

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU CỦA MỘT SỐ LOẠI KHÁNG SINH ĐỐI VỚI *BALANTIDIUM COLI*

Đỗ Tiến Duy, Dương Tiểu Mai, Tạ Kiều Trinh
Khoa Chăn nuôi - Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân lập và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các loại kháng sinh halquinol, chlortetracycline, oxytetracycline, doxycycline và paromomycin sulfate đối với *Balantidium coli* (*B. coli*). Trong nghiên cứu này, 20 chủng *B. coli* đã được phân lập thành công. Theo dõi quá trình nuôi cấy cho thấy ở thời điểm 24 giờ (g) sau nuôi cấy, số lượng *B. coli* tăng lên đạt đỉnh ($CPM=4,81\pm0,52 \log_{10}$), và tiếp sau đó giảm dần vào lúc 48g ($CPM=4,14\pm0,61 \log_{10}$) sau nuôi cấy ($P<0,05$). Số lượng *B. coli* khi bắt đầu đưa vào môi trường nuôi cấy đạt $CPM=3,9\pm0,25 \log_{10}$ và tăng có ý nghĩa ($P<0,05$) đạt cao hơn 1,0 log sau 24g. Ở các thời điểm sau đó, *B. coli* giảm dần số lượng và suy tàn nhanh chóng để kết thúc sự sống hoàn toàn ở 216g. Thử nghiệm các loại kháng sinh để ức chế *B. coli* cho kết quả như sau: nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của paromomycin là 0,01 mg/ml, tiếp đến là halquinol (0,2 mg/ml), doxycycline (2,81 mg/ml) và oxytetracycline (3,06 mg/ml); riêng đối với chlortetracycline, trong nghiên cứu này chưa xác định được nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với *B. coli*, mặc dù thử nghiệm có 3 lần lặp lại với liều cao (50 mg/ml). Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định được đường cong sinh trưởng của *B. coli* theo phương pháp nuôi cấy hờ và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các kháng sinh nghiên cứu đối với *B. coli*.

Từ khóa: Balantidium coli, heo cai sữa, MIC, kháng sinh.

Isolating and identifying the minimum inhibitory concentration of some antibiotics against *Balantidium coli*

Do Tien Duy, Duong Tien Mai, Ta Kieu Trinh

SUMMARY

The objective of the study was to isolate and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of halquinol, chlortetracycline, oxytetracycline, doxycycline and paromomycin sulfate for *Balantidium coli* (*B. coli*). In this study, 20 isolates of *B. coli* were successfully isolated. Observing the bacteria culture process indicated that at 24 hours (h) after culture, the number of *B. coli* increased to a peak ($CPM = 4.81 \pm 0.52 \log_{10}$), and then gradually decreased at 48 h ($CPM = 4.14 \pm 0.61 \log_{10}$) post culture ($P < 0.05$). The number of *B. coli* at the beginning of inoculation to the culture media reached $CPM = 3.9 \pm 0.25 \log_{10}$ and significantly increased ($P < 0.05$) higher than 1.0 log after 24 hours. At later time-points, *B. coli* number gradually decreased and rapidly declined to terminate life cycle at 216 hours. Testing the inhibition of antibiotics for isolated *B. coli* strains showed that the MIC of paromomycin was (0.01 mg/ml), followed by halquinol (0.2 mg/ml), doxycycline (2.81 mg/ml) and oxytetracycline (3.06 mg/ml). Especially, the MIC of chlortetracycline for *B. coli* in this study was not determined, although the trial had 3 replications at high concentration (50 mg/ml). This is the first success in finding the growth curve of *B. coli* in artificial medium culture and determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of the investigated antibiotics for *B. coli*.

Keywords: Balantidium coli, weaned piglet, MIC, antibiotics.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Balantidium coli (*B. coli*) là một loài nguyên sinh động vật dạng đơn bào, tên gọi khác là trùng lông và là nguyên nhân gây bệnh balantidiasis. *B. coli* sống ký sinh ở đường tiêu hóa của heo và có thể gây bệnh khi có điều kiện thuận lợi (Headley và ctv., 2008). Bệnh xảy ra phổ biến ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, nhất là các nước có ngành chăn nuôi heo đang phát triển với điều kiện vệ sinh chăn nuôi kém (Schuster và Ramirez-Avila, 2008). *B. coli* tồn tại dưới 2 dạng hình thái là trophozoite và dạng cyst, trong đó cyst là dạng gây nhiễm chính trên động vật (Barbosa và ctv., 2015). Biểu hiện lâm sàng trên heo là tiêu chảy phân xám đen hay xám xanh. Dạng trophozoite của *B. coli* có thể xâm nhiễm vào mô bạch huyết của vật chủ để đi đến các cơ quan nội tạng khác của cơ thể (Nilles-Bije và ctv., 2010; Dương Tiểu Mai và ctv., 2015).

B. coli không thường xuyên được phân lập thành công và nhiều nghiên cứu trước đây cho rằng phân lập đơn bào này gặp khó khăn do điều kiện môi trường nhân tạo chưa tối hảo (Schuster và Ramirez-Avila, 2008; Barbosa và ctv., 2015). Môi trường Pavlova gồm có tinh bột gạo, huyết thanh nhau thai bò (FBS), chiết xuất nấm men, một số loại muối (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 và NaCl), và có bổ sung kháng sinh được nghiên cứu và cho kết quả *B. coli* phát triển nhanh và kéo dài sự sống hơn các môi trường được nghiên cứu trước đó. Khả năng kéo dài sự sống của *B. coli* nuôi cấy trên môi trường nhân tạo thường từ 1 tuần đến 24 tháng, tùy theo việc cấy chuyển hoặc bổ sung tiếp dưỡng chất cho sự sống của đơn bào này (Barbosa và ctv., 2015). Nilles-Bije và ctv. (2010) sử dụng môi trường phân lập bao gồm dung dịch Ringer, huyết thanh ngựa (10%) và tinh bột gạo cho kết quả duy trì sự sống của *B. coli* đến 48 giờ (g) ở điều kiện không cấy chuyển (nuôi kín), nhưng ở điều kiện cấy chuyển (nuôi hở) cho thấy sự sống của *B. coli* được duy trì đến 14 ngày.

Bệnh do *B. coli* không gây thành ổ dịch lớn

trên heo, thường ở thể cận lâm sàng hay gây tiêu chảy kéo dài làm heo giảm tăng trọng, do đó ảnh hưởng đến năng suất chăn nuôi (Schuster và Ramirez, 2008). Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây ở nước ta đã cho thấy *B. coli* rất phổ biến ở ca bệnh tiêu chảy trên heo sau cai sữa và gây bệnh nặng nhất là ở các ca bệnh có cường độ nhiễm $\text{CPG} > 3000$ (Dương Tiểu Mai và ctv., 2015; Đỗ Tiến Duy và ctv., 2019). Thực tế, chưa có nhiều công trình nghiên cứu hệ thống công bố kết quả về hiệu quả ức chế của kháng sinh hay hóa chất nào đối với *B. coli* trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*, cũng như việc xác định liều ức chế tối thiểu của kháng sinh ứng dụng trong điều trị và phòng bệnh do *B. coli*. Việc tìm ra loại kháng sinh hữu hiệu với nồng độ ức chế tối thiểu cho *B. coli* qua nghiên cứu này là thực sự quan trọng và cần thiết cho các ứng dụng phòng trị bệnh trên thực tế. Chính vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là bước đầu phân lập *B. coli* trên môi trường nhân tạo để từ đó xác định nồng độ ức chế tối thiểu của một số kháng sinh đối với mầm bệnh này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Bố trí nghiên cứu

20 mẫu phân heo sau cai sữa có triệu chứng tiêu chảy đặc trưng được thu thập từ các trại chăn nuôi ở các tỉnh/thành phía Nam. Mẫu phân sau khi thu thập được soi tươi và xét nghiệm xác định *B. coli* bởi PCR. 20 gốc *B. coli* nuôi cấy thành công được theo dõi vòng sinh trưởng qua các mốc thời gian 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 và 216g. Ở các mốc thời gian, dịch nuôi cấy được xác định số lượng *B. coli* (Cyst per milliliter (CPM), buồng đếm Mc Master). Chọn một gốc *B. coli* đã phân lập thành công, cấy chuyển, định hàm lượng và giải trình tự để cho thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) với một số loại kháng sinh thông dụng (Halquinol 100%, oxytetracycline 98%, doxycycline 90%, chlortetracycline 100%, paromomycin sulfate 20%).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định số lượng *B. coli* trong mẫu phân

Tổng số 20 mẫu phân được soi tươi theo cách thường quy ở kính hiển vi và kết quả dương tính với *B. coli* được sử dụng cho phân lập. Tất cả các gốc *B. coli* này cũng được xác định lại bằng kỹ thuật PCR (mô tả ở mục 2.2.2); sau đó, chọn một gốc từ ca bệnh tiêu chảy đặc trưng nhất để xác định số lượng *B. coli* trên 1 gram phân (cyst per gram: CPG), sau đó phân lập cho thí nghiệm xác định hiệu quả ức chế và nồng độ MIC của một số loại kháng sinh; CPG cần đạt được của gốc *B. coli* này >3000. Xác định số lượng *B. coli* qua buồng đếm Mc Master (Dương Tiểu Mai và ctv., 2015). Lấy 1g phân cho vào một ống falcon có chứa 15ml formaline 10%, khuấy đều và lọc bỏ cặn. Sau đó thêm nước sạch vào cho đủ 50ml, khuấy đều và cho vào ống ly tâm và ly tâm ở 200 vòng/2 phút. Loại bỏ phần nước bên trên và tiếp tục cho nước vào đủ 50ml rồi đem ly tâm, thực hiện liên tục khoảng 7-10 lần hoặc cho đến khi phần nước nổi sau khi ly tâm trong suốt thì đổ bỏ phần nước, thêm nước sạch vào đủ 15 ml. Sau đó hút dung dịch cho lên buồng đếm Mc Master, đếm số lượng *B. coli* trong buồng và tính toán số lượng theo công thức.

2.2.2. Phân lập, PCR và giải trình tự

Tổng cộng 20 gốc *B. coli* được phân lập trong môi trường nuôi cấy nhân tạo Pavlova (Barbosa và ctv., 2015). Kiểm tra sự nhân lên của *B. coli* ở các mốc thời gian 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 và 216g. Xác định số lượng *B. coli* trong dịch nuôi cấy (CPM) ở các mốc thời gian trên bởi buồng đếm Mc Master theo phương pháp được mô tả từ một nghiên cứu trước đây (Anh và ctv., 2017).

Kết quả chu kỳ sinh trưởng của 20 gốc *B. coli*

làm tiền đề cho bố trí mốc thời gian theo dõi hiệu quả ức chế của kháng sinh. Gốc được chọn làm MIC sẽ được định số lượng *B. coli* và đồng thời giải trình tự. Dịch nuôi cấy thuần sẽ được chạy PCR đoạn gen 18s rRNA với cặp mồi đặc hiệu F: 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' và R: 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTTCACCTAC-3', kích thước sản phẩm 1543bp (Nilles-Bije và Rivera, 2010). Thành phần phản ứng và quy trình nhiệt được tham khảo từ các nghiên cứu trước (Nilles-Bije và Rivera, 2010; Anh và ctv., 2017), sử dụng bộ kit thương mại Go Taq® Hot Star Polymerase kit (Promega, Mỹ). Sau đó, sản phẩm PCR được làm tinh sạch (DNA Purify kit, Qiagen, USA) và được gửi tới phòng thí nghiệm Macrogen (Hàn Quốc) để giải trình tự theo phương pháp Sanger sử dụng mô hình trình tự tự động ABI3730XL. Trình tự gốc *B. coli* được phân tích trên cây sinh dòng (unrooted neighbourjoining tree), cùng với các chủng *B. coli* tham khảo từ Ngân hàng Gen (GenBank, NCBI), bằng phần mềm Mega 6, với chỉ số bootstrap 1000.

2.2.3. Xác định khả năng ức chế của kháng sinh đối với *B. coli*

Thử nghiệm ức chế kháng sinh

Dịch phân lập gốc *B. coli* đạt khoảng 10.000 CPM được sử dụng trong thí nghiệm. Nồng độ kháng sinh (Halquinol 100%, oxytetracycline 98%, doxycycline 90%, chlortetracycline 100%, paromomycin sulfate 20%) được pha loãng vào dung dịch nước cất 2 lần (khử ion) theo các mức cao, trung bình và thấp; sau đó 1ml kháng sinh được cho vào 3ml môi trường nuôi cấy (ống nghiệm có nắp vận thông hơi) để theo dõi sự ức chế *B. coli* ở các mốc thời gian 2, 16 và 24g sau

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm và liều kháng sinh pha loãng tương ứng

Liều	Kháng sinh và nồng độ kháng sinh thí nghiệm (mg/ml)					Đối chứng
	Halquinol	Oxytetracycline	Chlortetracycline	Doxycycline	Paromomycin	
Cao	50	49	50	45	10	0
Trung bình	25	24,5	25	22,5	5	0
Thấp	12,5	12,25	12,5	11,25	2,5	0

nuôi cấy, ủ trong tủ ấm theo điều kiện phân lập (37°C). Mẫu đối chứng là nước cất 2 lần, đã khử ion. CPM được xác định qua các mốc thời gian quan sát như trên của các ống môi trường thí nghiệm. Bố trí thí nghiệm và kháng sinh sử dụng có hàm lượng tương ứng được mô tả ở bảng 1. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Từ kết quả trên, mỗi loại kháng sinh được pha loãng nhiều lần theo cấp số 2 (1/2-1/1024) để tiến hành xác định MIC. Sử dụng dịch phân lập *B. coli* (CPM=10.000 CPG). Ở mỗi nồng độ pha loãng có 3 ống nghiệm xem như là các lần lặp lại. Cho 1 ml dịch nuôi cấy *B. coli* vào mỗi ống chứa 1ml kháng sinh đã được pha loãng với các nồng độ giảm dần. Lắc nhẹ đều mỗi ống nghiệm và ủ trong tủ ấm theo điều kiện phân lập (37°C), và kiểm tra kết quả trong 24g. Đánh giá kết quả bằng cách xác định sự sống và định lượng CPM của *B. coli* trong mỗi ống thí nghiệm và ống đối chứng. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là nồng độ kháng sinh thấp nhất (nồng độ ống nghiệm pha loãng cao nhất) đã ức chế hoàn toàn *B. coli* trong 24g quan sát.

2.3. Xử lý số liệu

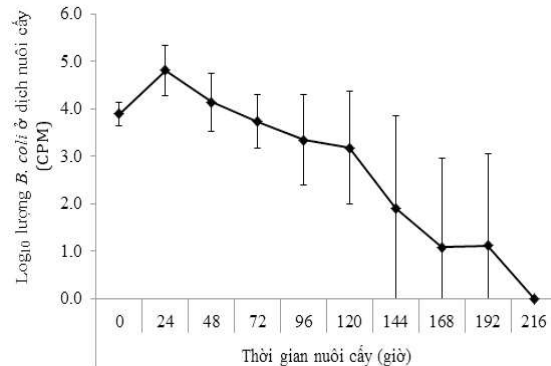
Thí nghiệm được thực hiện ở điều kiện *in vitro*, với sự lặp lại mỗi nghiệm thức là 3 lần, nên các con số kết quả được tính trung bình để có sự chính xác. So sánh sự khác biệt về số lượng *B. coli* trong môi trường nuôi cấy ở các thời điểm, được chuyển sang $\log_{10}$ và phân tích so sánh thống kê bằng phương pháp pair-wise t-test, trên phần mềm MINITAB 16.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập *B. coli*

Hai mươi mẫu phân lập được quan sát theo các mốc thời gian để xác định quá trình tăng trưởng của *B. coli* (hình 1). Số lượng *B. coli* trung bình trong môi trường phân lập giữa các thời điểm 0, 24, 48 và 72g có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P<0,05$). Ở thời điểm 24g sau nuôi cấy, *B. coli* tăng số lượng đạt đỉnh (CPM=4,81±0,52 $\log_{10}$), và tiếp sau đó giảm

dần vào lúc 48g (CPM=4,14±0,61 $\log_{10}$) sau nuôi cấy ($P<0,05$). Số lượng *B. coli* khi bắt đầu cho vào môi trường nuôi cấy đạt CPM=3,9±0,25 $\log_{10}$ và tăng có ý nghĩa ($P<0,05$) đạt cao hơn 1,0 logarit (log) sau 24g. Ở các thời điểm sau đó, *B. coli* giảm dần số lượng và suy tàn nhanh chóng để kết thúc sự sống hoàn toàn ở 216g.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của 20 gốc *B. coli* trong nuôi cấy

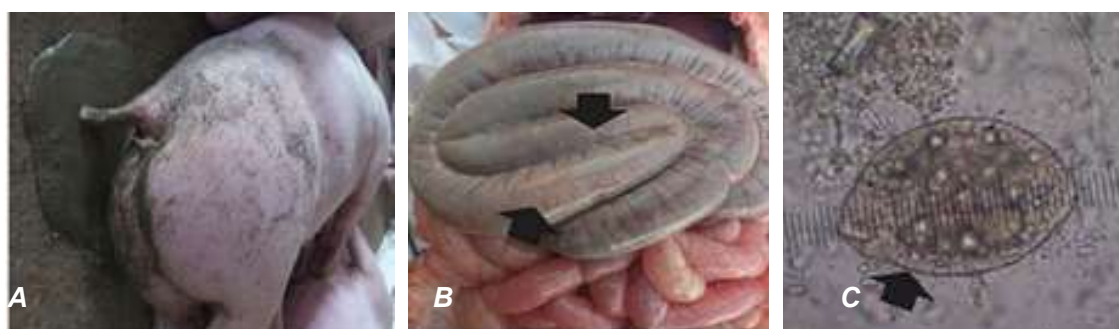
Đỉnh điểm của sự tăng số lượng B. coli lúc 24 giờ, sau đó giảm dần và sự sống kéo dài cho đến 216 giờ. Từ thời điểm 144 đến 216 giờ, có sự biến động rất lớn về số lượng giữa các gốc phân lập

Với kết quả đường cong sinh trưởng phát triển của *B. coli* (hình 1), chúng ta có thể nhận thấy việc thực hiện các thử nghiệm kháng sinh thích hợp nhất vào thời điểm trong 24 giờ kể từ khi bắt đầu nuôi cấy. Mặc dù, thời gian sống của *B. coli* có thể kéo dài hơn 1 tuần đến 24 tháng theo mô tả của các nghiên cứu trước đây (Barbosa và ctv., 2015; Nilles-Bije và ctv., 2010). Yếu tố quyết định cho việc kéo dài sự phát triển của *B. coli* là bổ sung liên tục chất dinh dưỡng thiết yếu hoặc cấy chuyển sang một ống môi trường mới (Schuster và Ramirez-Avila, 2008; Barbosa và ctv., 2015). Tuy nhiên, nếu bổ sung thêm nhiều chất dinh dưỡng vào môi trường hay cấy chuyển sẽ làm thay đổi tính chất và nồng độ pha loãng thuốc thử nghiệm. Môi trường Pavlova với kiểu nuôi cấy không cấy chuyển là phù hợp cho việc thử nghiệm thuốc trong thời gian 24 giờ đầu tiên.

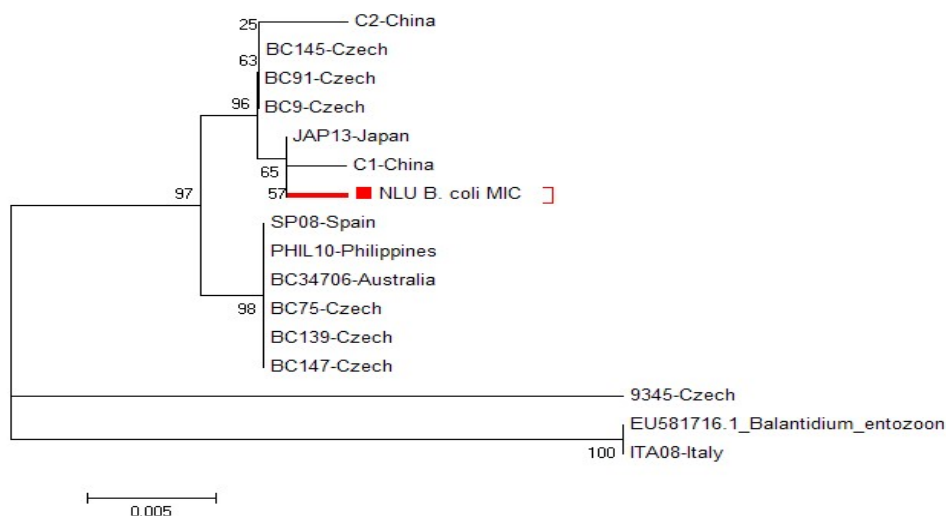
3.2. Kết quả khả năng ức chế của kháng sinh đối với *B. coli*

Gốc *B. coli* sử dụng được phân lập từ ca bệnh đặc trưng (CP>3000) và dấu hiệu heo bệnh lâm sàng như ở hình 2. Kết quả giải trình tự gen 18s

rRNA được phân tích ở cây sinh dòng về mối liên hệ phân tử (hình 3): gốc *B. coli* nghiên cứu có sự tương đồng tương ứng 89,9 % và 99,9 % với chủng *B. coli* tham khảo JAP13 của Nhật Bản và C1-China của Trung Quốc.



Hình 2. Dấu hiệu heo tiêu chảy phân xám xanh (A), bệnh tích kết tràng có nốt hoại tử trắng (B) và trophozoite *B. coli* (C) xem tươi (20X)



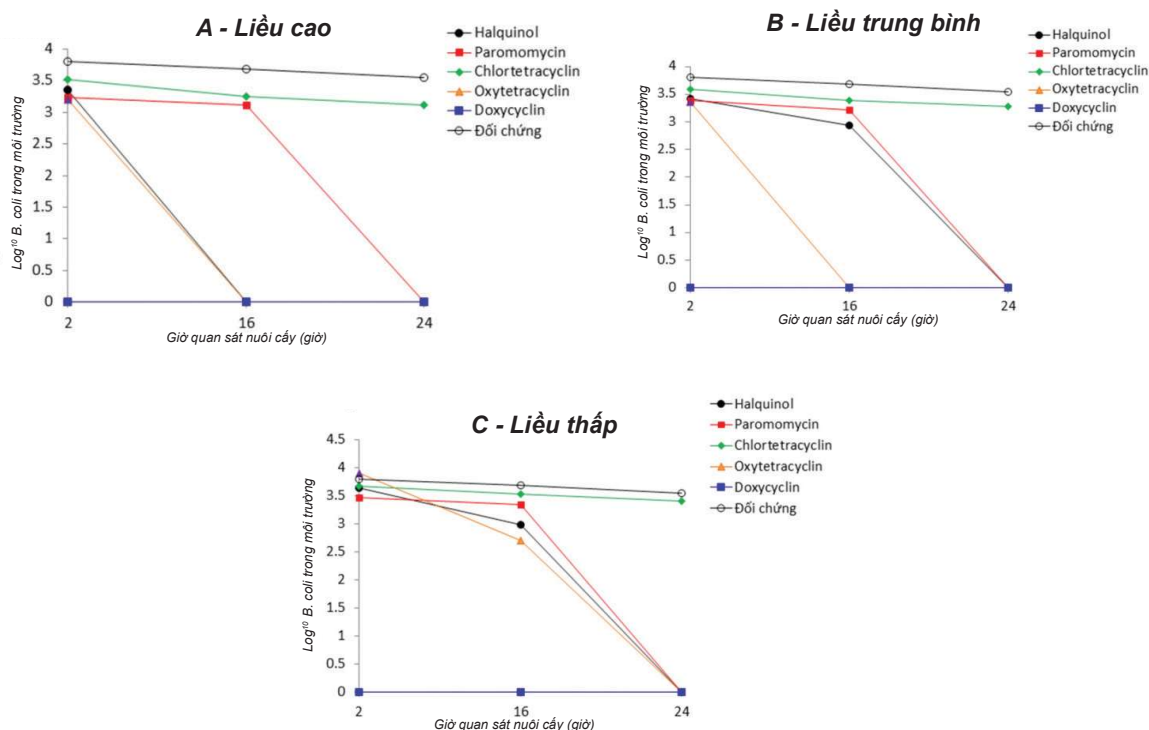
Hình 3. Cây sinh dòng của chủng *B. coli* phân lập để làm MIC cùng với các chủng tham khảo ở GenBank (NCBI). Phương pháp xây dựng cây sinh dòng là Neighboring joining ở phần mềm Mega 6.0, chỉ số bootstrap 1000.

Hình 4 a, b, c cho thấy kết quả nồng độ ức chế tối thiểu của các liều kháng sinh đối với *B. coli* trong ống nghiệm qua các thời điểm 2g, 16g và 24g nuôi cấy. Ở cả 3 nồng độ kháng sinh (cao: 50mg/ml, trung bình: 25mg/

ml và thấp: 12,5 mg/ml), doxycycline cho thấy có khả năng ức chế *B. coli* sớm nhất ở 2g đầu tiên; trong khi chlortetracycline không có hiệu quả ức chế *B. coli* ở cả 3 liều kháng sinh pha loãng. Halquinol có khả năng ức chế *B.*

coli lúc 16g nuôi cấy ở liều cao (50 mg/ml) và 24g ở liều trung bình (25 mg/ml) và thấp (12,5 mg/ml). Oxytetracycline có khả năng ức chế *B. coli* lúc 16g nuôi cấy ở liều cao (49 mg/ml) và liều trung bình (24,5 mg/ml) và 24g ở liều

thấp (12,25 mg/ml). Paromomycin có khả năng ức chế *B. coli* lúc 24g nuôi cấy ở cả 3 liều thí nghiệm gồm cao (10 mg/ml), trung bình (5 mg/ml) và thấp (2,5 mg/ml).



Hình 4. Hiệu quả ức chế của các kháng sinh thể hiện qua $\log_{10}$ số lượng *B. coli* quan sát trong môi trường nuôi cấy ở các mốc thời gian khác nhau.

A: hiệu quả ức chế của các kháng sinh ở liều cao; B: hiệu quả ức chế của các kháng sinh ở liều trung bình; C: hiệu quả ức chế của các kháng sinh ở liều thấp.

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các kháng sinh thí nghiệm được xác định qua thí nghiệm này. Paromomycin có MIC nhỏ nhất (0,01 mg/ml), tiếp đến là halquinol (0,2 mg/ml), doxycycline (2,81 mg/ml) và oxytetracycline (3,06 mg/ml); nhưng riêng đối với chlortetracycline, thí nghiệm này không tìm thấy nồng độ ức chế tối thiểu với *B. coli*, mặc dù thử nghiệm đã có 3 lần lặp lại ở liều cao (50 mg/ml).

Đây là nghiên cứu bước đầu và cũng có thể là đầu tiên ở Việt Nam (theo lược duyệt

thông tin khoa học của nhóm tác giả) về thực hiện phân lập *B. coli* từ heo. Mặc dù kết quả phân lập *B. coli* còn ở dung lượng mẫu nhỏ, nhưng cũng là thành công tốt và hứa hẹn cho các nghiên cứu sâu hơn về xác định cơ chế sinh bệnh, và tính nhạy cảm với kháng sinh hay hóa chất khác. Thực tế, chưa có nghiên cứu chính thống nào công bố về nồng độ ức chế tối thiểu của các loại kháng sinh (Schuster và Ramirez-Avila, 2008), mặc dù có nhiều khuyến cáo về khả năng phòng trị bệnh nhiễm do *B. coli* của halquinol và paromomycin (Depondt, 2018),

oxytetracycline (Schuster và Ramirez-Avila, 2008) và doxycycline (Mahmud và ctv., 2017). Khi không có thông tin khoa học về nồng độ MIC của các loại kháng sinh, sẽ là một trở ngại lớn cho việc định liều phòng trị bệnh. Do đó, nghiên cứu này là một tiền đề quan trọng cho việc chọn lựa kháng sinh hữu hiệu và định liều sử dụng trên heo trong trường hợp phòng bệnh hay điều trị ca mắc bệnh balantidiasis. Mặc dù vậy, hiệu quả thực tế ở mức độ *in vivo* của các kháng sinh ra sao thì cũng cần có nghiên cứu tiếp theo trên heo ở mô hình gây nhiễm điều trị và so sánh hiệu quả trị liệu ở liều cấp khác nhau.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Nghiên cứu đã xác định được đường cong sinh trưởng của *B. coli* theo phương pháp nuôi cấy hờ của môi trường Pavlova. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các kháng sinh paromomycin là 0,01 mg/ml, halquinol là 0,2 mg/ml, doxycycline là 2,81 mg/ml và oxytetracycline là 3,06 mg/ml; nhưng chlortetracycline không có khả năng ức chế *B. coli* ở nồng độ cao 50 mg/ml.

Nghiên cứu cần thực hiện tiếp theo là so sánh hiệu quả phòng trị bệnh do *B. coli* trên heo giữa các loại kháng sinh thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen Hoang Lan Anh, Nguyen Ngoc Duyen Huong, Nguyen Tat Toan, Do Tien Duy, 2017. Optimizing the PCR protocol to detect *Balantidium coli* infected in pigs. *Journal of Agricultural Science and Technology* No 3/2017: 20-28. Nong Lam University – HCMC.
2. Barbosa, AS., Bastos, OM., Uchôa, CM., Pissinatti, A., Ferreira, PR., Dib, LV., Azevedo, EP., de Siqueira MP, Cardozo, ML., Amendoeira, MR., 2015. Isolation and maintenance of *Balantidium coli* (Malmsteim, 1857) cultured from fecal samples of pigs and non-human primates. *Veterinary Parasitology*. 210: 240-245.
3. Chijide MV., 2008. *Balantidiasis*. Department of Medicine, University of Saskatchewan, Consultant in Infectious Diseases, Regina, Saskatchewan, Canada. <<http://emedicine.medscape.com/article/213077-overview>>.
4. Dương Tiểu Mai, Đỗ Tiến Duy, Nguyễn Tất Toàn, 2015. Khảo sát tỷ lệ, cường độ nhiễm và biến đổi mô học ruột do *Balantidium coli* trên heo sai sữa tại một số trại ở các tỉnh phía Nam. *Tạp chí KHKT Thú Y*, số 1/2015, trang 1-9.
5. Đỗ Tiến Duy, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Phạm Huỳnh, Lương Thị Hoàng Anh, Nguyễn Lê Đình Phương, Huỳnh Lưu Cẩm Tú, Lê Võ Trường Duy, Nguyễn Hoàng Lan Anh, Dương Tiểu Mai, Nguyễn Tất Toàn, 2019. Sự đa dạng gen và cơ chế gây bệnh của đơn bào *Balantidium coli* trên heo sau cai sữa. *National conference animal and veterinary sciences*, 2019: 80-84.
6. Đỗ Tiến Duy, Nguyễn Phạm Huỳnh, Nguyễn Văn Nghị, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Huỳnh Lưu Cẩm Tú, Nguyễn Tất Toàn, 2018. Thí nghiệm gây bệnh thực nghiệm *Balantidium coli* trên heo 25 ngày tuổi. *Tạp chí KHKT Thú y*, số 2, trang 43-49.
7. Headley, Selwyn Arlington, Elina Kummala, và Antti Sukura. 2008. *Balantidium coli* - Infection in a Finnish Horse. *Veterinary Parasitology*. 158 (1-2): 129–32.
8. Mahmud, R., Lim, Y.A.L., Amir, A., 2017. Ciliate, in: *Medical Parasitology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 75–78.
9. Nilles-Bije, Rivera, WL., 2010. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. *Parasitology Research*. 106 (2): 387–94.
10. Schuster và Ramirez-Avila, 2008. Current World Status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiol. Reviews*. 21(4): 626–638.
11. Wouter Depondt, 2018. An overview of protozoal pathogens in pigs and their control. *International Pig Topics*. 33 (3): 13-16.

Ngày nhận 29-11-2019

Ngày phản biện 18-1-2020

Ngày đăng 1-3-2020