

## PHÂN TÍCH VÀ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN PROTEIN CỦA SÁN LÁ GAN LỚN BẰNG PHƯƠNG PHÁP WESTERN BLOT

*Dương Đức Hiếu, Bùi Khánh Linh,  
Sử Thanh Long, Nguyễn Văn Thọ, Trịnh Đình Thâu*  
Khoa Thú y - Học viện Nông nghiệp Việt Nam

### TÓM TẮT

Căn cứ vào đặc điểm hình thái học và các chỉ số kích thước của loài sán lá gan lớn *Fasciola* spp., 2 loài sán lá gan lớn ký sinh ở trâu bò, lưu hành trên địa bàn tỉnh Bắc Giang đã được xác định là *Fasciola gigantica* và *Fasciola* sp. dạng trung gian. Trong nghiên cứu này, các mẫu kháng nguyên chất tiết và kháng nguyên thân loài *Fasciola gigantica* được tách chiết, phân tích và so sánh các thành phần protein, nhằm xác định những protein có tính kháng nguyên cao, phục vụ cho việc chẩn đoán bệnh sán lá gan lớn. Kết quả điện di SDS-PAGE trên thạch 15% polyacrylamide nhuộm Coomassive blue và silver đã xác định được 26 dải protein kháng nguyên thân của *F.gigantica* với khối lượng phân tử dao động từ 10 kDa đến 130 kDa và 15 dải protein kháng nguyên chất tiết có khối lượng phân tử dao động từ 10 kDa đến 70 kDa. Bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch trên màng lai PVDF (Western Blot) đã phát hiện các dải protein kháng nguyên thân có phản ứng với kháng thể trong huyết thanh bò nhiễm sán lá gan, có khối lượng phân tử lần lượt là: 24, 27, 36, 38, 45, 55, 70 và 102 kDa và các dải protein kháng nguyên chất tiết có phản ứng với kháng thể trong huyết thanh bò nhiễm sán lá gan có khối lượng phân tử lần lượt là: 21, 24, 27, 38 và 70 kDa.

*Từ khóa:* *Fasciola gigantica*, Kháng nguyên thân, Kháng nguyên chất tiết, Western Blot

### Analysis and determination of protein components of *Fasciola gigantica* by Western Blot method

*Duong Duc Hieu, Bui Khanh Linh,  
Su Thanh Long, Nguyen Van Tho, Trinh Dinh Thau*

### SUMMARY

Based on morphological characteristics and body size indexes of *Fasciola* spp., two bovine liver fluke species circulating in cattle and buffalo in Bac Giang province, Viet Nam were identified, such as *Fasciola gigantica* and hybrid form of *Fasciola* sp. In order to detect the protein components with high antigenicity for serodiagnosis of fasciolosis in cattle and buffalo, the excretory-secretory and somatic antigens of *Fasciola gigantica* were extracted, analyzed and compared in this study. The result of SDS – PAGE electrophoresis on 15% polyacrylamide gel, staining Coomassive blue and silver showed that 26 somatic antigen protein bands of *Fasciola gigantica* having molecular weight from 10k Da to 130 kDa and 15 excretory-secretory antigen protein bands having molecular weight from 10 kDa to 70 kDa were identified. By applying the Western Blot method, the antigen-antibody reaction in *Fasciola* infected cattle serum was detected on PVDF membrane. The excretory-secretory antigen protein bands reacted with sero-antibody having molecular weight of: 24, 27, 36; 38, 45, 55, 70, 102 kDa respectively and the somatic antigen protein bands reacted with sero-antibody having molecular weight of 21, 24, 27, 38, 70 kDa respectively.

*Keywords:* *Fasciola gigantica*, Excretory-secretory antigen, Somatic antigen, Western Blot

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sán lá gan do *Fasciola* spp. không chỉ gây ra những thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi mà còn là căn bệnh truyền lây giữa người và động vật. Ước tính hằng năm, căn bệnh này gây thiệt hại cho nền kinh tế nông nghiệp toàn cầu khoảng 3,2 tỷ USD (Charlier và cs., 2007). Trên thế giới có khoảng 50 triệu người nhiễm sán lá gan và 180 triệu người ở những nước phát triển và đang phát triển đứng trước nguy cơ nhiễm bệnh (Mramba Nyindo, 2015). Tại Việt Nam, những báo cáo về số lượng bệnh nhân nhiễm sán lá gan lớn trong những năm gần đây tăng lên mức báo động (Đặng Thị Cẩm Thạch, 2006; Triệu Nguyên Trung, 2009).

Tỷ lệ trâu bò ở nước ta nhiễm *Fasciola gigantica* rất cao, dao động trong khoảng từ 37-52% (Nguyễn Đức Tân, 2010; Phạm Diệu Thùy, 2014). Việc chẩn đoán trâu bò nhiễm sán lá gan ở nước ta chủ yếu dựa vào những phương pháp truyền thống như xét nghiệm phân để tìm trứng. Đây là phương pháp có độ nhạy không cao, hơn nữa thời gian phát hiện bệnh muộn, sán trưởng thành đã di hành và gây nhiều tổn hại đến nhu mô gan, ống dẫn mật..... Vì vậy, việc ứng dụng những phương pháp chẩn đoán huyết thanh học có độ nhạy cao, thời gian phát hiện bệnh sớm là rất cần thiết. Nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành nhằm phân tích và so sánh các thành phần kháng nguyên của *F.gigantica*, tạo cơ sở cho việc tìm ra những loại kháng nguyên đặc hiệu, có độ nhạy cao ứng dụng trong chẩn đoán.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương pháp thu thập mẫu và định loại hình thái học

Các mẫu gan bò nhiễm sán lá gan lớn được thu thập tại các lò mổ trên địa bàn tỉnh Bắc Giang và được tiến hành mổ khám kiểm tra tại phòng thí nghiệm Bộ môn Ký sinh trùng – Khoa thú y – Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Sán lá gan trưởng thành được quan sát và đo kích thước theo các chỉ tiêu hình thể dưới kính hiển

vi quang học để định loại căn cứ theo mô tả của Ashrafi và cs. (2006), Periago và cs. (2008) với 05 chỉ số về hình thể ( chiều dài cơ thể - BL, chiều rộng cơ thể - BW, tỷ lệ chiều dài cơ thể/ chiều rộng cơ thể - BL/BW, khoảng cách từ giác bụng đến cuối thân-VS-P và khoảng cách từ giác bụng đến cuối tinh hoàn -VS-Vit).

Huyết thanh âm, dương chuẩn sán lá gan lớn *Fasciola gigantica* được cung cấp từ phòng thí nghiệm Sinh học phân tử Ký sinh trùng, trường đại học Sungkyunkwan, Hàn Quốc

### 2.2 Phương pháp tách chiết kháng nguyên chất tiết

Sán trưởng thành được thu thập từ gan trâu, bò nhiễm bệnh sán lá gan. Sán được rửa 3- 4 lần bằng dung dịch PBS 0,01M tại nhiệt độ phòng. Sau đó ngâm sán trong môi trường PBS (5ml dung dịch PBS/1 sán trưởng thành) trong tủ ẩm 370C trong 24 giờ, ly tâm 10.000 vòng/ phút/ 40C/ 20 phút, thu dịch nổi, bảo quản ở - 200C.

### 2.3 Phương pháp tách chiết kháng nguyên thân

Sán trưởng thành sau khi thu thập được rửa bằng dung dịch PBS 0,01M. Nghiền nhỏ toàn bộ cơ thể sán sau đó ly tâm lạnh ở 40C với tốc độ 50.000 vòng/phút/1 giờ. Thu dịch nổi và bảo quản ở - 200C.

### 2.4 Phương pháp xác định nồng độ protein theo Bradford

Để xác định protein trong mẫu xây dựng đường chuẩn BSA với dung dịch protein chuẩn bovine serum albumin ( BSA) 1 mg/ml được pha loãng trong nước cất và PBS 1X với các thể tích 0,4µl; 0,8µl; 1,2µl; 1,6µl và 2µl. Các mẫu kháng nguyên với thể tích 4µl/ giếng được pha loãng trong 156µl nước cất. Thêm 40µl dung dịch nhuộm vào các giếng và pipet đều. Tiến hành đo dung dịch bằng máy quang phổ kế (Spectra MAX) xác định giá trị mật độ quang OD ở bước sóng 595. Xây dựng đường chuẩn và công thức tính nồng độ protein trong các mẫu.

### 2.5 Phương pháp điện di SDS –PAGE

Các mẫu kháng nguyên thân và kháng nguyên chất tiết của sán lá gan được tiến hành điện di. Mẫu được biến tính ở nhiệt độ 100°C trong vòng 05 phút, sau đó được bơm vào các giếng trên bản gel (gồm 05% stacking gel và 15% separating gel). Quá trình điện di được tiến hành ở hiệu điện thế 80V trong 30 phút, sau đó chạy điện di ở hiệu điện thế 120V trong 60 phút. Gel được nhuộm bằng Coomassie Blue và nhuộm Bạc Silver. Các vạch protein của các mẫu hiện lên được so sánh với thang Marker chuẩn để ước tính trọng lượng phân tử.

## 2.6 Phương pháp thẩm tách miễn dịch Western Blot sử dụng màng Polyvinylidene Fluoride (PVDF)

Điện di SDS PAGE 15% để phân tách protein từ mẫu kháng nguyên. Protein được chuyển sang màng lai PVDF. Ủ màng lai với dung dịch

blocking (3% sữa gầy hoặc Casein). Rửa màng lai bằng PBS-Tween 20 và ủ qua đêm với kháng thể sơ cấp ( huyết thanh bò nhiễm bệnh) pha loãng với tỷ lệ 1:400. Rửa màng lai bằng PBS-Tween 20 hoặc Casein ủ tiếp với kháng thể thứ cấp có chứa enzyme HRP ( antbovine IgG, Sigma Chemical Company, USA) pha loãng với tỷ lệ 1:4000. Sử dụng ECL kit để xác định các dải protein đặc hiệu trên màng lai.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Một số chỉ tiêu hình thể phân biệt loài sán lá gan lớn thu được tại Bắc Giang

Trong nghiên cứu này của chúng tôi, các mẫu sán lá gan trưởng thành thu từ Bắc Giang được tiến hành quan sát và đo kích thước dưới kính hiển vi quang học. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. So sánh 5 chỉ tiêu hình thái phân biệt các loài sán lá gan**

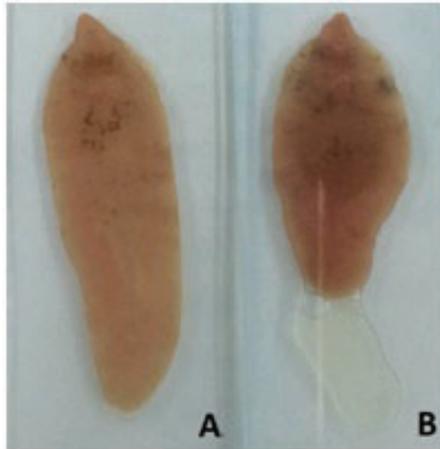
Các chỉ tiêu đo (mm)	<i>Fasciola gigantica</i> (n = 15)	<i>Fasciola sp.</i> (n = 15)
Chiều dài (BL)	52.00 - 42.00* 46.61 ± 3.10**	34.00 - 27.00 30.07 ± 2.05
Chiều rộng (BW)	14.40 - 11.00 13.09 ± 0.85	16.00 - 12.00 13.94 ± 1.07
Khoảng cách từ giác bụng đến cuối thân (VS-P)	47.00 - 37.40 40.93 ± 3.08	31.00 - 21.00 25.40 ± 2.36
Khoảng cách từ giác bụng đến cuối tinh hoàn (VS-Vit)	27.00 - 21.00 24.03 ± 1.92	20.00 - 13.00 16.60 ± 1.70
Tỷ lệ chiều dài cơ thể/ chiều rộng cơ thể ( BL/BW)	4.27 - 3.14 3.58 ± 0.34	2.43 - 1.93 2.16 ± 0.15

Ghi chú: \* Giá trị Min - Max

\*\* Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn

Căn cứ theo mô tả 5 chỉ tiêu hình thể sán lá gan lớn của Ashrafi và cs. (2006), Periago và cs. (2008), kết quả bảng 1 cho thấy các mẫu sán lá gan trưởng thành thu tại Bắc Giang gồm 2 nhóm là *Fasciola gigantica* và *Fasciola spp.* trung gian. Các nghiên cứu trước đây cũng nhận định loài sán lá gan lớn *Fasciola gigantica* là loài phổ biến gây bệnh cho người và động vật tại

Việt Nam (Nguyễn Quốc Doanh, 2006). Tỷ lệ nhiễm loài *F. gigantica* ở trâu bò tại một số tỉnh phía Bắc nước ta lên đến 58,67% (Phạm Diệu Thùy, 2014). Bên cạnh đó, sự tồn tại dạng trung gian trong quần thể sán lá gan lớn ở Việt Nam đã được tác giả Lê Thanh Hòa và cs. (2007) xác nhận trên cơ sở phân tích sinh học phân tử.



**Hình 1. Sán lá gan lớn *F. gigantica* (A) và *Fasciola spp. trung gian* (B) thu được tại Bắc Giang**

Ngoài 5 chỉ số kích thước cơ bản để định loại hình thái loài sán lá gan lớn *Fasciola spp.*, 11 chỉ số khác của các mẫu sán lá gan trưởng thành, thu từ Bắc Giang được đo kích thước dưới kính hiển vi quang học. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2. So sánh một số chỉ tiêu kích thước của loài sán lá gan lớn *Fasciola spp.* thu được tại tỉnh Bắc Giang**

Các chỉ tiêu đo (mm)	<i>Fasciola gigantica</i> (n = 15)	<i>Fasciola spp</i> (n = 15)
Chiều rộng giác bụng (VS-W)	1.78 - 1.57* 1.57 ± 0.11**	1.76 - 1.23 1.52 ± 0.14
Chiều dài giác bụng (VS-L)	1.88 - 1.32 1.58 ± 0.14	2.70 - 1.11 1.56 ± 0.34
Chiều rộng giác miệng (OS-W)	1.88 - 1.17 1.28 ± 0.17	1.21 - 0.97 1.10 ± 0.07
Chiều dài giác miệng (OS-L)	0.93 - 0.50 0.80 ± 0.10	0.73 - 0.50 0.65 ± 0.07
Khoảng rộng cổ sán (CW)	6.00 - 4.28 4.91 ± 0.48	4.62 - 2.82 3.86 ± 0.45
Chiều dài đầu sán (CL)	5.30 - 3.10 3.74 ± 0.61	3.27 - 2.18 2.78 ± 0.23
Khoảng rộng tinh hoàn (TW)	13.00 - 3.40 7.91 ± 1.91	10.00 - 7.00 8.93 ± 0.70
Khoảng dài tinh hoàn (TL)	21.00 - 15.00 18.40 ± 1.62	17.00 - 11.00 13.29 ± 1.09
Khoảng cách từ giao điểm của tuyến hoàng thể đến cuối thân (Vit-P)	22.00 - 12.40 16.89 ± 2.98	13.00 - 4.00 8.67 ± 2.29
Khoảng cách từ đầu giác bụng đến giác miệng (A-VS)	5.30 - 1.59 3.61 ± 0.81	3.27 - 2.18 2.78 ± 0.23
Tỷ lệ chiều dài cơ thể/khoảng cách từ giác bụng đến cuối thân (BL/VS-P)	1.26 - 1.11 1.14 ± 0.04	1.43 - 1.10 1.19 ± 0.07

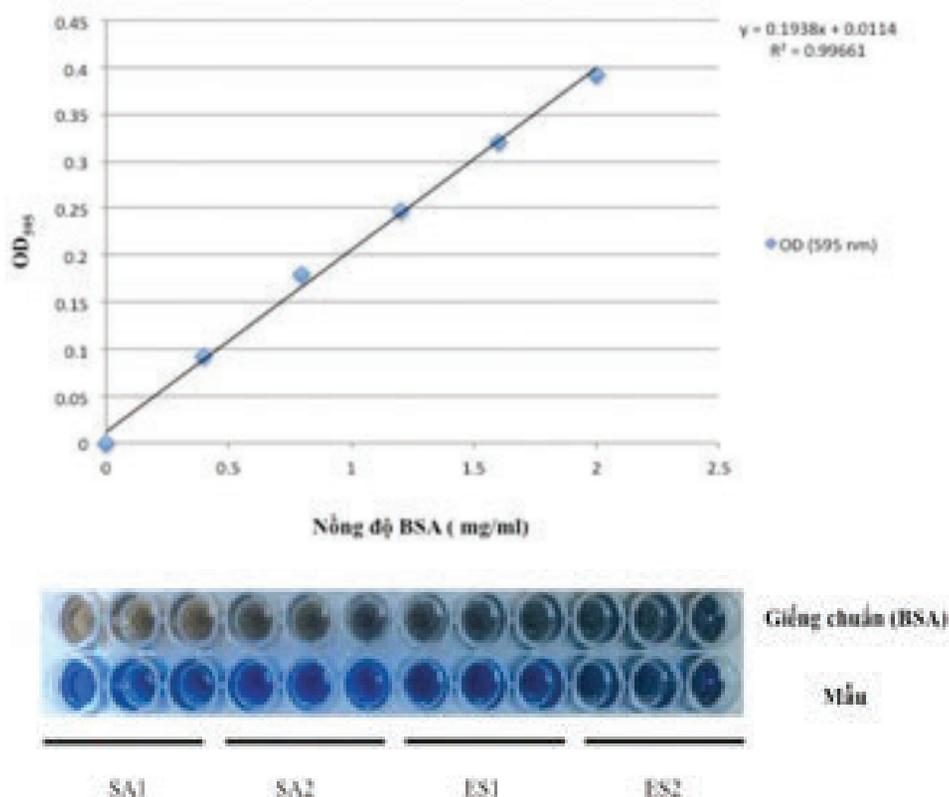
Ghi chú: \* Giá trị Min – Max

\*\* Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn

### 3.2 Kết quả xác định nồng độ protein kháng nguyên chất tiết và kháng nguyên thân *F. gigantica*

2 mẫu kháng nguyên chất tiết (ES1, ES2)

và 2 kháng nguyên thân (SA1, SA2) thu được, được xác định nồng độ theo phương pháp Bradford với dung dịch mẫu chuẩn albumin (bovine serum albumin – BSA) 1mg/ml, căn cứ theo giá trị mật độ quang OD<sub>595</sub> (biểu đồ 1).



**Biểu đồ 1. Đường chuẩn BSA theo Bradford**

Căn cứ theo công thức đường chuẩn BSA và giá trị quang OD đo ở bước sóng 595nm, nồng độ mẫu kháng nguyên thân (SA1, SA2) và kháng nguyên chất tiết (ES1, ES2) *F. gigantica* thu được lần lượt là 3,2mg/ml; 4,1mg/ml; 2,1mg/ml và 3,2mg/ml.

### 3.3 So sánh thành phần protein kháng nguyên thân và kháng nguyên chất tiết của *F. gigantica*

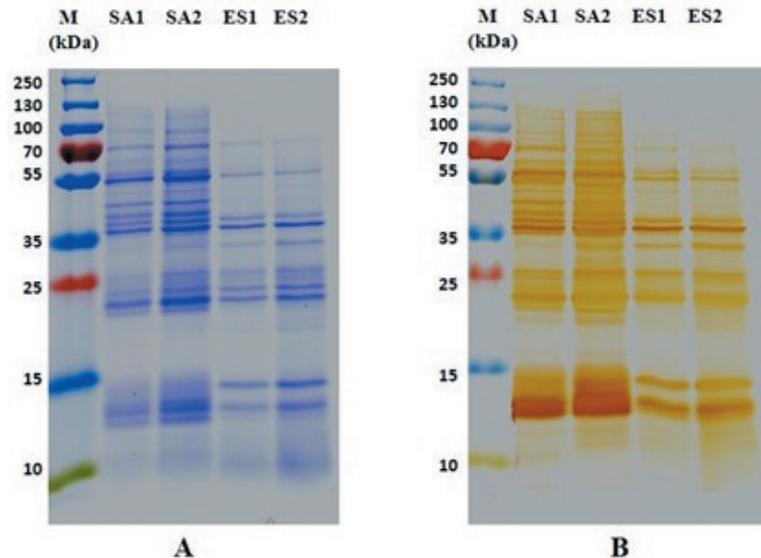
Chuyển 5µg kháng nguyên vào mỗi giếng trên polyacrylamide gel 15% để tiến hành chạy điện di, tách protein của kháng nguyên thân (SA1, SA2) và kháng nguyên chất tiết (ES1,

ES2). Các mẫu kháng nguyên sau khi tiến hành điện di SDS-PAGE được nhuộm đồng thời bằng 2 phương pháp nhuộm protein có độ nhạy cao là CBB và Silver để đối chứng kết quả, chúng tôi đã xác định 26 dải protein kháng nguyên thân của *F. gigantica* có khối lượng dao động từ 10 kDa đến 130 kDa và 15 dải protein kháng nguyên chất tiết có khối lượng phân tử dao động từ 10 kDa đến 70 kDa (hình 2A, 2B) thông qua cả 2 phương pháp nhuộm.

Trong đó kháng nguyên thân của *F. gigantica* gồm 11 dải chính có khối lượng phân tử lần lượt là 13, 14, 22, 24, 27, 36, 38,

40, 45, 55 và 70 kDa. Kháng nguyên chất tiết của *F. gigantica* gồm 8 dải chính có khối lượng phân tử là 14, 15, 22, 24, 27, 36, 38 và 55 kDa. Theo nghiên cứu của Meshgi và cs (2008) sau khi chạy điện di SDS-PAGE, mẫu kháng nguyên chất tiết của *F. gigantica* thu tại Iran xác định 6 dải protein chính có

khối lượng phân tử là 15, 16, 20, 24, 33, và 42 kDa. Goreish và cs (2008) phân tích thành phần protein của *F. gigantica* tại Sudan, các mẫu kháng nguyên chất tiết xuất hiện các dải protein có khối lượng từ 17–110 kDa, các mẫu kháng nguyên thân xuất hiện các dải protein có khối lượng từ 21–110 kDa.



**Hình 2. Kết quả phân tích thành phần kháng nguyên thân (SA1, SA2), kháng nguyên chất tiết (ES1, ES2) của *F. gigantica* bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 15%, nhuộm Coomassive Blue (A) và nhuộm Silver (B)**

### 3.4 Kết quả thẩm tách miễn dịch Western Blot trên màng lai PVDF

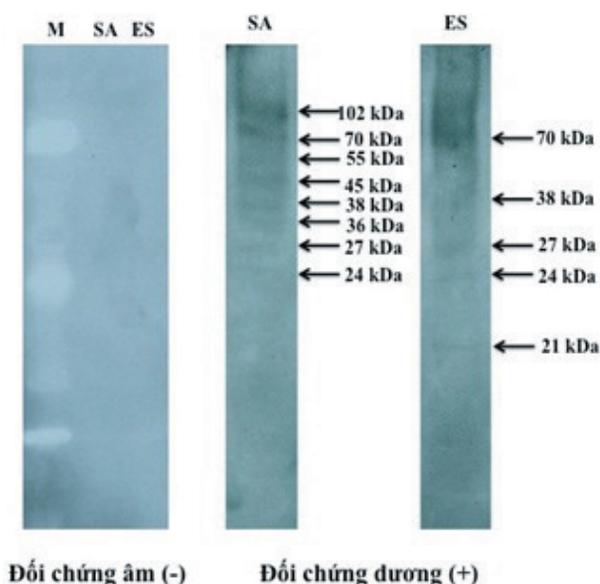
Nhằm xác định và lựa chọn protein có tính kháng nguyên đặc hiệu trong chẩn đoán bệnh sán lá gan lớn ở trâu bò gây ra bởi *F. gigantica*, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật thẩm tách miễn dịch Western Blot trên màng lai PVDF với ECL kit phát quang hóa học trên phim chụp X-ray, với đối chứng âm sử dụng huyết thanh bò khỏe không nhiễm sán lá gan, liên kết kháng thể - kháng nguyên đặc hiệu được kiểm tra trên huyết thanh bò nhiễm sán lá gan lớn *F. gigantica*. Mẫu huyết thanh âm chuẩn và dương chuẩn sử dụng được cung cấp từ phòng thí nghiệm Sinh học phân tử Ký sinh trùng, trường Đại học Sungkyunkwan, Hàn Quốc (hình 3).

Kết quả hình 3 cho thấy kháng nguyên thân và kháng nguyên chất tiết *F. gigantica* không có liên kết với kháng thể của bò không nhiễm sán lá gan lớn nên không xuất hiện vạch protein trên đối chứng âm (-). Với huyết thanh của bò nhiễm bệnh sau khi thẩm tách miễn dịch trên màng lai, chúng tôi đã xác định được các protein liên kết đặc hiệu với kháng thể trong huyết thanh bò nhiễm sán lá gan lớn. Cụ thể, khi sử dụng kháng nguyên thân (SA) trên phim chụp X-ray phát hiện 8 vạch protein có khối lượng phân tử là 24, 27, 36, 38, 45, 55, 70 và 102 kDa. Trong đó các protein có khối lượng phân tử 24, 27, 38 và 70 kDa cũng được phát hiện sau khi thẩm tách miễn dịch sử dụng kháng nguyên chất tiết (ES) của sán lá gan lớn. Đặc biệt vạch protein ở vị trí 70 kDa rõ nét trên màng lai, riêng vạch protein

có khối lượng 21 kDa chỉ xuất hiện trong mẫu kháng nguyên chất tiết (ES).

Wanchai và cs (1997) đã phân tích thành phần protein từ kháng nguyên thân loài *F. gigantica* tại Thái Lan cho rằng: dải protein có khối lượng phân tử 38 kDa tách ra từ kháng

nguyên thân của *F. gigantica* có thể ứng dụng trong việc chẩn đoán bệnh sán lá gan. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Kamel và cs (2013) đã nhận định rằng protein có khối lượng phân tử 27 kDa có ý nghĩa trong chẩn đoán sớm bệnh sán lá gan lớn do *F. gigantica* gây ra ở trâu, bò và người.



**Hình 3. Kết quả thẩm tách miễn dịch Western Blot sử dụng màng lai PVDF trên phim chụp X-ray với ECL kit**

#### IV. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp định loại hình thái dựa vào 5 chỉ số hình thể (BL, BW, BL/BW, VS-P, VS-Vit) đã xác định được 2 loài sán lá gan thu được trong nghiên cứu này là *Fasciola gigantica* và *Fasciola* spp trung gian.

Kết quả phân tích thành phần protein bằng phương pháp điện di SDS-PAGE cho thấy có 26 dải protein kháng nguyên thân của *F. gigantica* có khối lượng dao động từ 10 kDa đến 130 kDa và 15 dải protein kháng nguyên chất tiết có khối lượng phân tử dao động từ 10 kDa đến 70 kDa. Kết quả thẩm tách miễn dịch trên màng lai PVDF phát hiện 8 vạch protein có khối lượng phân tử là 24, 27, 36, 38, 45, 55, 70 và 102 kDa

(với kháng nguyên thân) và các vạch protein có khối lượng phân tử 21, 24, 27, 38 và 70 kDa (với kháng nguyên chất tiết). Việc ứng dụng công nghệ protein tái tổ hợp tạo kháng thể đơn dòng là cần thiết nhằm tăng độ nhạy trong các phương pháp miễn dịch chẩn đoán bệnh sán lá gan lớn. Ngoài ra, những nghiên cứu về ứng dụng protein với các khối lượng phân tử khác nhau như 70 kDa trong chẩn đoán căn bệnh sán lá gan ở trâu, bò vẫn còn hạn chế cho đến nay.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện từ sự hỗ trợ của Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử Ký sinh trùng, trường Đại học Sungkyunkwan, Hàn Quốc và Viện Nghiên cứu Bảo tồn đa dạng sinh học và Bệnh nhiệt đới (BioD), Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ashrafi K, Valero MA, Panova M, Periago MV, Massoud J, Mas-Coma S. Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitol Int.* 2006; 55: 249-60.
2. Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Williams, D., Vercruysse, J. (2007): Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 78, 57-66
3. Nguyễn Quốc Doanh, Lê Thanh Hoà (2006), “Một số đặc điểm hình thái và phân tử của sán lá gan (*Fasciola spp.*) ở bò của tỉnh Nghệ An và Cao Bằng”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 3 (5), tr: 59 - 67
4. Goreish, Williams, D.J., Mc Garry, J., Abdelsalam, E.B., Magid, A.M., and Mukhtar, M.M. (2008). Protein profile of *Fasciola gigantica* antigens. *The Sudan Journal of Veterinary Research*, 23, 1-9
5. Lê Thanh Hòa, Nguyễn Văn Đề (2007), “Xác định lai ngoại loài giữa *F. gigantica* và *F. hepatica* trong quần thể sán lá gan lớn ở Việt Nam trên cơ sở sinh học phân tử”, *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, số 2, tr: 89 - 97.
6. Hanan H. Kamel, Ghada A. Saad and Rania M. Sarhan. Dot-Blot Immunoassay of *Fasciola gigantica* Infection using 27 kDa and Adult Worm Regurge Antigens in Egyptian Patients. *Korean J Parasitol Vol. 51, No. 2: 177-182, April 2013*
7. Meshgi, B; Eslami, A and Hemmatzadeh, F (2008). Determination of somatic and excretory antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using SDS-PAGE. *Iranian J. Vet. Res.*, 9: 77-80
8. Mramba Nyindo, Abdul-Hamid Lukumbagire. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 786195. Published online 2015 Aug 31. doi: 10.1155/2015/786195
9. Periago MV, Valero MA, El Sayed M, Ashrafi K, El Wakeel A, Mohamed MY, Desquesnes M, Curtale F, Mas-Coma S. First phenotypic description of *Fasciola hepatica/Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 51-8.
10. Nguyễn Đức Tân, Nguyễn Văn Thoại, Nguyễn Thị Sâm, Lê Đức Quyết, Huỳnh Vũ Vỹ, 2010. Tình hình nhiễm sán lá gan lớn trâu bò và ấu trùng của chúng ở vật chủ trung gian tại một số tỉnh Nam Trung bộ. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, Tập XVII, số 1, tr. 52 – 57.
11. Đặng Thị Cẩm Thạch, 2006. Báo cáo về phòng chống bệnh ký sinh trùng. Báo cáo phòng chống bệnh giun sán và sốt rét, Viện sốt rét, ký sinh trùng và côn trùng Trung ương, tr.100-104.
12. Phạm Diệu Thùy (2014). Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ bệnh sán lá gan trâu, bò (fasciolosis) ở tỉnh Thái Nguyên, Bắc Kạn, Tuyên Quang và biện pháp phòng trị. Luận án Tiến sĩ Thú y, Trường đại học Thái Nguyên.
13. Triệu Nguyên Trung, 2009. Kết quả phòng chống bệnh sán lá gan lớn và bệnh giun sán ký sinh ở khu vực miền Trung-Tây Nguyên 6 tháng đầu năm 2009. Viện sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Quy Nhơn.
14. Wanchai Maleewong, Pewpan M. Intapan, Kanchana Tomanakarn, Chaisiri Rokni. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses *Int. J. Parasitol.*, 35 (2005), pp. 1255–127.

Nhận ngày 14-7-2016

Phản biện ngày 30-8-2016