

ĐÁNH GIÁ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA TRỨNG GIUN ĐŨA CHÓ *TOXOCARA CANIS* TRONG CÁC MÔI TRƯỜNG FORMOL 1%, FORMOL 2%, FORMOL 4% VÀ ACID SUNFURIC 0,1N

*Đông Thế Anh, Nguyễn Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Quỳnh,
Luu Thị Ngàn, Mạc Thị Hoa, Nguyễn Thị Hoàng Yến*
Bộ môn Ký sinh trùng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá sự phát triển của trứng *Toxocara canis* trong các môi trường formol 1%, formol 2%, formol 4% và H₂SO₄ 0,1N; từ đó lựa chọn được môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của trứng *T. canis*. (*T. canis* là một trong những tác nhân gây toxocariasis ở người). Chẩn đoán toxocariasis trên người do *Toxocara* spp. chủ yếu dựa vào kỹ thuật ELISA sử dụng kháng nguyên chất tiết từ ấu trùng gây nhiễm (ATGN) của *T. canis*. Quy trình sản xuất kháng nguyên này được thực hiện qua nhiều bước, trong đó bước nuôi trứng *T. canis* đến giai đoạn chứa ATGN là quan trọng nhất. Trong nghiên cứu này chúng tôi nuôi trứng *T. canis* thu từ tử cung của giun trưởng thành ở giai đoạn một tế bào đến giai đoạn chứa ATGN trong các môi trường khác nhau. Kết quả thu được như sau: Tỷ lệ phát triển của trứng *T. canis* đến giai đoạn chứa ATGN cao nhất khi nuôi trong môi trường H₂SO₄ 0,1N (83,31%). Bên cạnh đó, tỷ lệ phát triển của trứng *T. canis* đến ATGN trong formol 1%, formol 2% và formol 4% lần lượt là 73,33%; 71, 05% và 68,61%. Như vậy, kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng môi trường H₂SO₄ 0,1N là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của trứng *T. canis*.

Từ khóa: *Toxocara canis*, formol 1%-4%, H₂SO₄ 0,1N.

Evaluation of the development of *Toxocara canis* eggs in formol 1%, formol 2%, formol 4% and sulfuric acid 0.1N media

*Dong The Anh, Nguyen Thi Lan Anh, Nguyen Thi Quynh,
Luu Thi Ngan, Mac Thi Hoa, Nguyen Thi Hoang Yen*

SUMMARY

The objective of this study aimed at evaluating the development of *Toxocara canis* eggs in formol 1%, formol 2%, formol 4% and H₂SO₄ 0.1N media, then to choose the best culture medium for the development of *T. canis* eggs (*T. canis* is one of the agents causing toxocariasis in humans). The diagnosis of this infection in humans due to *Toxocara* spp. was mainly based on ELISA technique using secretory/excretory (ES) antigen from the infective *T. canis* larvae. The procedure of making ES antigen consisted of some steps, of which, the step of culturing *T. canis* eggs to larvae containing secretory/excretory (ES) antigen was the most important. In this study we cultured *T. canis* eggs collecting from uterus of adult worms in different media. The studied result showed that the rate of the development from *T. canis* eggs to larvae stage containing secretory/excretory (ES) antigen in H₂SO₄ 0.1 N medium was 83.31%, and this was the medium showing the best development and the lowest extraordinary rate of *T. canis* eggs. Besides, the rates of the development of *T. canis* egg to the above larvae stage in formol 1%, formol 2%, formol 4% media were 73.33%, 71.05% and 68.61%, respectively. In conclusion, the result of this study showed that H₂SO₄ 0.1N medium is the best medium for the development of *T. canis* eggs.

Keywords: *Toxocara canis*, formol 1%-4%, H₂SO₄ 0.1N.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng ấu trùng di chuyển ở người (ascarid larva migrans syndrome-ascarid LMS) là sự di hành của ấu trùng nhóm giun đũa trên cơ thể người bao gồm giun đũa chó *Toxocara canis*, giun đũa mèo *Toxocara cati* và giun đũa lợn *Ascaris suum*. Mặc dù đã được báo cáo từ thập kỷ 50-60 của thế kỷ trước (Beaver và cs., 1952; Phillipson và cs., 1967), nhưng hội chứng này mới được cộng đồng người Việt chú ý gần đây. Tuy nhiên, các nghiên cứu mới chỉ đề cập đến hai tác nhân gây bệnh chính là *T. canis* và *T. cati*, chưa có báo cáo nào về vai trò của *A. suum* gây bệnh trên người ở Việt Nam.

Tình trạng người bị nhiễm ấu trùng giun đũa chó, mèo được báo cáo ở nhiều nơi trên cả nước với tỷ lệ dương tính dao động từ 15,75% đến 85,3% (Trần Trọng Dương, 2014; Trần Thanh Dương và cs., 2014; Đỗ Trung Dũng và cs., 2016). Chẩn đoán hội chứng ấu trùng di hành trên người nói chung và toxocariasis nói riêng chủ yếu dựa vào kỹ thuật hấp phụ miễn dịch có gắn enzyme như ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) và kỹ thuật lai protein (Western Blot) để xác định kháng thể đặc hiệu đối với mỗi loại giun tròn này. Các kỹ thuật này sử dụng kháng nguyên chuẩn là kháng nguyên chất tiết (Excretory/Secretory – ES) của ấu trùng ở giai đoạn gây nhiễm của giun đũa chó *T. canis* và giun đũa lợn *A. suum* (De Savigny và cs., 1979, Yoshida và cs., 2016). Các kháng nguyên này có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao trong chẩn đoán (Jacquier và cs., 1991). Tuy nhiên, quy trình sản xuất kháng nguyên này rất phức tạp và tốn thời gian, bao gồm một số bước chính như: (1) thu trứng từ tử cung của giun trưởng thành, (2) nuôi trứng phát triển đến giai đoạn có chứa ấu trùng gây nhiễm (ấu trùng giai đoạn 3), (3) kích nở trứng để thu ấu trùng, (4) nuôi ấu trùng trong môi trường thích hợp, (5) thu kháng nguyên chất tiết của ấu trùng từ môi trường nuôi. Trong đó bước nuôi trứng phát triển đến giai đoạn gây nhiễm đóng vai trò rất quan trọng vì số lượng ấu trùng thu được sẽ quyết định nồng độ kháng nguyên.

Hai môi trường được sử dụng rộng rãi để nuôi trứng *T. canis* là formol và acid sunfuric loãng. Formol được sử dụng ở các nồng độ khác nhau, bao gồm formol 1% (Ponce-Macotela và cs., 2011; El-Naga và cs., 2018); formol 2% (Lescano và cs., 1998); formol 4% (Thomas và cs., 2016). Ngoài ra acid sunfuric loãng (H_2SO_4 0,1N) cũng được sử dụng để nuôi trứng (Rosypal von Dohlen và cs., 2017; Nguyen và cs., 2020). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào so sánh về sự phát triển ở các môi trường của trứng. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá hiệu quả của các môi trường nuôi đến sự phát triển của trứng giun đũa chó *T. canis*, đặc biệt là tỷ lệ phát triển của trứng đến giai đoạn chứa ấu trùng gây nhiễm. Từ đó lựa chọn được môi trường tốt nhất cho sự phát triển của trứng giun đũa chó *T. canis* nói riêng và trứng giun tròn nói chung.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giun đũa chó trưởng thành được thu tại một số cơ sở giết mổ chó trên địa bàn Hà Nội. Giun trưởng thành được rửa nhiều lần trong nước sinh lý để loại bỏ hết những cặn bã hoặc chất chứa đường tiêu hoá của chó bám trên bề mặt, sau đó lựa chọn giun cái để mổ tử cung thu trứng. Trứng thu được được rửa nhiều lần trong nước cất dưới điều kiện ly tâm với tốc độ 1500 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các vật chất khác từ giun trưởng thành trong quá trình thu trứng. Tiếp đến, trứng được lọc qua lưới lọc có kích thước lỗ lọc 1mm. Trước khi nuôi, trứng được rửa trong NaOH 0,5N để loại bỏ lớp vỏ protein (protein coat).

- Các môi trường nuôi: Môi trường acid H_2SO_4 0,1 N được pha từ dung dịch acid H_2SO_4 nguyên chất (98%) với nước cất. Khi pha phải nhỏ từ từ 3,18 ml dung dịch acid H_2SO_4 vào 1000 ml nước cất.

Môi trường formol còn lại được pha từ dung dịch formol (38%) với nước cất để được dung dịch formol có nồng độ 10%, sau đó sẽ pha về các nồng độ môi trường tương ứng là 1%, 2% và 4%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi trứng

Trứng *T. canis* được nuôi trong hộp nuôi cấy (culture flask T25) đồng thời ở 10 ml các môi trường formol 1%, formol 2%, formol 4% và môi trường H₂SO₄ 0,1N với mật độ 4000 trứng/ml dung dịch. Mục dung dịch được đánh dấu trên bình nuôi để theo dõi. Nếu mục dung dịch bị giảm xuống do bay hơi thì sẽ được bổ sung thêm nước cất để đảm bảo mật độ trứng và nồng độ dung dịch nuôi. Các bình nuôi sẽ được đặt trong tủ ẩm và nuôi ở 28°C trong 31 ngày (Abou-El-Naga, 2018). Hàng ngày các bình nuôi sẽ được lấy ra và lắc nhẹ để cung cấp oxy cho môi trường nuôi.

2.2.2. Đánh giá sự phát triển của trứng

Theo dõi các giai đoạn phát triển của trứng bao gồm thời gian xuất hiện của các giai đoạn, thời gian tồn tại của các giai đoạn, tỷ lệ phát triển của trứng ở các giai đoạn (so sánh với tổng số trứng quan sát). Cụ thể, lấy 25 µl dung dịch nuôi có chứa trứng, theo dõi sự phát triển đối với 100 trứng, mỗi lần theo dõi lặp lại 3 lần, cuối cùng xác định sự

phát triển của trứng ở mỗi môi trường theo tỷ lệ %. Xác định các giai đoạn phát triển của trứng theo Abou-El-Naga (2018).

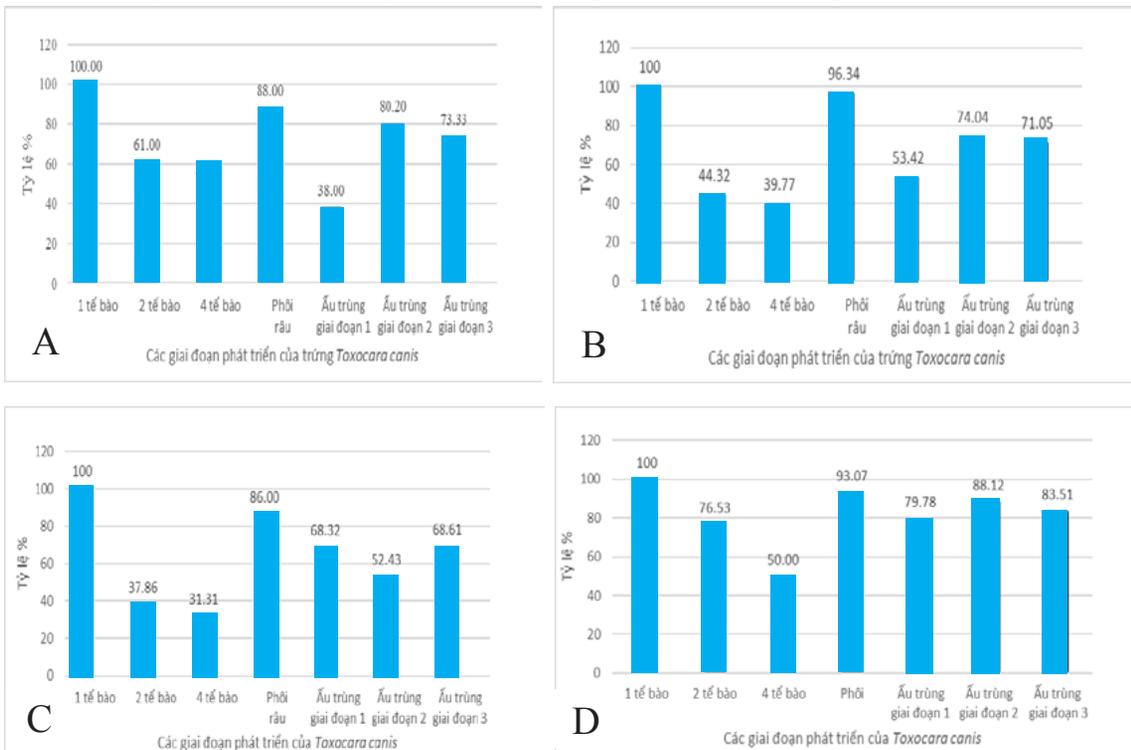
2.2.3. Đánh giá kết quả

Mỗi thí nghiệm (trứng *T. canis* được nuôi ở các môi trường khác nhau) được lặp lại 3 lần, các giá trị theo dõi được đánh giá bằng giá trị trung bình. So sánh sự phát triển của trứng trong các môi trường khác nhau, đánh giá tỷ lệ trứng phát triển đến giai đoạn gây nhiễm, tỷ lệ ấu trùng nở sau nuôi cấy. So sánh tỷ lệ phát triển của trứng chứa ấu trùng gây nhiễm (ấu trùng giai đoạn 3) giữa các môi trường sử dụng hàm Chi-square (χ^2), với độ tin cậy 95% (P < 0,05).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự phát triển của trứng *Toxocara canis* trong các môi trường khác nhau

Kết quả theo dõi sự phát triển của trứng *T. canis* cho thấy ở cả bốn môi trường, trứng đều phát triển theo một quy luật nhất định (hình 1).



Hình 1. Sự phát triển của trứng *Toxocara canis* trong các môi trường khác nhau. A: formol 1%, B: formol 2%, C: formol 4%, D: H₂SO₄ 0,1N

Sau giai đoạn trứng chứa một tế bào (tỷ lệ là 100%), tỷ lệ phát triển của trứng ở giai đoạn chứa 2 và 4 tế bào giảm xuống (từ 37,86% - 76,53% và 31,31% - 50,00% tương ứng cho hai giai đoạn). Sau đó, tỷ lệ trứng phát triển đến giai đoạn phôi râu tăng mạnh; đạt từ 86,00% - 96,34%. Tiếp đến, tỷ lệ trứng phát triển đến giai đoạn chứa ấu trùng 1 lại giảm xuống và tăng trở lại ở giai đoạn trứng chứa ấu trùng giai đoạn 2 và 3 (ngoại trừ khi nuôi trứng trong môi trường formol 4%, tỷ lệ trứng chứa ấu trùng 2 thấp hơn). Sự giảm tỷ lệ ở các giai đoạn trứng chứa 2 hoặc 4 tế bào không phải do trứng ngừng/không phát triển mà do thời gian chuyển giai đoạn ở các giai đoạn này rất ngắn (từ giai đoạn trứng chứa 1 tế bào sang trứng chứa 2 tế bào hoặc từ giai đoạn trứng chứa 2 tế bào sang giai đoạn trứng chứa 4 tế bào) nên sau 24 giờ quan sát thì chỉ còn một tỷ lệ nhất định trứng đang phát triển ở giai đoạn đó.

Kết quả này được thể hiện rõ hơn ở bảng 1. Trong môi trường formol 1%, formol 2% và môi trường H₂SO₄ 0,1N ở ngày thứ 2 và 3 có thể quan sát được cả ba giai đoạn phát triển của trứng, bao gồm giai đoạn trứng chứa 2 tế bào, 4 tế bào và phôi râu. Riêng trong môi trường formol 4%, trứng *T. canis* phát triển chậm hơn so với các môi trường còn lại, đến ngày thứ 8 mới quan sát được trứng ở giai đoạn phôi râu. Đây cũng là môi trường quan sát được sự xuất hiện của trứng phát triển đến giai đoạn gây nhiễm muộn nhất là ngày thứ 23. Trong số các môi trường sử dụng trong nghiên cứu thì ở môi trường formol 2%, sự phát triển của trứng *T. canis* từ giai đoạn nọ sang giai đoạn kia là nhanh nhất và đạt đến giai đoạn trứng chứa ấu trùng gây nhiễm sớm nhất, ở ngày thứ 17 (bảng 1).

Bảng 1. Thời gian bắt đầu xuất hiện ở mỗi giai đoạn của trứng *Toxocara canis* và tỷ lệ trứng phát triển đến từng giai đoạn ở thời điểm quan sát

Môi trường nuôi	Tỷ lệ trứng phát triển đến từng giai đoạn ở thời điểm quan sát						
	1 tế bào (%)	2 tế bào (%)	4 tế bào (%)	Phôi râu (%)	Ấu trùng giai đoạn 1 (%)	Ấu trùng giai đoạn 2 (%)	Ấu trùng giai đoạn 3 (%)
Formol 1%	Ngày 1 (100)	Ngày 2 (9,90)	Ngày 2 (5,94)	Ngày 2 (0,99)	Ngày 8 (9,00)	Ngày 11 (62,50)	Ngày 20 (5,00)
Formol 2%	Ngày 1 (100)	Ngày 2 (44,32)	Ngày 2 (39,77)	Ngày 3 (40,35)	Ngày 5 (8,96)	Ngày 10 (13,33)	Ngày 17 (8,7)
Formol 4%	Ngày 1 (100)	Ngày 2 (13,86)	Ngày 4 (4,04)	Ngày 8 (50,48)	Ngày 10 (32,32)	Ngày 13 (8,74)	Ngày 23 (9,09)
H ₂ SO ₄ 0,1N	Ngày 1 (100)	Ngày 2 (15,53)	Ngày 2 (3,88)	Ngày 2 (0,97)	Ngày 8 (19,80)	Ngày 14 (64,36)	Ngày 20 (1,01)

Sự phát triển của trứng *T. canis* trong điều kiện phòng thí nghiệm cũng được nghiên cứu chi tiết bởi Abou-El-Naga (2018) khi nuôi trứng trong môi trường formol 1%. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng giai đoạn trứng chứa 1, 2 và 4 tế bào đều có thể quan sát được vào ngày thứ 2, giai đoạn phôi râu xuất hiện từ ngày thứ 3 và đến ngày thứ 9 thì trứng đã phát triển đến giai đoạn chứa ấu trùng 1, ngày thứ 18 xuất hiện trứng chứa ấu trùng gây nhiễm. Như vậy, quá

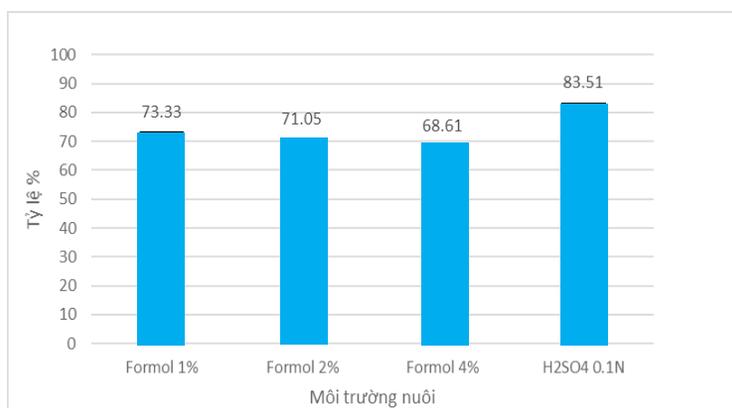
trình phát triển của trứng *T. canis* ở formol 1% trong nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự.

3.2. Tỷ lệ trứng *Toxocara canis* phát triển đến giai đoạn chứa ấu trùng gây nhiễm tại ngày 31 ở các môi trường nuôi

Như đã đề cập ở trên, tỷ lệ phát triển đến giai đoạn trứng chứa ấu trùng 3 (giai đoạn gây nhiễm) của trứng *T. canis* trong quá trình nuôi là

rất quan trọng, nó quyết định số lượng ấu trùng thu được sau khi nở để nuôi và thu kháng nguyên chất tiết (Excretory/secretory antigen). Kết quả ở nghiên cứu này chỉ ra rằng, tỷ lệ trứng phát triển đến giai đoạn gây nhiễm cao nhất khi nuôi trong môi trường H_2SO_4 0,1N; đạt 83,51%. Tỷ lệ này giảm dần khi nuôi ở môi trường formol 1% (73,33%), formol 2% (71,05%) và formol 4% (68,61%) ($P < 0,05$) (hình 2). Môi trường formol 1% là môi trường được sử dụng từ rất lâu để nuôi trứng của *T. canis* (De Savigny, 1977), sau đó các tác giả khác đã lựa chọn nồng độ formol khác nhau để nuôi trứng *T. canis*, như formol 2% (Lescano và cs., 1998; Chung và cs., 2004), formol 4% (Thomas và cs., 2016). Môi

trường H_2SO_4 0,1N mới được sử dụng trong vài năm trở lại đây (Rosypal von Dohlen và cs., 2017; Nguyen và cs., 2020). Mặc dù thông tin chi tiết về tỷ lệ phát triển của trứng *T. canis* đến giai đoạn gây nhiễm không được đề cập đến ở hầu hết các nghiên cứu kể trên. Tuy nhiên, trong môi trường formol 4% chỉ quan sát được khoảng 60% số trứng phát triển đến giai đoạn gây nhiễm (Thomas và cs., 2016) tương đương với kết quả trong nghiên cứu này. Ngoài ra, tỷ lệ này đạt khoảng 80% ở môi trường formol 1% (Abou-El-Naga, 2018). Ở đây, chúng tôi nuôi trứng *T. canis* trong các môi trường khác nhau, trong cùng một điều kiện và thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho thấy kết quả đáng tin cậy.



Hình 2. Tỷ lệ phát triển của trứng *Toxocara canis* đến giai đoạn chứa ấu trùng gây nhiễm (ấu trùng giai đoạn 3) trong các môi trường

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu trên chỉ ra rằng môi trường H_2SO_4 0,1 N là môi trường tốt nhất cho sự phát triển của trứng giun đũa chó *Toxocara canis*. Ngoài việc ứng dụng môi trường H_2SO_4 0,1 N để nuôi trứng *T. canis*, môi trường này cũng có thể được sử dụng để nuôi trứng của một số giun tròn khác như trứng giun đũa lợn *Ascaris suum*, trứng giun đũa gà *Ascaridia galli*,... phục vụ cho việc sản xuất kháng nguyên chất tiết ứng dụng cho các chẩn đoán huyết thanh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abou-El-Naga, I. F., 2018. Development stages and visibility of *Toxocara canis* eggs outside the host. *Biomedica*. 38: 189-97.
2. Beaver, P. C., Snyder, C. H., Carreara, G. M., Dent, J. H., and Lafferty, J. W., 1952. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics*, 9: 7-19
3. De Savigny D. H, and Tizard I. R., 1977. Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody

- tests. 1977. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71 (6): 501-507.
4. De Savigny D. H., Voller A., and Woodruff A. W., 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 32: 284-288
 5. Đỗ Trung Dũng, Trần Thanh Dương, Nguyễn Thị Hợp, Hoàng Quang Vinh, Đỗ Thị Thu Thủy và Nguyễn Thị Lan Anh, 2016. Thực trạng nhiễm ấu trùng giun đũa chó mèo (*Toxocara* spp.) trên người tại một số điểm nghiên cứu thuộc Hà Nội và Hưng Yên, năm 2014-2015. *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, 3 (92): 10- 16
 6. Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J., 1991. Immunodiagnosis of toxocariasis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29:1831-1835.
 7. Lescano, S. Z., Nakhle, M. C., Chieffi, P. P., 1998. Effect of *in vitro* cultivation time on the infectivity of *Toxocara canis* eggs. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 40 (3).
 8. Phillipson, R. F., and Jace, J. W., 1967. Human infection with porcine *Ascaris*. *British Medical Journal*. 2, 865
 9. Ponce-Macotela, M., Rodriguez-Caballero, A., Peralta-Abarca, G. E., Matinez-Gordillo, M., 2011. A simplified method for hatching and isolating *Toxocara canis* larvae to facilitate excretory-secretory antigen collection in vitro. *Vet Parasitol*. 175: 382-385.
 10. Rosypal von Dohlen, A., Houk-Miles, A. E., Zajac, A. M., Lindsay, A. S., 2017. Flotation of *Toxocara canis* eggs in commercial bleach and effects of bleach treatment times on larval development in these eggs. *J Parasitol*. 103 (2): 183-186
 11. Trần Thanh Dương, Nguyễn Thu Hương và cs., 2014. Tình hình nhiễm ấu trùng giun đũa chó mèo trên cộng đồng dân cư tỉnh Hà Tĩnh và Thanh Hóa năm 2013. *Tạp chí Phòng chống sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, Hội nghị Khoa học – đào tạo chuyên ngành Ký sinh trùng toàn quốc lần thứ 41: 3-10
 12. Trần Trọng Dương, 2014. *Nghiên cứu thực trạng, một số yếu tố nguy cơ nhiễm ấu trùng giun đũa chó Toxocara canis ở người và hiệu quả điều trị của Albendazole tại hai xã thuộc huyện An Nhơn, Bình Định (2011-2012)*. Luận án tiến sĩ.
 13. Thomas D., Jeyathilakan N., Basith S. A., and Senthilkumar, T. M. A., 2016. *In vitro* production of *Toxocara canis* excretory-secretory (TES) antigen. *Journal of Parasitic Diseases*, 40 (3): 1038-1043.
 14. Yoshida A., Kikuchi T., Nakagaki, S., and Maruyama H., 2016. Optimal ELISA antigen for the diagnosis of *Ascaris suum* infection in humans, *Parasitol. Res.* 115 (12): 4701-4705.
- Ngày nhận 10-1-2021
 Ngày phản biện 15-2-2021
 Ngày đăng 1-6-2021