SO SÁNH HIỆU QUẢ CỦA 2 PHƯƠNG PHÁP THU ẤU TRÙNG GIUN TRÒN Ở CHÓ

Công Hà My, Lê Thị Lan Anh,
Dương Đức Hiếu, Trần Nam Triều, Vũ Hoài Nam,
Trần Thị Kim Lan, Bùi Trần Anh Đào, Bùi Khánh Linh
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Để đánh giá hiệu quả phát hiện ấu trùng giun móc ở chó bằng phương pháp Baermann và phương pháp đĩa thạch, chúng tôi tiến hành thu thập 122 mẫu phân chó để làm vật liệu thí nghiệm nuôi và xác định ấu trùng giun móc. Bằng phương pháp nuôi ấu trùng trên đĩa thạch, đã thu được 47,54% số lượng mẫu phân chứa ấu trùng giun móc, trong khi đó, bằng phương pháp Baermann chỉ thu được 6,56% số lượng mẫu phân có ấu trùng giun móc. Kết quả thí nghiệm này cũng cho thấy phương pháp nuôi ấu trùng giun móc trên đĩa thạch có nhiều lợi thế hơn so với phương pháp Baermann, đó là thời gian thu ấu trùng giun móc nhanh, thiết kế hệ thống thí nghiệm đơn giản, dễ dàng vận hành.

Từ khoá: Ấu trùng giun móc, phương pháp thu ấu trùng giun móc trên thạch, Baermann.

Comparing efficacy of 2 methods on nematoda larvae collection in dogs

Cong Ha My, Le Thi Lan Anh,
Duong Duc Hieu, Tran Nam Trieu, Vu Hoai Nam,
Tran Thi Kim Lan, Bui Tran Anh Dao, Bui Khanh Linh

SUMMARY

In order to compare the efficacy of detecting hookworm larvae in dogs between the Baermann method and Agar plate culture method, a total of 122 dog fecal samples were collected as the experimental materials for culturing and determining the hookworm larvae. By the Agar plate culture method, the hookworm larvae were detected in 47.54% of the fecal samples, meanwhile, by Baermann method, the hookworm larvae were detected in 6.56% of fecal samples only. In addition, detecting hookworm larvae by Agar plate culture method presented several advantages in comparison with Baermann method, such as: short time for dectecting hookworm larvae; simple experimental design and operation.

Keywords: Hookworm lavae, agar plate culture, Baermann collection methods.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tình trạng nhiễm bệnh giun tròn truyền qua đất (Soil-transmitted helminth infections - STHs) là vấn đề phổ biến trên toàn thế giới và ảnh hưởng đặc biệt đến những nơi có điều kiện sống thấp kém, nước sinh hoạt không bảo đảm hay đất bị ô nhiễm, vệ sinh cá nhân và vệ sinh môi trường có nhiều hạn chế hay sự hiểu biết về y tế của cộng đồng còn thấp. Theo báo cáo của WHO năm 2020, ước tính trên 1,5 tỷ người đang nhiễm STHs, chiếm 24% dân số thế giới, với tỷ lệ cao nhất ở châu Phi, Trung Quốc và các nước Đông Nam Á. Để chẩn đoán STHs cần dựa vào phát hiện ấu trùng trong phân. Tuy nhiên, hầu hết trường hợp nhiễm xảy ra cấp tính, lượng trứng thải trong phân rất ít, làm giảm độ nhạy của phương pháp. Riêng 2 loài giun móc và giun lươn có vòng đời trực tiếp, ấu trùng có thể không nở trong cơ thể vật chủ mà nở ngay bên ngoài môi trường, khiến việc xét nghiệm

phân tìm trứng/ấu trùng trở nên khó khăn.

Phương pháp Baermann là phương pháp thường được sử dụng để thu ấu trùng giun tròn. Tuy nhiên phương pháp có một số nhược điểm: hệ thống thiết kế thí nghiệm cồng kềnh, khả năng phát hiện không cao do ấu trùng có khả năng bám vào hệ thống ống dẫn hay vải gạc, khiến việc chẩn đoán trở nên khó khăn. Bên cạnh đó, phương pháp thạch agar là một trong những phương pháp hiện đang được sử dụng tại một số phòng thí nghiệm ký sinh trùng trên thế giới để thu ấu trùng rất hiệu quả (Buonfrate và cs., 2015; Jucelene, 2003) nhưng chưa được giới thiệu tại Việt Nam. Phương pháp sử dụng môi trường thạch để trứng từ mẫu phân nở trực tiếp trên bề mặt thạch, giúp quan sát dễ dàng và có độ nhạy cao, phát hiện ấu trùng nhanh hơn, chính xác, rút ngắn thời gian và kinh phí cho những nghiên cứu sâu hơn để chẩn đoán sớm bệnh giun tròn truyền lây sang người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành so sánh phương pháp thu ấu trùng bằng phương pháp thạch với phương pháp Baermann - là phương pháp nuôi ấu trùng thường quy được dùng ở hầu hết các phòng thí nghiệm ký sinh trùng tại Việt Nam, với mục đích để cập nhật trong giảng dạy tại các trường đại học cũng như tìm ra phương pháp có khả năng thu được lượng lớn ấu trùng phục vụ cho các thí nghiệm chuyên sâu hơn về giun tròn, ứng dụng trong phòng trị bệnh.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu thập mẫu

Các mẫu phân chó được thu thập theo phương pháp ngẫu nhiên tại Phú Thọ, Bắc Ninh và Hà Nội. Mẫu được kiểm tra tại phòng thí nghiệm Bộ môn Ký sinh trùng – Khoa Thú y – Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nuôi ấu trùng giun tròn trên đĩa thạch

Chuẩn bị môi trường thạch agar 20%, cho vào các đĩa petri nhỏ. Lấy 2 gram phân đặt vào chính giữa đĩa thạch. Để đảm bảo ấu trùng không phát tán ra bên ngoài, lồng đĩa thạch (đường kính 30mm) vào trong đĩa petri to (đường kính 90mm), đổ khoảng 5ml Glycerin 25% vào đĩa petri to và đậy nắp lại. Sau đó để đĩa thạch vào tủ ấm 37^{0}C qua đêm. Hàng ngày kiểm tra sự có mặt của ấu trùng trên đĩa thạch bằng kính hiển vi soi nổi (giun móc được sử dụng làm model nghiên cứu, vì giun móc thuộc nhóm giun tròn).

2.3. Phương pháp Baermann

Lắp đặt hệ thống Baermann: đặt phễu thủy tinh lên giá, lắp ống cao su vào đáy phễu và khoá chặt ống cao su lại. Đặt 5 g phân vào giữa tấm vải xô, buộc lại bằng dây cao su để tạo thành túi, sau đó đặt túi vào phễu thuỷ tinh. Thêm nước ấm vào phễu cho đến khi nước ngập mặt túi phân. Để yên qua đêm. Hàng ngày kiểm tra sự có mặt của ấu trùng bằng cách mở khoá ống cao su, hứng nước vào cốc thuỷ tinh và soi dưới kính hiển vi.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng phương pháp thống kê sinh học thông qua phần mềm Microsoft Excel 2019.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Để so sánh tỷ lệ phát hiện ấu trùng thu được từ phương pháp Baermann và phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch, chúng tôi kiểm tra trên 122 mẫu phân chó và kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Trong tổng số 122 mẫu xét nghiệm, tỷ lệ dương tính với giun tròn qua phương pháp nuôi cấy trên thạch là 58/122 (47,54%), trong khi đó chỉ có 8/122 (6,56%) được ghi nhận ở phương pháp Baermann. Nếu coi phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch là phương pháp chuẩn với độ nhạy 100% thì độ nhạy của phương pháp Baermann ứng dụng trong chẩn đoán ấu trùng giun tròn ký sinh là rất thấp, chỉ đạt 13,79%. Ở phương pháp Baermann trong quá trình thu, ấu trùng có thể bám vào vải gạc hoặc hệ thống

Bảng 1. Tỷ lệ nhiễm ấu trùng giun tròn ký sinh ở chó thông qua phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch và phương pháp Baermann (n = 122)

Phương pháp	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ (%)
Nuôi ấu trùng trên thạch	58	47,54
Baermann	8*	6,56

*Ghi chú: *8 mẫu dương tính ghi nhận đồng thời ở cả hai phương pháp xét nghiệm*

ống dẫn làm giảm tỷ lệ phát hiện, trong khi đó phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch, ấu trùng có thể nở và được duy trì ngay trên bề mặt thạch.

Kể từ khi phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch được giới thiệu bởi Arakaki và cs. vào năm 1990 để phát hiện ấu trùng giun lươn *S. stercoralis*, một số nghiên cứu đã tiến hành đánh giá hiệu quả của phương pháp này với các phương pháp khác, tất cả đều cho thấy hiệu quả vượt trội của phương pháp nuôi cấy trên thạch cao hơn phương pháp Baermann. Kết quả nghiên cứu của Ines Ede J và cs. (2011) cũng chỉ ra rằng tỷ lệ phát hiện ấu trùng bằng phương pháp Bearmann (72,5%) thấp hơn phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch (95%).

Kết quả so sánh một số chỉ tiêu như: lượng phân, thời gian, nhiệt độ giữa 2 phương pháp Baermann và thu ấu trùng trên thạch nhằm tìm ra phương pháp đạt được điều kiện nuôi lý tưởng nhất được thể hiện ở bảng 2.

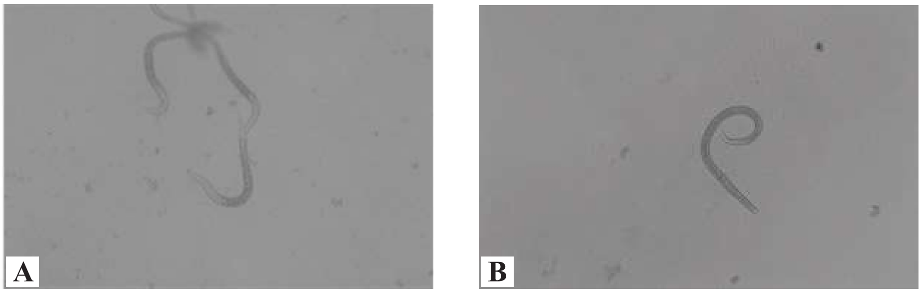
Bảng 2. So sánh các chỉ tiêu giữa 2 phương pháp thu ấu trùng

Chỉ tiêu	Nuôi ấu trùng trên thạch	Baermann
Lượng phân	2 gram	5 gram
Thời gian quan sát thấy ấu trùng	24 - 48 giờ	48 - 96 giờ
Nhiệt độ	25-27^{0}C	25-27^{0}C

Có thể thấy phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch có thời gian quan sát thấy ấu trùng ngắn hơn và lượng phân sử dụng cho phương pháp ít hơn so với phương pháp Baermann. Tương tự, 1 nghiên cứu khác cũng chứng minh phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch có khả năng thu nhanh số lượng ấu trùng hơn so với phương pháp Baermann và Harada-Mori (Reiss và cs., 2007). Thời gian ủ càng lâu sẽ làm tăng hiệu quả của việc phát hiện ấu trùng, cụ thể là 7 ngày đối với thí nghiệm của Jongwutiwes (1999).

Tại Việt Nam, phương pháp thường được dùng để nuôi ấu trùng tại các phòng thí nghiệm thú y là Baermann. Phương pháp này đã được nghiên cứu cải tiến để nâng cao hiệu quả trong việc thu ấu trùng (Chiejina S.N., 1982; Persson L., 1974) nhưng vẫn có nhiều hạn chế, một trong số đó là với mỗi mẫu cần xét nghiệm thì phải đi kèm một hệ thống nuôi riêng rất cồng kềnh, thời gian để ấu trùng nở dài hơn và độ nhạy thấp. Trong khi đó, phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch có thể tiến hành với số lượng mẫu lớn, thu được ấu trùng với tỷ lệ cao mà một số phương pháp chẩn đoán thông thường rất khó để phát hiện (Kotze AC và cs., 2004), hệ thống nuôi đơn giản, tiết kiệm chi phí, thao tác dễ dàng, cũng như thu được toàn bộ ấu trùng mà không bị lẫn tạp bẩn. Điều này rất có ý nghĩa trong việc cung cấp lượng lớn kháng nguyên có thể tinh sạch dễ dàng, giúp chủ động cung cấp nguyên liệu, rút ngắn thời gian và kinh phí cho những nghiên cứu sâu hơn để chẩn đoán sớm bệnh giun móc truyền lây sang người, điều chế chế phẩm sinh học ứng dụng trong điều trị.

Hơn nữa, phương pháp thạch còn cho phép quan sát sự chuyển động của ấu trùng trên bề mặt thạch. Để so sánh hình thái ấu trùng giun móc ở 2 phương pháp, hình ảnh được chụp lại ngay sau khi thu và thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Hình thái ấu trùng giun móc thu bằng phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch (A) và bằng phương pháp Baermann (B), (vật kính 10X)

Không có sự khác biệt rõ ràng về hình thái ấu trùng giun móc thu được từ 2 phương pháp, tuy nhiên ấu trùng thu được ở phương pháp thạch có khả năng di động mạnh, còn ở lô thu bằng phương pháp Baermann thì ấu trùng chuyển động chậm hoặc hầu như không chuyển động. Do đó, ngoài việc hỗ trợ phát hiện ấu trùng trong phân (Hailegebriel và cs., 2017), phương pháp thạch còn được ứng dụng để kiểm tra tác động của các loại thuốc ngừa ký sinh trùng lên sự phát triển của giun móc, cũng như kiểm tra sự kháng thuốc ở loài này (Tritten và cs., 2011; Kopp và cs., 2008).

Việc ứng dụng phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch sẽ rất hữu ích để xác định các yêu cầu về sinh trưởng và phát triển của giun móc, cũng như dễ dàng mô tả được tác động của các hợp chất từ vi khuẩn trong cơ thể vật chủ đối với ấu trùng (Reiss và cs., 2007). Cụ thể, có thể điều chỉnh nhiệt độ cũng như bổ sung các điều kiện cần thiết khác cho sự phát triển của ấu trùng như bổ sung vi khuẩn để làm nguồn thức ăn cho ấu trùng (McCoy, 1929) hay hạn chế sự phát triển của nấm trong môi trường nuôi do sự phát triển của nấm trong môi trường khiến ấu trùng có thể bị bắt giữ bởi những sợi nấm, từ đó làm giảm khả năng di chuyển và thu nhận thức ăn của ấu trùng (Braga, 2009).

Bên cạnh đó, các nghiên cứu về giun tròn đòi hỏi việc duy trì vòng đời để xác định các đặc tính hóa sinh, phân tử hoặc dinh dưỡng liên quan đến các giai đoạn của giun tròn trong điều kiện phòng thí nghiệm. Phương pháp thạch có thể nuôi ấu trùng từ giai đoạn trứng trong phân đến giai đoạn gây nhiễm (L3), quan sát được sự biểu hiện hoặc không biểu hiện của các gen mục tiêu trong quá trình phát triển của giun tròn nói riêng và các loài ký sinh trùng khác nói chung.

IV. KẾT LUẬN

Trong tổng số 122 mẫu xét nghiệm, tỷ lệ phát hiện giun móc bằng phương pháp nuôi cấy trên thạch là 47,54%, cao hơn đáng kể so với phương pháp Baermann (6,56%). Ngoài ra, phương pháp nuôi ấu trùng trên thạch có thời gian quan sát thấy ấu trùng ngắn hơn và lượng phân sử dụng cho phương pháp ít hơn so với phương pháp Baermann truyền thống. Từ những ưu điểm trên, chúng tôi khuyến nghị đưa phương pháp thạch ứng dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm ký sinh trùng.

Lời cảm ơn: *Cảm ơn bộ môn Ký sinh trùng trường Đại học Miyazaki đã chuyển giao phương pháp thạch phát hiện ấu trùng.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arakaki, T., M. Iwanaga, F. Kinjo, A. Saito, R. Asato, and T. Ikeshiro, 1990. Efficacy of agar plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *International Journal for Parasitology*; 76: 425–428

2. Buonfrate, D; Formenti, F; Perandin, Fand Z. Bisoffi, 2015. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 21(6).

3. Chiejina SN, 1982. Evaluation of modified Baermann apparatus for the recovery of infective trichostrongylid larvae from herbage samples. *Journal of Helminthology*; 56: 105 – 109.

4. F.R. Braga, R.O. Carvalho, J.M. Araújo, A.R. Silva, J.V. Araújo, W.S. Lima, A.O. Tavela, S.F. Rodrigo, 2009. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae. *Journal of Helminthology*; 83: 303 - 308.

5. Hailegebriel T, Petros B, Endeshaw T., 2017. Evaluation of Parasitological Methods for the Detection of *Strongyloides Stercoralis* among Individuals in Selected Health Institutions in Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Sciences*; 27 (5): 515–522.

6. Ines Ede J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva ML, 2011. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop*; 120(3): 206 – 210.

7. Jongwutiwes, S., Charoenkorn, M., Sitthichareonchai, P., Akaraborvorn, P., & Putaporntip, C., 1999. Increased sensitivity of routine laboratory detection of Strongyloides stercoralis and hookworm by agar-plate culture. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 93(4): 398–400.

8. Jucelene Marchi Blatt and Geny Aparecida Cantos, 2003. Evaluation of Techniques for the Diagnosis of *Strongyloides stercoralisn* Human Immunodeficiency Virus (HIV) Positive and HIV Negative Individuals in the City of Itajaí, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 7(6):402-408

9. Kopp, S. R., Coleman, G. T., mccarthy, J. S., & Kotze, A. C., 2008. Application of *in vitro* anthelmintic sensitivity assays to canine parasitology: Detecting resistance to pyrantel in *Ancylostoma caninum*. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4): 284–293.

10. Kotze AC, Clifford S, O'Grady J, Behnke JM, McCarthy JS., 2004. An *in vitro* larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* ; 71: 608 – 616.

11. McCoy, O. R., 1929. The growth of hookworm larvae on pure cultures of bacteria. *Science*, 69 (1777): 74–75.

12. Persson L., 1974. A modified baermann apparatus for the recovery of infective nematode larvae from herbage and manure. *Zentralbl Veterinarmed*; 21: 483 – 488.

13. Reiss, D., Harrison, L.M., Bungiro, R., Cappello, M., 2007. Short report: an agar plate method for culturing hookworm larvae: analysis of growth kinetics and infectivity compared with standard coproculture techniques. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 77 (6): 1087–1090.

14. Tritten, Lucienne *et al.*, 2011. *In vitro* and *in vivo* efficacy of Monepantel (AAD 1566) against laboratory models of human intestinal nematode infections. *PLoS neglected tropical diseases*. 5(12): e1457.

15. World Health Organisation, 2020. Soil-transmitted helminth infections. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections.

Ngày nhận 15-2-2020
Ngày phản biện 26-3-2020
Ngày đăng 1-6-2020