

PRESERVATION EFFICIENCY OF CATTLE STOOL BY VACUUM FOR DETERMINING INTESTINAL NEMATODE EGGS

Nguyen Van Trong*, Nguyen Ngoc Dinh

Tay Nguyen University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 25/9/2021 Revised: 26/9/2022 Published: 07/10/2022	Selecting an appropriate method for faecal preservation is one of the prerequisites for microscopy-based examination of parasitic eggs. This study was designed to evaluate the effectiveness of vacuum preservation technique for determination of nematode eggs in cattle faecal samples. Faecal samples were collected from 286 cattle and divided into two aliquots with each using different preservation methods. Simple flotation and McMaster technique were utilized to determine the prevalence and egg intensity (egg per gram), respectively. The results showed that the percentage of positive samples stored at vacuumed condition was 21.0% (95% CI: 16.4 - 26.2%) higher than those of 5% formalin with 13.3% (95% CI: 9.6 - 17.8%). The mean number of eggs per gram in samples that stored at vacuumed condition was 60 ± 44.5 higher than that of 5% formalin with 51.6 ± 33.4. Under vacuumed condition, simple flotation had a sensitivity of 92.3% (95% CI: 85.5 - 98.7%) higher than that of 5% formalin, 58.4% (95% CI: 41.51 - 70.4%). This study shows that faecal samples that kept at the condition of vacuum is superior to those preserved in 5% formalin for qualitative and quantitative purposes of nematode eggs in cattle feces.
KEYWORDS Vacuum 5% formalin Preservation methods Cattle fecal samples McMaster	

HIỆU QUẢ BẢO QUẢN MẪU PHÂN BẰNG CHÂN KHÔNG TRONG XÉT NGHIỆM TRỨNG GIUN TRÒN TRÊN BÒ

Nguyễn Văn Trọng*, Nguyễn Ngọc Đình

Trường Đại học Tây Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 25/9/2021 Ngày hoàn thiện: 26/9/2022 Ngày đăng: 07/10/2022	Lựa chọn phương pháp bảo quản phân thích hợp là một trong những điều kiện tiên quyết để xét nghiệm tìm trứng sử dụng kỹ thuật soi kính hiển vi. Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hiệu quả của kỹ thuật bảo quản mẫu phân bò bằng hút chân không trong xét nghiệm trứng giun tròn. Mẫu phân lấy từ 286 bò được chia làm hai phần với mỗi phần sử dụng hai kỹ thuật bảo quản khác nhau. Phương pháp phù nổi và McMaster lần lượt được sử dụng để kiểm tra số mẫu dương tính và số trứng/gam phân. Kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính được phát hiện khi bảo quản chân không là 21% (khoảng tin cậy 95%: 16,4 - 26,2%) cao hơn tỷ lệ mẫu dương tính bảo quản trong formalin 5%, 13,3% (khoảng tin cậy 95%: 9,6 - 17,8%). Trung bình số trứng/gam phân từ mẫu bảo quản chân không là $60 \pm 44,5$ cao hơn từ mẫu bảo quản trong formalin 5%, $51,6 \pm 33,4$. Khi xét nghiệm mẫu bảo quản chân không, phương pháp phù nổi có độ nhạy 92,3% (khoảng tin cậy 95%: 85,5 - 98,7%) cao hơn so với bảo quản trong dung dịch formalin 5% với độ nhạy 58,4% (khoảng tin cậy 95%: 41,51 - 70,4%). Nghiên cứu này cho thấy bảo quản mẫu phân bò trong điều kiện chân không ưu việt hơn bảo quản bằng formalin 5% cho cả định tính và định lượng giun tròn.
TỪ KHÓA Chân không Formalin 5% Phương pháp bảo quản Mẫu phân bò McMaster	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5082>

* Corresponding author. Email: nvtrong@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Xét nghiệm phân để tìm trứng sử dụng kỹ thuật soi kính hiển vi là một phương pháp quan trọng trong chẩn đoán ký sinh trùng trên động vật. Một loạt các kỹ thuật soi kính hiển vi dùng phát hiện và đánh giá cường độ trứng ký sinh trùng đã được phát triển như soi tươi, phù nổi, kỹ thuật McMaster và FLOTAC [1]. Trong số đó, phương pháp McMaster được sử dụng rộng rãi nhất cho phát hiện và định lượng trong chẩn đoán ký sinh trùng thú y, do chi phí thấp và độ nhạy cao [2]. Hiệu quả của phương pháp McMaster bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như phương pháp bảo quản phân [3], dung dịch phù nổi được sử dụng trong phương pháp [4] và số lượng trứng có trong phân. Đối với hầu hết các mục đích, chỉ cần tối thiểu 25 trứng/gam phân là đủ đáp ứng cho độ nhạy của phương pháp McMaster [5].

Các phương pháp bảo quản mẫu phân thường dựa trên đặc điểm sinh học của trứng. Sự nở của trứng ảnh hưởng phần lớn bởi nhiệt độ và độ ẩm [6], nồng độ oxy [7], [8] cho nên mẫu phân có thể bảo quản bằng cách làm giảm nhiệt độ và/hoặc làm giảm nồng độ oxy trong mẫu. Cách thức làm giảm nhiệt độ của mẫu được áp dụng phổ biến như làm lạnh hoặc đông lạnh. Phương pháp bảo quản bằng cách giết chết trứng mà không phá huỷ trứng cũng được áp dụng. Khi giữ mẫu phân cừu trong điều kiện chân không ở nhiệt độ 4°C cho phép bảo quản hiệu quả trứng giun tròn đường tiêu hoá trong tối đa 21 ngày [5]. Do sự khác nhau về đặc điểm sinh học của ký sinh trùng và trạng thái sinh lý vật chủ nên không có phương pháp bảo quản phân hoặc dung dịch phù nổi dùng chung cho từng loại ký sinh trùng [9]. Như vậy, lựa chọn phương pháp bảo quản phân thích hợp là một trong những bước quan trọng để xét nghiệm tìm trứng ký sinh trùng.

Có nhiều phương pháp bảo quản mẫu phân với những ưu nhược điểm riêng. Mẫu phân có thể không cần sử dụng phương pháp bảo quản nếu mẫu được xét nghiệm trong vòng 1 đến 2 giờ, hoặc bảo quản ở 4°C nếu thời gian chờ xét nghiệm dài hơn [10]. Tuy nhiên, bảo quản lạnh có thể gặp khó khăn khi triển khai thu thập mẫu với số lượng lớn, địa điểm lấy mẫu ở xa, việc vận chuyển mẫu tới phòng thí nghiệm có thể mất nhiều thời gian và có thể làm thay đổi nhiệt độ trong thùng đựng mẫu. Để bảo quản phân lâu dài, formalin 10% là chất cố định phổ biến cho xét nghiệm dựa trên kính hiển vi tìm trứng ký sinh trùng; nghiên cứu cho thấy 50% trứng giun họ *Strongylidae* vẫn được phát hiện sau 200 ngày bảo quản [3]. Tuy nhiên, formalin là hoá chất độc hại, làm biến dạng trứng; mẫu phân bảo quản trong dung dịch formalin không thể sử dụng cho xét nghiệm PCR do loại hóa chất này ức chế sự nhân đôi của DNA [11] làm lãng phí nguồn mẫu và hạn chế sự đa dạng của việc sử dụng các phương pháp xét nghiệm khác nhau. Xuất phát từ những hạn chế của các phương pháp bảo quản lạnh, bảo quản bằng formalin, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: (i) bước đầu đánh giá hiệu quả của phương pháp bảo quản mẫu phân trong chân không khi so sánh với phương pháp bảo quản dùng formalin 5% cho xét nghiệm trứng giun tròn ở bò và (ii) xác định ảnh hưởng của phương pháp bảo quản đến độ nhạy của phương pháp xét nghiệm.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chế tạo dụng cụ hút chân không cầm tay

Dụng cụ hút chân không được chế tạo bằng 1 xi lanh 50cc, 2 van 1 chiều, đầu kim và ống dây (Hình 1). Van một chiều ở đầu gắn kim chỉ cho phép không khí đi chuyển từ đầu kim đến xi lanh. Van ở đầu khác chỉ cho phép không khí đi từ xi lanh ra ngoài. Như vậy, khi kéo và đẩy xi lanh, không khí sẽ đi từ đầu có gắn kim và đi ra ngoài từ van bên cạnh.

2.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu

Mẫu phân bò được thu thập tại huyện Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk với số mẫu được tính theo công thức so sánh 2 tỷ lệ cho thử nghiệm một đuôi [12]:

$$n = \frac{\{Z_{\alpha}\sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta}\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}\}^2}{(p_2 - p_1)^2}$$

Trong đó:

n = cỡ mẫu cho mỗi nhóm

p_1 = tỷ lệ nhiễm thực đối với mẫu bảo quản bằng formalin, $p_1 = 0,132$

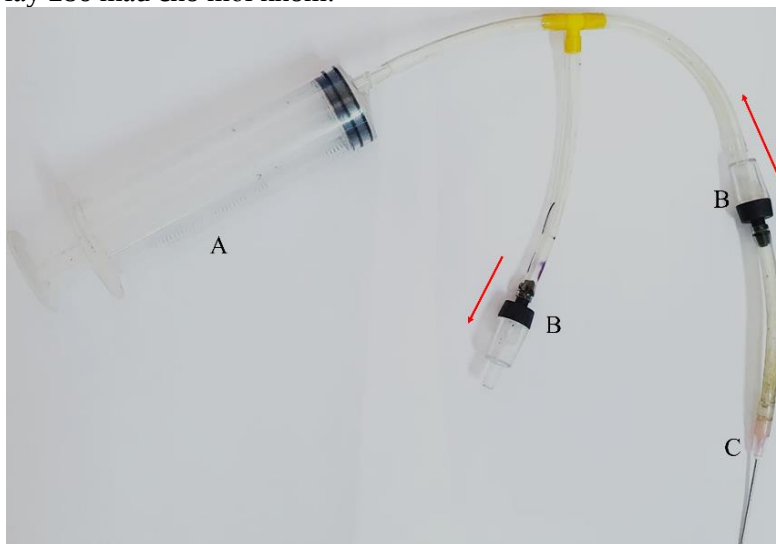
p_2 = tỷ lệ nhiễm thực đối với mẫu bảo quản chân không, $p_2 = 0,210$

$p = (p_1 + p_2)/2 = 0,171$

Z_α = hệ số liên quan đến mức ý nghĩa bắt buộc $\alpha = 0,05$; $Z_\alpha = 1,64$

Z_β = hệ số liên quan đến xác suất xảy ra lỗi loại II, $\beta = 0,2$, $Z_\beta = 0,84$.

Như vậy, cần lấy 286 mẫu cho mỗi nhóm.



Hình 1. Dụng cụ hút chân không cầm tay, (A): xi lanh 50cc, (B): van 1 chiều, (C): kim, hình minh họa mô tả sự di chuyển của không khí khi kéo và đẩy xi lanh

2.3. Thu thập mẫu và xét nghiệm

Mẫu phân được lấy sau khi bò vừa mới thải ra và mỗi mẫu chia làm 2 phần, phần thứ nhất bảo quản bằng dung dịch formalin 5%, phần còn lại bảo quản theo phương pháp hút chân không. Phần thứ nhất lấy khoảng 7 gam phân cho vào ống falcon, sau đó cho dung dịch formalin 5% đến vạch 14 ml. Phần thứ 2 lấy khoảng 7 gam cho vào túi zip và hút chân không bằng dụng cụ hút chân không (hình 1). Các mẫu phân được lưu trữ nơi mát mẻ, không có ánh nắng và được kiểm tra sự xuất hiện của trứng sau 5 ngày bằng phương pháp phù nổi với dung dịch muối NaCl bão hòa (S.G = 1,2). Các mẫu dương tính được đếm trứng bằng kỹ thuật McMaster.

2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu lưu trữ trong phần mềm Microsoft Excel 2016. Do số liệu không tuân theo phân phối chuẩn và không độc lập, do đó: (i) Tỷ lệ dương tính giữa hai phương pháp bảo quản được so sánh bằng kiểm định McNemar bằng lệnh `mcnemar.test()`; (ii) Cường độ nhiễm giun tròn giữa 2 phương pháp bảo quản được so sánh bằng kiểm định Wilcoxon signed rank test bằng lệnh `wilcox.test()`; (iii) Độ nhạy của phương pháp xét nghiệm phù nổi được tính toán bằng lệnh `acc.paired()` trong package DTComPair. Tất cả số liệu được phân tích bằng phần mềm R phiên bản 3.6.2.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hiệu quả của phương pháp bảo quản chân không và formalin 5% dựa trên số lượng mẫu dương tính

Qua xét nghiệm mẫu phân được bảo quản bằng dung dịch formalin 5% và bảo quản bằng hút chân không sử dụng phương pháp phù nổi, chúng tôi phát hiện được lần lượt 38 và 60 mẫu dương tính. Kết quả về tỷ lệ dương tính được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu dương tính khi sử dụng các phương pháp bảo quản

Phương pháp bảo quản	n	+	%	KTC 95%
Formalin 5%	286	38	13,3	9,6 - 17,8
Chân không	286	60	21,0	16,4 - 26,2

Ghi chú: n: số mẫu phân tích; +: Số mẫu dương tính; KTC: Khoảng tin cậy

Bảng 1 cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính bằng phương pháp xét nghiệm phù nổi khi bảo quản chân không là 21% (KTC 95%: 16,4 - 26,2%) cao hơn tỷ lệ mẫu dương tính khi bảo quản formalin là 13,3% (KTC 95%: 9,6-17,8%) ($P < 0,05$). Trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 ngày bảo quản bằng formalin 10%, tỷ lệ mẫu phân hươu phát hiện trứng bị giảm hơn 50% [3]. Tỷ lệ hiện nhiễm giun tròn trên ngựa ở các mẫu được bảo quản bằng formalin 4% sau 14 ngày thấp hơn 12,8% so với mẫu đối chứng [13]. Formalin ở nồng độ 5% là một chất diệt khuẩn mạnh, được sử dụng phổ biến làm chất bảo quản mẫu phân. Tuy nhiên, trong trường hợp trứng ký sinh trùng có vỏ mỏng như giun tròn họ *Strongylidae*, dung dịch formalin làm biến dạng trứng [3]. Điều này giải thích tại sao tỷ lệ dương tính đối với mẫu bảo quản trong dung dịch formalin 5% thấp hơn khá nhiều so với mẫu bảo quản chân không. Ngoài nhiệt độ và độ ẩm, sự nở của trứng ảnh hưởng rất lớn bởi nồng độ oxy trong phân [7], [8] cho nên trong điều kiện chân không, quá trình nở của trứng trong mẫu có thể bị làm chậm lại. Kết quả nghiên cứu này cho thấy hiệu quả của phương pháp bảo quản mẫu phân bò trong điều kiện chân không.

3.2. Hiệu quả của phương pháp bảo quản chân không và formalin 5% dựa trên số trứng/gam phân

Trong nghiên cứu này, các mẫu phân được bảo quản bằng phương pháp formalin 5% và hút chân không sau khi được xác định dương tính bằng phương pháp phù nổi, tiếp tục được đếm trứng bằng phương pháp McMaster để xác định cường độ nhiễm giun tròn. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Trung bình số trứng/gam phân khi sử dụng các phương pháp bảo quản

Phương pháp bảo quản	n	+	Số trứng/gam phân		
			Min-Max	Mean $\pm$ SD	σ (% , KTC 95%)
Formalin 5%	286	38	40 -200	51,6 $\pm$ 33,4	40 (20 – 60)
Chân không	286	60	40-320	60 $\pm$ 44,5	

Ghi chú: +: số mẫu dương tính; n: số mẫu phân tích; min: cường độ tối thiểu; max: cường độ tối đa; mean: trung bình số trứng/gam phân; SD: độ lệch chuẩn, σ : phương sai trung bình của hai phương pháp

Với xét nghiệm định lượng số trứng/gam phân, kết quả phân tích bằng trắc nghiệm Wilcoxon signed rank cho thấy phương pháp bảo quản chân không có trung bình số trứng/gam phân cao hơn và phương sai trung bình của số trứng/gam cao hơn 40% (KTC 95%: 20 – 60%) so với phương pháp formalin 5% ($P < 0,05$).

Các kỹ thuật đếm trứng có vai trò quan trọng dùng để ước tính mức độ ô nhiễm trứng giun sán, đánh giá hiệu quả của thuốc tẩy giun sán, xác định khả năng kháng giun của gia súc khi chọn giống và định hướng cho công tác điều trị và phòng bệnh. Tuy nhiên, các kỹ thuật này bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố liên quan đến mẫu phân như sự biến đổi về tiềm năng sinh học của các loài giun tròn [14], hàm lượng nước trong phân [15] và điều kiện lưu giữ/bảo quản [5], [8]. Trong khi số lượng trứng giun tròn ở bò đếm được thường thấp và đòi hỏi các kỹ thuật đếm trứng có độ nhạy cao hơn so với các động vật nhai lại khác [16], kết quả của nghiên cứu này cho thấy bảo quản chân không có thể là một kỹ thuật tiềm năng để bảo quản mẫu phân dùng trong định lượng trứng giun tròn.

3.3. Hiệu quả của phương pháp phù nổi khi bảo quản mẫu phân bằng formalin 5% và chân không

Ảnh hưởng của phương pháp bảo quản đến độ nhạy của phương pháp phù nổi được tính toán bằng lệnh `acc.paired()` trong package `DComPair`. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả và độ nhạy của phương pháp phù nổi khi bảo quản mẫu phân bằng formalin 5% và chân không

Phương pháp bảo quản	Chân không			Tổng cộng
	Kết quả	-	+	
Formalin	-	221	27	248
	+	5	33	38
Tổng cộng		226	60	286
Se _{phù nổi - formalin}		58,4% (KTC 95%: 41,5 - 70,4)		
Se _{phù nổi - chân không}		92,3% (KTC 95%: 85,5 - 98,7)		

Ghi chú: +: số mẫu dương tính; -: số mẫu âm tính; Se: độ nhạy; KTC: khoảng tin cậy.

Bảng 3 cho thấy phương pháp bảo quản có ảnh hưởng lớn tới độ nhạy của phương pháp xét nghiệm. Khi bảo quản chân không, phương pháp phù nổi có độ nhạy 92,3% (KTC 95%: 85,5 - 98,7%) cao hơn so với khi bảo quản trong dung dịch formalin 5% là 58,4% (KTC 95%: 41,5 - 70,4%). Hiệu quả của kỹ thuật đếm trứng McMaster có thể bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như phương pháp bảo quản [3], lượng trứng trong phân thấp [17]. Phương pháp phù nổi khi xét nghiệm mẫu được bảo quản trong điều kiện chân không cho độ nhạy tốt. Bên cạnh đó, phương pháp bảo quản chân không có các ưu điểm tốt như hiệu quả bảo quản cao, giá thành rẻ (khoảng 50 nghìn đồng cho chế tạo dụng cụ và 50 nghìn/túi zip). Tuy nhiên, thời gian tối ưu của bảo quản chân không cần được nghiên cứu thêm. Kết quả của nghiên cứu này khẳng định sự ảnh hưởng của phương pháp bảo quản mẫu tới độ nhạy của phương pháp xét nghiệm.

4. Kết luận

Nghiên cứu này cho thấy kỹ thuật bảo quản chân không mang lại hiệu quả tốt hơn kỹ thuật bảo quản bằng formalin 5% cho cả mục đích định tính và định lượng giun tròn trên bò. Khi sử dụng kỹ thuật bảo quản chân không, phương pháp phù nổi có độ nhạy cao hơn so với khi bảo quản trong dung dịch formalin 5%. Để làm sáng tỏ hơn về thời gian tối ưu của kỹ thuật bảo quản mẫu phân bằng chân không và hiệu quả của kỹ thuật này trên mẫu phân của các loài vật nuôi khác, các nghiên cứu tiếp theo nên được thực hiện nhằm áp dụng rộng rãi kỹ thuật này trong thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. Cringoli, "FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique," *Parassitologia*, vol. 48, no. 3, pp. 381-384, 2006.
- [2] A. Pereckienė et al., "A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples," *Vet. Parasitol.*, vol. 149, no. 1-2, pp. 111-116, 2007.
- [3] W. J. Foreyt, "Recovery of nematode eggs and larvae in deer: Evaluation of fecal preservation methods," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 189, no. 9, pp. 1065-1067, 1986.
- [4] G. Cringoli, L. Rinaldi, V. Veneziano, G. Capelli, and A. Scala, "The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep," *Vet. Parasitol.*, vol. 123, no. 1-2, pp. 121-131, 2004.
- [5] L. Rinaldi, G. C. Coles, M. P. Maurelli, V. Musella, and G. Cringoli, "Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep," *Vet. Parasitol.*, vol. 177, no. 3-4, pp. 345-352, 2011.
- [6] R. K. Reinecke, *A field study of some nematode parasites of bovines in a semi-arid area, with special reference to their biology and possible methods of prophylaxis*, University of Pretoria, 1958.
- [7] H. W. Brown, "A quantitative study of the influence of oxygen and temperature on the embryonic development of the eggs of the pig ascarid (*Ascaris suum* Goeze)," *J. Parasitol.*, vol. 14, no. 3, pp. 141-160, 1928.

-
- [8] M. K. Nielsen, A. N. Vidyashankar, U. V. Andersen, K. DeLisi, K. Pilegaard, and R. M. Kaplan, "Effects of fecal collection and storage factors on strongylid egg counts in horses," *Vet. Parasitol.*, vol. 167, no. 1, pp. 55-61, 2010.
- [9] J. F. William, "Veterinary parasitology reference manual," *Iowa State Univ. Press*, vol. 3, no. 7, pp. 173-175, 2001.
- [10] L. R. Ballweber, "Diagnostic methods for parasitic infections in livestock," *Vet. Clin. Food Anim. Pract.*, vol. 22, no. 3, pp. 695-705, 2006.
- [11] F. Ramos *et al.*, "The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 93, no. 3, pp. 335-336, 1999.
- [12] M. Thrusfield, *Veterinary epidemiology*. John Wiley & Sons, 2018.
- [13] E. Jagła, J. Śpiewak, G. Zaleśny, and M. Popiołek, "Effect of storage and preservation of horse faecal samples on the detectability and viability of strongylid nematode eggs and larvae," *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, vol. 57, pp. 161-165, 2013.
- [14] A. Rowe, K. McMaster, D. Emery, and N. Sangster, "Haemonchus contortus infection in sheep: parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts," *Vet. Parasitol.*, vol. 153, no. 3-4, pp. 285-293, 2008.
- [15] L. F. Le Jambre, S. Dominik, S. J. Eady, J. M. Henshall, and I. G. Colditz, "Adjusting worm egg counts for faecal moisture in sheep," *Vet. Parasitol.*, vol. 145, no. 1-2, pp. 108-115, 2007.
- [16] T. H. M. Mes, H. W. Ploeger, M. Terlouw, F. N. J. Kooyman, M. P. J. Van der Ploeg, and M. Eysker, "A novel method for the isolation of gastro-intestinal nematode eggs that allows automated analysis of digital images of egg preparations and high throughput screening," *Parasitology*, vol. 123, no. 3, pp. 309-314, 2001.
- [17] B. Levecke *et al.*, "The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods," *Vet. Parasitol.*, vol. 188, no. 1-2, pp. 194-199, 2012.