

THIẾT LẬP PHƯƠNG PHÁP ELISA CHẨN ĐOÁN BỆNH SÁN DÂY DO *ECHINOCOCCUS* SPP. GÂY RA TRÊN LINH TRƯỞNG

*Nguyễn Thị Nhiên, Bùi Trần Anh Đào, Nguyễn Văn Phương,
Nguyễn Thị Hồng Chiên, Lê Thị Lan Anh, Vũ Hoài Nam,
Bùi Thị Huyền Thương, Bùi Khánh Linh*

Bộ môn Ký sinh trùng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Bệnh nang sán do *Echinococcus orteppi* gây ra tại Trung tâm cứu hộ linh trưởng nguy cấp (EPRC), vườn quốc gia Cúc Phương là một trong những nguyên nhân chính ảnh hưởng tới sức khỏe và tính mạng của các cá thể linh trưởng. Nghiên cứu được tiến hành nhằm thiết lập phản ứng ELISA có giá trị chẩn đoán bệnh trên linh trưởng, sử dụng kháng nguyên từ dịch nang sán. Kết quả đã xác định được độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 100% và 91,67%; với giá trị ngưỡng là 0,25. Phương pháp ELISA được thiết lập để ứng dụng trong chẩn đoán bệnh nang sán nhằm giảm tối đa thiệt hại về tính mạng cho động vật linh trưởng ở EPRC.

Từ khóa: Echinococcus, linh trưởng, ELISA, độ nhạy, độ đặc hiệu.

Establishing ELISA method for diagnosing tape worm caused by *Echinococcus* spp. in primates

*Nguyen Thi Nien, Bui Tran Anh Dao,
Nguyen Van Phuong, Nguyen Thi Hong Chien, Le Thi Lan Anh,
Vu Hoai Nam, Bui Thi HuyenThuong, Bui Khanh Linh*

SUMMARY

Cystic disease caused by *Echinococcus orteppi* at the Endangered Primate Rescue Center (EPRC), Cuc Phuong National Park is one of the main causes affecting the health and life of primates. The study was conducted to establish an ELISA reaction having disease diagnostic value in the primates, using antigens from cystic fluid. The studied results showed that sensitivity and specificity of ELISA method were identified with 100% and 91.67%, respectively, with a threshold value of 0.25. This ELISA method would be applied to diagnose cysticercosis to minimize the loss of life for primates in EPRC.

Keywords: Echinococcus, primates, ELISA, sensitivity, specificity.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do sán dây *Echinococcus* gây ra là bệnh một bệnh truyền lây nguy hiểm, có thể phát triển trong cơ thể nhiều năm mà không có biểu hiện điển hình (Deplazes và cs., 2001), chúng có khả năng tạo nang nước gây tổn thương các cơ quan như gan, thận, phổi, thậm chí là cả tim và não. Khi vật chủ trung gian tiêu hoá phải mầm bệnh, ấu trùng metacestodes có thể ký sinh trong nhiều cơ quan như gan, thận hoặc phổi; từ đó chúng phát triển thành nang sán (Kamenetzky

và cs., 2002). Nang sán phát triển dần trong cơ thể, chèn ép các cơ quan và ảnh hưởng tới chức năng của các cơ quan, khiến vật chủ đau đớn trong thời gian dài, đôi khi phát triển trong não gây tử vong (Kvascevicius *et al.*, 2016). Ký chủ nhiễm nang sán chủ yếu là do tiêu hoá phải thức ăn, đất, hoặc nước ô nhiễm với mầm bệnh từ phân chó. Các trường hợp linh trưởng nhiễm sán *Echinococcus* đã được báo cáo ở các nơi trên thế giới. Cụ thể, linh trưởng chết ở Hokkaido do nang sán đã được quan sát ở 3 trên tổng cộng 4 vườn thú chính; bao gồm một cá thể khi đột

(*Gorilla gorilla*), vượn cáo (*Lemur catta*) ở vườn thú Asahiyama năm 1994 (Kondo và cs., 1996), một cá thể đười ươi (*Pongo pygmaeus*) (Taniyama và cs., 1996) và khỉ Macaques Nhật Bản (*M. fuscata*) ở vườn thú Kushiro vào năm 1992 và vườn thú Obihiro năm 1998 (Sato và cs., 2005; Yamano và cs., 2009). Trong số này, trường hợp cuối cùng ở vườn thú Obihiro là dịch bùng phát khiến 12 cá thể khỉ trong đàn (n=57) dương tính với *E. multilocularis*. Tuy nhiên, tới nay các nghiên cứu về *Echinococcus* spp. vẫn còn rất hạn chế tại Việt Nam.

Trung tâm cứu hộ linh trưởng nguy cấp (EPRC) thuộc vườn quốc gia Cúc Phương, Ninh Bình, cũng phát hiện sự tồn tại của sán dây *Echinococcus* với tỷ lệ nhiễm rất cao, đặc biệt là ở 2 loài voọc và chà vá với tỷ lệ nhiễm nang sán đến 75%. Mô khám các cá thể chết và tiến hành chẩn đoán sinh học phân tử đã xác định được chỉ duy nhất loài *E. ortleppi* (Plesker và cs., 2009). Gần đây, ngày càng nhiều ca nhiễm *E. ortleppi* được báo cáo ở châu Âu, Nam Mỹ, châu Phi và châu Á (Rojas và cs., 2014). Tình trạng nang sán do *E. ortleppi* đã được ghi nhận xuất hiện trên người tại Thanh Hoá, khu vực tiếp giáp Ninh Bình, cho thấy sự lưu hành của mầm bệnh trong khu vực (De và cs., 2017). Một trường hợp nhiễm *E. ortleppi* trên người cũng đã được ghi nhận tại Trung Quốc (Shi và cs., 2019).

Để chẩn đoán bệnh, phương pháp chẩn đoán hình ảnh, thông qua siêu âm và chụp X-quang, hoặc các phương thức như chụp cắt lớp vi tính (CT) và cộng hưởng từ (MRI) là những phương pháp phổ biến (Brunetti và cs., 2018). Tuy nhiên các phương pháp này chỉ có thể phát hiện bệnh khi nang sán đã hình thành bên trong cơ thể vật chủ, gây ra những triệu chứng nặng nề, thậm chí đe dọa tính mạng vật chủ.

Phương pháp huyết thanh học là những công cụ hỗ trợ giúp cho quá trình chẩn đoán bệnh được chính xác. Nhiều phương pháp đã được phát triển và sử dụng để chẩn đoán trên người, đáng chú ý là phương pháp ELISA đã được thương mại hóa thành kit, đem lại kết quả có độ nhạy và độ đặc

hiệu cao khi ứng dụng (Biava và cs., 2001). Hầu hết các nghiên cứu chẩn đoán đều sử dụng ELISA do tính chính xác cao và nhanh chóng trong việc chẩn đoán bệnh nang sán *Echinococcus*, nhưng các đối tượng của chẩn đoán chủ yếu là chó và con người (Aydın và cs., 2018). Các loài động vật hoang dã như linh trưởng hầu như vẫn chưa được quan tâm nhiều trong công tác chẩn đoán căn bệnh này, trong khi tỷ lệ nhiễm trên linh trưởng có thể cao hơn rất nhiều so với chó và con người. Vì vậy, việc thiết lập phương pháp chẩn đoán ELISA giúp phát hiện sớm bệnh nang sán do *Echinococcus* gây ra trên quần thể linh trưởng là rất cần thiết, góp phần đề xuất các biện pháp điều trị kịp thời và phòng ngừa bệnh tại trung tâm.

Với tỷ lệ nhiễm cao gây ảnh hưởng lớn đến sức khoẻ linh trưởng nói riêng và cộng đồng nói chung, cần phải có công cụ chẩn đoán có độ nhạy, độ chính xác cao và đi cùng đó là có khả năng phát hiện bệnh sớm để có những biện pháp điều trị kịp thời, cũng như giảm thiểu tối đa nguy cơ truyền lây. Nghiên cứu thiết lập phương pháp ELISA với mục tiêu chẩn đoán sớm bệnh nang sán *Echinococcus* trên linh trưởng, góp phần vào công việc cứu hộ và bảo tồn linh trưởng nguy cấp của trung tâm.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Tình hình mắc bệnh nang sán *Echinococcus* trên linh trưởng tại Trung tâm cứu hộ linh trưởng nguy cấp (EPRC), vườn quốc gia Cúc Phương.
- Thiết lập phương pháp ELISA với mục tiêu chẩn đoán sớm bệnh nang sán *Echinococcus* trên linh trưởng.

2.2. Nguyên liệu

- Kháng nguyên

Kháng nguyên được sử dụng là kháng nguyên từ dịch nang sán thu thập từ phổi của voọc đã chết. Nang sau khi được tách khỏi cơ thể, hút toàn bộ dịch nang sán cho vào ống 1,5ml. Hỗn dịch sau đó được ly tâm ở 6.000

vòng/phút trong 10 phút, thu phần dịch nổi và bảo quản trong -20°C.

- Huyết thanh âm và huyết thanh dương

Mẫu huyết thanh được thu thập từ những cá thể linh trưởng tại trung tâm cứu hộ bao gồm 8 mẫu dương (có hình thành nang) và 12 mẫu âm (không hình thành nang) đã được xác định bằng phương pháp mổ khám phi toàn diện. Mẫu máu được ly tâm 3.000 vòng trong 5 phút, thu phần huyết thanh bên trên và bảo quản trong -20°C cho đến khi dùng.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết lập phương pháp ELISA gián tiếp

Nồng độ pha loãng kháng nguyên và kháng thể thích hợp được thực hiện theo phương pháp của Bruno Gottstein (trường đại học Bern, Thụy Sĩ). Pha loãng kháng nguyên EgHF (1mg/ml) thành kháng nguyên có nồng độ 5µg/ml với dung dịch đệm natri cacbonat 0,1M pH=9,6 bằng cách hút 75 µl EgHF và 15ml dung dịch đệm natri cacbonat, trộn đều và nhỏ lên đĩa 96 giếng mỗi giếng 120µl. Ủ qua đêm ở 4°C sau đó rửa 2 lần với 300µl /1 giếng bằng dung dịch PBS-T. Khoá những vị trí không gắn protein bằng dung dịch blocking buffer (PBS chứa 5 % skim milk), mỗi giếng 300µl, ủ ở 37°C trong 30 phút. Kháng thể được pha loãng với dung dịch PBS-T theo tỷ lệ 1/100. Hút 100 µl kháng thể đã được pha loãng vào mỗi giếng và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó rửa 3 lần với PBS-T, mỗi giếng 300 µl. Kháng thể (Goat anti- Primate IgG (H+L) được pha loãng với PBS-T ở nồng độ 1/5000, nhỏ lên mỗi giếng 100 µl, ủ ở 37°C trong 1 giờ. Nhỏ 100 µl cơ chất (2 viên pNPP substrate với 12,8 ml substrate buffer, trộn đều, ủ ở 37°C trong 10 phút) đã pha loãng vào mỗi giếng và ủ ở 37°C trong 15 phút. Dừng phản ứng bằng NaOH 3M, hút 50 µl NaOH 3M vào mỗi giếng. Đọc kết quả ở bước sóng 450nm/630nm.

2.3.2. Mổ khám phi toàn diện

Những cá thể vọc đã chết được tiến hành mổ khám phi toàn diện theo phương pháp của K.I.Skrjabin (1928). Những nang sản thu được

được rửa sạch trong nước muối sinh lý và ghi nhãn, mang về phòng thí nghiệm để tiến hành thu kháng nguyên.

2.3.3. Xử lý số liệu

Số liệu được ghi chép và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Phân tích đường cong ROC (receiver operating characteristic curve), độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng sử dụng phần mềm Graphpad Prism 9.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

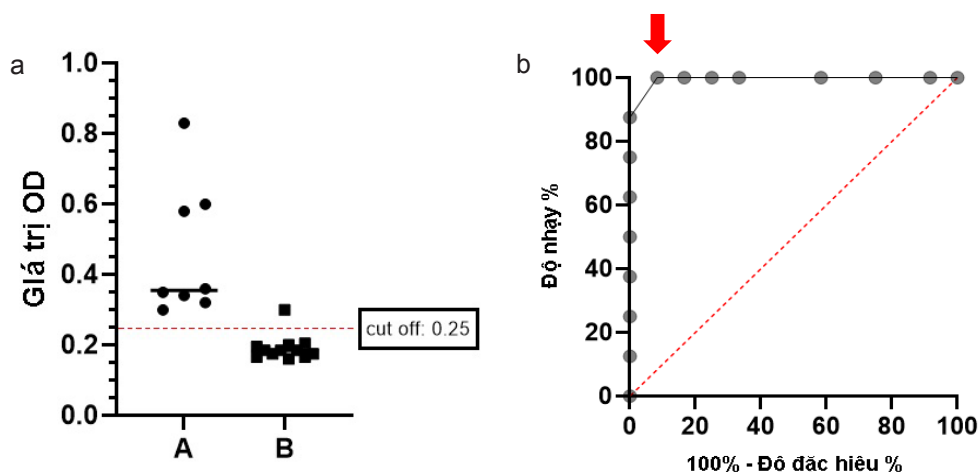
Các xét nghiệm huyết thanh học rất quan trọng trong chẩn đoán phân biệt các khối u như u nang đơn giản, áp xe và khối u, và để hỗ trợ chẩn đoán trước khi phẫu thuật, theo dõi tình trạng tái phát sau phẫu thuật và điều trị thành công (Kishimoto và cs., 2009). Độ nhạy và độ đặc hiệu của các xét nghiệm huyết thanh học có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố như loại và dạng chuẩn bị của kháng nguyên được sử dụng, các tiêu chí dương tính khác nhau, khả năng tồn tại của u nang, vị trí u nang và chủng ký sinh trùng (Karadağ và cs., 2013). Phương pháp ELISA sử dụng một giá trị ngưỡng (cut-off) để phân biệt kết quả dương tính và âm tính, và tùy vào mỗi giá trị ngưỡng khác nhau sẽ cho kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng là khác nhau. Mục tiêu của thí nghiệm là xác định giá trị cut-off cho kết quả giá trị độ nhạy cao nhất, phù hợp với đối tượng xét nghiệm là động vật quý hiếm, cần phải chẩn đoán được bệnh. Giá trị ngưỡng (cut-off), độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng ELISA được trình bày tại hình 1 và bảng 1.

Chúng tôi đã xác định được 8 cá thể linh trưởng có hình thành nang ở các cơ quan khác nhau trong cơ thể, trong đó có 4 cá thể phát hiện thấy nang ở vùng ngực, và các cá thể còn lại phát hiện thấy chủ yếu ở vùng thận, trong đó giá trị OD cao nhất ghi nhận được là 0,83 của cá thể ký hiệu 7-45. Cá thể này đã chết ở trung tâm, qua quá trình mổ khám đã phát hiện thấy nang sản *Echinococcus* ở trong nội tạng. Thông thường, nang phát triển nhưng không gây nên triệu chứng rõ rệt trong thời gian dài cho đến khi nang phát

triển đủ lớn, chúng sẽ chèn ép cơ quan ký sinh, dẫn đến tử vong. Nếu nang vỡ có thể gây phản ứng dị ứng với kháng nguyên của ký sinh trùng hoặc phát tán các u nang con (daughter cysts) khắp cơ thể (Yilmaz và cs., 2012).

Kết quả phân tích ROC ở hình 1b cho thấy, với giá trị cut off là 0,25; độ nhạy của phản ứng là 100%, tương ứng với việc tất cả các cá thể phát hiện thấy nang đều cho kết quả ELISA dương tính. Độ đặc hiệu tương ứng là 91,67 %.

Phương pháp ELISA này có thể được sử dụng để sàng lọc những cá thể linh trưởng trong trung tâm. Những cá thể cho kết quả dương tính với ELISA có thể được tách riêng, và tiến hành siêu âm. Do những quy định về bảo tồn và tiến hành can thiệp của trung tâm, việc tiến hành gây mê và siêu âm trên toàn bộ các cá thể khó có thể tiến hành nhanh chóng. Sàng lọc ban đầu bằng xét nghiệm ELISA giúp xác định những cá thể cần ưu tiên được chẩn đoán và điều trị.



Hình 1. Kết quả giá trị OD của 20 mẫu huyết thanh và phân tích ROC

(a) Kết quả giá trị OD của 20 mẫu huyết thanh, đường đồ thể hiện giá trị cut-off là 0,25; A là nhóm các cá thể cho kết quả dương tính bằng phương pháp siêu âm, B là nhóm các cá thể cho kết quả âm tính. (b) Mối tương quan giữa độ nhạy và độ đặc hiệu của ELISA sử dụng phân tích ROC. Mũi tên thể hiện điểm tương ứng với giá trị độ nhạy là 100%; độ đặc hiệu 91,67%; giá trị cut-off là 0,25.

Phương pháp siêu âm phát hiện nang sán do *Echinococcus* spp. (CE) đã được tiêu chuẩn hóa nhằm thúc đẩy các tiêu chuẩn chẩn đoán và điều trị thống nhất và có thể được áp dụng cho việc điều trị lâm sàng cũng như cho các khảo sát thực địa. Nang sán ở giai đoạn cuối có thành bì vôi hóa dạng vỏ trứng hoặc hoàn toàn bị vôi hóa với bóng mờ, và chúng dễ bị chẩn đoán nhầm trong đa số các trường hợp, hoặc nang đang trong giai đoạn mới hình thành nên khó xác định được bằng phương pháp siêu âm (Brunetti và cs., 2018). Tuy nhiên, trong thí nghiệm này, tất cả các cá thể linh trưởng

có khối u được xác định bằng siêu âm đều cho kết quả dương tính với xét nghiệm ELISA. Bên cạnh đó, đối tượng của nghiên cứu là những loài linh trưởng nguy cấp cần phải được bảo vệ để thoát khỏi nguy cơ tuyệt chủng. Vì vậy, mặc dù tiến hành mổ khám để tìm nang sán trong cơ thể là phương pháp để xác nhận khẳng định cá thể có bị mắc bệnh hay không, phương pháp này không thể áp dụng với toàn bộ những cá thể nghiên cứu nhằm tìm ra các cá thể không bị mắc bệnh để làm mẫu âm chuẩn. Những cá thể được thu mẫu để làm mẫu âm chuẩn trong thí nghiệm có tình trạng sức khỏe tốt, trong

thời gian được nuôi dưỡng ở trung tâm không xuất hiện những dấu hiệu bệnh lý bất thường, và được tiến hành siêu âm kỹ lưỡng để được khẳng định không có nang sán trong cơ thể.

Để có cái nhìn tổng quan hơn, chúng tôi tiến

hành so sánh kết quả xét nghiệm thu được khi sử dụng phương pháp ELISA và phương pháp mổ khám, với giá trị cut-off = 0,24. Kết quả bảng confusion matrix được thể hiện ở bảng 1, cho thấy có 1 trường hợp dương tính giả (tương ứng tỷ lệ 12,5%).

Bảng 1. Kết quả bảng confusion matrix với giá trị cut-off là 0,24

Phương pháp		Mổ khám		Tổng
		Dương tính	Âm tính	
ELISA	Dương tính	8	1	9
	Âm tính	0	11	11
Tổng		8	12	20

Trường hợp dương tính giả có giá trị OD là 0,3; khá gần với ngưỡng cut-off 0,24 và cũng là mức gần với cut-off nhất của các cá thể cho kết quả dương tính trong thí nghiệm này. Mức giá trị OD của cá thể này tương đồng với khoảng giá trị từ 0,3 tới 0,35 của 4 cá thể dương tính với cả hai phương pháp xét nghiệm. Vì vậy, có thể xảy ra trường hợp này cá thể mắc bệnh nang sán, nhưng không phát hiện thấy nang trong cơ thể thông qua mổ khám, do nang ở giai đoạn mới hình thành.

Các xét nghiệm huyết thanh học rất hữu ích để xác nhận kết quả chẩn đoán hình ảnh. Một cá thể phát hiện thấy không có nang sán trong cơ thể bằng mổ khám, đồng thời cho kết quả xét nghiệm ELISA dương tính, nhiều khả năng cá thể đó đã mắc bệnh nang sán (CE) nhưng ở giai đoạn đầu chưa phát triển thành khối u. Tuy nhiên, các hạn chế của chẩn đoán huyết thanh trong CE phải được lưu ý để giải thích chính xác kết quả. Không nên chẩn đoán CE sử dụng xét nghiệm huyết thanh là phương pháp chẩn đoán duy nhất, đặc biệt khi không xác định được nang sán bằng siêu âm, vì giá trị dương tính của ELISA đối với bệnh này có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố. Chúng bao gồm các yếu tố liên quan đến phòng thí nghiệm (sử dụng kháng nguyên), các yếu tố liên quan đến cá nhân (tình trạng miễn dịch) và các yếu tố liên quan đến u nang (vị trí, giai đoạn,

kích thước, số lượng, điều trị trước đó và các biến chứng) (Tappe và cs., 2007). Các kháng nguyên được sử dụng để chẩn đoán huyết thanh học CE không được tiêu chuẩn hóa, dẫn đến sự khác biệt lớn trong kết quả chẩn đoán được báo cáo và khó khăn trong việc so sánh kết quả từ các nhóm khác nhau. Nhìn chung, các phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên thô là dịch nang hydatid (HCF) cho thấy độ nhạy tốt hơn (độ nhạy 80-99% và độ đặc hiệu 60-97%), trong khi các xét nghiệm dựa trên protein tinh sạch hoặc tái tổ hợp cho thấy độ đặc hiệu tốt hơn (độ nhạy 38-93% và độ đặc hiệu 80-100%) (Li và cs., 2004). Kết quả xét nghiệm âm tính giả có thể xảy ra trong trường hợp nang xuất hiện ở gan với nang giai đoạn mới hình thành (30-58%), nang giai đoạn không hoạt động (50-87%), và trong trường hợp nang ở những vị trí khác trong cơ thể ngoài gan; trong đó lên tới 50% cá thể có nang phổi, và cá thể có nang ở các vị trí khác. Cá thể có nang ở giai đoạn đang hoạt động và chuyển tiếp cho thấy tỷ lệ huyết thanh âm tính thấp hơn (5-20%), và cá thể có nhiều u nang thường cho kết quả huyết thanh dương tính (Aydin và cs., 2018).

Các xét nghiệm phát hiện các kháng thể đặc hiệu hoặc sử dụng một số protein tái tổ hợp đã được đề xuất (Hernández và cs., 2018). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có phương pháp chẩn đoán sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp nào

được thương mại hóa trên thị trường. Kết quả dương tính giả có thể xảy ra ở những cá thể bị nhiễm các loài sán khác, đặc biệt là ở bệnh nang sán do nhiễm *E. multilocularis* (Mihmanli và cs., 2016). Ít phổ biến hơn là các trường hợp dương tính giả có thể được phát hiện với các bệnh không lây nhiễm khác, chẳng hạn như ung thư và rối loạn miễn dịch mạn tính. Xét nghiệm huyết thanh học có thể vẫn cho kết quả dương tính trong nhiều năm ngay cả sau khi tiến hành điều trị hoặc có can thiệp ngoại khoa, làm hạn chế phần nào việc sử dụng huyết thanh học để đánh giá đáp ứng với điều trị (Manzano và cs., 2015). Bên cạnh đó, điều này có thể dẫn tới nhầm lẫn rằng cá thể vẫn đang bị mắc bệnh và vẫn tiếp tục tiến hành điều trị, làm ảnh hưởng tới sức khỏe của cá thể.

Tuy nhiên, việc quan sát nồng độ OD giảm theo thời gian (vài tháng đến nhiều năm) sau khi điều trị, vẫn có thể được sử dụng như một chỉ tiêu đánh giá mức độ thuyên giảm của bệnh. Giá trị OD có thể tăng khi bị tái nhiễm, mặc dù trường hợp này không phổ biến, cho thấy rằng mầm bệnh vẫn còn tồn tại trong môi trường sống của linh trưởng, và nhiều khả năng có mặt trong thức ăn, từ đây cần phải thực hiện những điều chỉnh phù hợp liên quan tới vệ sinh và cách thức đưa thức ăn trong trung tâm.

IV. KẾT LUẬN

Việc sử dụng giá trị ngưỡng OD là 0,25 đã xác định được độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng của phản ứng là 100% (khi sử dụng mẫu huyết thanh từ 8 cá thể vọc phát hiện thấy nang sán bằng siêu âm) và 91,67% (khi sử dụng mẫu huyết thanh từ 12 cá thể vọc không phát hiện thấy nang sán bằng siêu âm). Phương pháp ELISA được thiết lập có thể đóng vai trò như biện pháp sàng lọc ban đầu, giúp quá trình chẩn đoán bệnh chính xác hơn.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ quý báu của GS. Bruno Gottstein (Đại học Bern, Thụy Sĩ) và sự nhiệt tình của cán bộ tại Trung tâm EPRC để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aydin, Y., Altuntas, B., Kaya, A., Ulas, A. B., Uyanik, M. H., & Eroglu, A., 2018. The Availability of *Echinococcus* IgG ELISA for Diagnosing Pulmonary Hydatid Cysts. *The Eurasian journal of medicine*, 50(3): 144–147.
2. Brunetti, E., Tamarozzi, F., Macpherson, C., Filice, C., Piontek, M. S., Kabaalioglu, A., Dong, Y., Atkinson, N., Richter, J., Schreiber-Dietrich, D., & Dietrich, C. F., 2018. Ultrasound and Cystic *Echinococcosis*. *Ultrasound international open*, 4(3): 70–78.
3. De N. V., Le Van D., 2017. The first report of two cases of cystic *Echinococcosis* in the lung by *Echinococcus ortleppi* infection, in Vietnam. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 8:45.
4. Deplazes P., Eckert J., 2001. Veterinary aspects of alveolar *Echinococcosis* – A zoonosis of public health significance. *Veterinary Parasitology*, 98: 65–87
5. Hernández-González A., Sánchez-Ovejero C., Manzano-Román R., González Sánchez M., Delgado J.M., Pardo-García T., 2018. Evaluation of the recombinant antigens B2t and 2B2t, compared with hydatid fluid, in IgG-ELISA and immunostrips for the diagnosis and follow up of CE patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12(9): e0006741.
6. Kamenetzky L., Gutierrez A.M., Canova S.G., Haag K.L., Guarnera E.A., Parra A., 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 2:129–36
7. Karadağ A., Yanık K., Ünal N., Odabaşı H., Hökelek M., 2013. Evaluation of materials sent due to suspected cystic *Echinococcosis* to the parasitology laboratory of Ondokuz Mayıs University Medical School between the Years 2005–2011. *Türkiye. Parazitol. Derg.*, 37:28–31
8. Kishimoto M., Yamada K., Yamano K.,

- Kobayashi N., Fujimoto S., Shimizu J., Lee K-J., Iwasaki T., Miyake Y.I., 2009. Significance of imaging features of alveolar echinococcosis in studies on nonhuman primates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 540–544
9. Kondo H., Wada Y., Bando G., Kosuge M., Yagi K., Oku Y., 1996. Alveolar hydatidosis in a gorilla and a ring-tailed lemur in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58: 447–449.
10. Kvascevicus R., Lapteva O., Awar O.A., 2016. Fatal Liver and Lung Alveolar Echinococcosis with Newly Developed Neurologic Symptoms due to the Brain Involvement. *Surg. J. (N. Y.)*, 2(3):e83-e88.
11. Li, J., Zhang, W. B., & McManus, D. P., 2004. Recombinant antigens for immunodiagnosis of cystic Echinococcosis. *Biological procedures online*, 6: 67–77.
12. Manzano-Román, R., Sánchez-Ovejero, C., Hernández-González, A., Casulli, A., & Siles-Lucas, M., 2015. Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future?. *BioMed Research International*, 2015: 1–9.
13. Mihmanli, M., Idiz, U. O., Kaya, C., Demir, U., Bostanci, O., Omeroglu, S., & Bozkurt, E., 2016. Current status of diagnosis and treatment of hepatic Echinococcosis. *World journal of hepatology*, 8(28):1169–1181.
14. Plesker, R., Nadler, T., Dinkel, A., Romig, T., 2009. A case of an Echinococcus ortleppi infestation in a red-shanked douc langur (Pygathrix nemaeus) in northern Vietnam. *Vietnam. J. Primatol.* 3, 75e81
15. Rojas C.A.A., Romig T., Lightowlers M.W., 2014. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans—review of current knowledge. *International Journal for Parasitology*, 44(1):9-18.
16. Sato C., Kawase S., Yano S., Nagano H., Fujimoto S., Kobayashi N., 2005. Outbreak of larval Echinococcus multilocularis infection in Japanese monkey (Macaca fuscata) in a zoo, Hokkaido: western blotting patterns in the infected monkeys. *J. Vet. Med. Sci.* 67:133–5.
17. Shi Y., Wan X., Wang Z., Li J., Jiang Z., Yang Y., 2019. First description of Echinococcus ortleppi infection in China. *Parasites & vectors*, 12(1):1-6.
18. Skrjabin K.I., 1928. Method of full helminthological dissection of vertebrates, including humans. *Moscow: Publisher of Moscow State University*. 45 p.
19. Taniyama H., Morimitsu Y., Fukumoto S.I., Asakawa M., Ohbayashi M., 1996. A natural case of larval Echinococcosis caused by Echinococcus multilocularis in a zoo orangutan (Pongo pygmaeus). *Alveolar echinococcosis of the liver 1st ed*, 65–7.
20. Tappe D., Brehm K., Frosch M., Blankenburg A., Schrod A., Kaup F-J, Mätz-Rensing K., 2007. Echinococcus multilocularis infection of several old world monkey species in a breeding enclosure. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 504–506.
21. Yamano K., Kanetoshi A., Goto A., Kishimoto M., Kobayashi N., Fujimoto S., 2009. Japanese monkey (Macaca fuscata) with alveolar Echinococcosis after treatment with albendazole for 10 years: serodiagnosis and determination of albendazole metabolites. *Parasitol. Res.* 106:69–74
22. Yilmaz, M., Akbulut, S., Kahraman, A., & Yilmaz, S., 2012. Liver hydatid cyst rupture into the peritoneal cavity after abdominal trauma: case report and literature review. *International surgery*, 97(3), 239–244.

Ngày nhận 3-6-2021

Ngày phản biện 26-6-2021

Ngày đăng 1-3-2022