American Amphibia. Genus Zelleriella Metcalf, 1920 in Colombia. *Systematic Parasitology*, 38(2), 93-110. <https://doi.org/10.1023/A:1005882503449>
- Delvignier, B. L. J., Markus, M. B., & Passmore, N. I. (1991). Opalinidae in African Anura I. Genus Opalina. *Systematic Parasitology*, 19(2), 119-146. <https://doi.org/10.1007/BF00009908>
- Delvignier, B. L. J., Markus, M. B., & Passmore, N. I. (1993). Opalinidae in African Anura. III. Genus Cepedea. *Systematic parasitology*, 24(1), 53-80. <https://doi.org/10.1007/BF00006945>
- Densmore, C. L. & Green, D. E. (2007). Diseases of Amphibians. *ILAR Journal*, 48(3), 235-254. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.235>
- Felt, S. A., Cowan, A. M., Luong, R., & Green, S. L. (2012). Mortality and morbidity in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) associated with construction noise and vibrations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(2), 253-256.
- Ferreira, A., & Rosa, G. M. (2017). A case of extreme bloating in western spadefoot toads (*Pelobates cultripes*) from northern Portugal. *Bulletí Societat Catalana Herpetologia*, 24, 63-65.
- Gentz, E. J. (2007). Medicine and surgery of amphibians. *Ilar Journal*, 48(3), 255-259. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.255>
- Hải, P. (2019). *Thủy sản vùng ĐBSCL tạo sức hút với nhiều doanh nghiệp*. <https://www.baosoctrang.org.vn/kinh-te/thuy-san-vung-dbscl-tao-suc-hut-voi-nhieu-doanh-nghiep-29498.html#:~:text=V%C3%B9ng%20C4%90BSCl%20C4%91%C3%B3ng%20g%C3%B3p%20h%C6%A1n,t%E1%BB%AB%2055%25%20E2%80%93%2060%25>
- Hipolito, M. (2004). Manejo sanitário no cultivo de rã. In: Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Lizama, M. L. A. P. L. (Eds.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela (pp.333-353).
- Hird, D. W., Diesch, S. L., McKinnell, R. G., Gorham, E., Martin, F. B., Meadows, C. A., & Gasiorowski, M. (1983). Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). *Applied and Environmental Microbiology*, 46(6), 1423-1425. <https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1423-1425.1983>
- Hòa, Đ. T. (1996). *Nghiên cứu một số bệnh chủ yếu trên tôm sú (Penaeus monodon Fabricius 1798) nuôi ở khu vực Nam Trung Bộ*. Luận án phó tiến sĩ khoa học nông nghiệp. Trường Đại học Thủy sản Nha Trang.
- Humason, G. L. (1979). *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W. H. Freeman.
- Inglis, V., Roberts, R. J., & Bromage, N. J. (1993). *Bacterial disease of fish*. Institute of aquaculture, The university Press, Cambridge.
- Ký, H., và Tề, B. Q. (2007). *Kỹ sinh trùng cá nước ngọt Việt Nam*. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật.
- Layla, E. O., Elhamali, S. H., Mosaab, O. A., & Afaf, A. M. (2018). Prevalence of endo-parasites of common tree frog *Rana saharica* from Misurata, Libya. *Sudan Journal of Medical Sciences*, 13(1), 50-61. <https://doi.org/10.18502/sjms.v13i1.1688>
- Li, C., Jin, X., Li, M., Wang, G., Zou, H., Li, W., & Wu, S. (2016). Light and transmission electron microscopy of *Cepedea longa* (Opalinidae) from *Fejervarya limnocharis*. *Parasite*, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017006>
- Lom, J., & Dykova, I. (1992). *Protozoan parasites of fishes*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (pp. 125-157).
- Mangus, L. M., Montali, R. J., Clayton, L. A., & Bronson, E. (2008). Renal disease in captive frogs: a retrospective study of amphibian

- histopathology. *Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 17.
- Margolis, L. G. W., Holmes, J. C., Kuris, A. M., & Schad, G. A. (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. <https://doi.org/10.2307/3281335>
- Nhật, M. (2020). *Đồng Tháp: Phát triển vùng chuyên canh nuôi ếch ở huyện Tháp Mười*. <https://thuysanvietnam.com.vn/dong-thap-phat-trien-vung-chuyen-canh-nuoi-ech-o-huyen-thap-muoi/>
- Noga, E. J., (2010). *Fish disease, diagnosis and treatment*. Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9781118786758>
- Pessier, A. P. (2009). Edematous frogs, urinary tract disease, and disorders of fluid balance in amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(1), 4-13. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2008.10.003>
- Roth, T., Foley, J., Worth, J., Piovia-Scott, J., Pope, K., & Lawler, S. (2013). Bacterial flora on Cascade frogs in the Klamath mountains of California. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 36(6), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.002>
- Schuster, F. L., & Ramirez-Avila, L. (2008). Current world status of *Balantidium coli*. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 626-638. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-08>
- Seixas Filho, J. T. D., Hipolito, M., Carvalho, V. D. F., Martins, A. M. C. R. P. D. F., Silva, L. N. D., & Castagna, A. A. (2008). Histopathological alterations in bullfrog tadpoles fed commercial diets with three levels of crude protein. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 2085-2089.
- Seixas Filho, J. T., Navarro, R. D., & Silva, L. N. (2010). Bullfrog tadpoles performance fed commercial ration with different crude protein levels. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5, 428-433.
- Seixas, J. T., Santana, A. C., Martins, A. C. P. F., Mesquita, E. F. M., Mello, S. C. R. P., & Hipolito, M. (2019). Presence of ascites in bullfrog breeders reared and kept on a frog farm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71, 1955-1960. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11143>
- Tait, N. N. (1963). *Studies on the Opalinidae of Australian Frogs: "The Life Cycle of Zelleriella Binucleata (Raff) in the Frog Limnodynastes Tasmaniensis Gunther"*. The Australian National University (Australia).
- Tonguthai, K., Chinabut, S., Somsiri, T., ChanratChakoo, P., & Kanchanakhan, S. (1999). *Diagnostic Procedures for Fish Diseases. Aquatic Animal (Health Research institute (AAHRI). Department of fisheries kasetsart University campus Bangkok, Thailand.*
- Thùy, T. H. (2017). Phân lập và định danh vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên ếch Thái Lan (*Rana tigrina*) nuôi tại khu vực ven đô Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp*, 1, 180-185.
- Uchiyama, M., & Yoshizawa, H. (2002). Nephron structure and immunohistochemical localization of ion pumps and aquaporins in the kidney of frogs inhabiting different environments. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 54, 109-128.
- Vannevel, J. Y. (2006). Glomerulonephritis and anasarca in a colony of frogs. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 9(3), 609-616. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2006.05.034>
- Womble, M. A., Lewbart, G. A., & Shive, H. R. (2020). Pathologic lesions of the budgett frog (*Lepidobatrachus laevis*), an emerging laboratory animal model. *Comparative Medicine*, 70(3), 239-247. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000071>
- Woo, P. T. K. (2006). *Fish diseases and disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. University of Guelph Canada (pp. 205-230). <https://doi.org/10.1079/9780851990156.0000>
- Wright, K. M., & Whitaker, B. R. (2001). *Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger Publishing Company.
- Zhang, M., Chen, H., Liu, L., Xu, L., Wang, X., Chang, L., & Zhu, L. (2020). The changes in the frog gut microbiome and its putative oxygen-related phenotypes accompanying the development of gastrointestinal complexity and dietary shift. *Frontiers in microbiology*, 11, 162-169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00162>