

## XÁC ĐỊNH KHÁNG THỂ KHÁNG GIUN ĐŨA CHÓ MÈO *TOXOCARA* spp. VÀ GIUN ĐŨA LỢN *ASCARIS SUUM* Ở GÀ NUÔI THẢ VƯỜN

Nguyễn Thị Hoàng Yến<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Hợp<sup>2</sup>, Đỗ Trung Dũng<sup>2</sup>, Phạm Thị Tới<sup>3</sup>,  
Đông Thế Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Chiên<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Ký sinh trùng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Ký sinh trùng, Viện Sốt rét - Côn trùng - Ký sinh trùng Trung ương

<sup>3</sup>Trung tâm Chẩn đoán - Xét nghiệm bệnh động vật, Chi cục Thú y vùng 6

\*Tác giả liên hệ: nthyen@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 26.08.2020

Ngày chấp nhận đăng: 18.01.2020

### TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định sự có mặt của kháng thể kháng *Toxocara* spp. và *Ascaris suum* trên gà nuôi thả vườn. Nghiên cứu được tiến hành trên 251 mẫu huyết thanh thu tại chợ Trâu Quỳ (Gia Lâm, Hà Nội) và một số trang trại gà thả vườn (Bắc Giang). Phương pháp ELISA được tiến hành nhằm xác định kháng thể kháng *Toxocara* spp. và *A. suum* sử dụng kháng nguyên thô As-SWAP để sàng lọc và kháng nguyên chất tiết Tci-ES và Asm-ES để phân biệt loài gây nhiễm. Tiếp đó, *Toxocara* WB Kit được sử dụng để xác nhận các mẫu nhiễm *Toxocara* spp. và ELISA tiền hấp phụ kháng thể không đặc hiệu từ giun đũa gà *A. galli* để xác nhận các mẫu nhiễm *A. suum*. Kết quả sàng lọc cho thấy: 38,65% mẫu có mang kháng thể kháng nhóm giun tròn. Kết quả xác định loài chỉ ra có 11,55% và 2,79% mẫu dương tính với *Toxocara* spp. và *A. suum*. Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định *Toxocara* spp. và *A. suum* trên gà nhiễm tự nhiên ở Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu là thông tin quan trọng giúp người chăn nuôi nhận thức cần có biện pháp bảo vệ khi tiếp xúc với đất. Đồng thời, nghiên cứu đưa ra dấu hiệu về nguy cơ nhiễm *A. suum* trên người, tác nhân gây Hội chứng ấu trùng di chuyển chưa được công bố tại Việt Nam.

Từ khóa: *Ascaris suum*, ELISA, gà thả vườn, *Toxocara* spp.

### Detection of anti-*Toxocara* spp. and *Ascaris suum* Antibodies in Naturally Infected Free-range Chickens

### ABSTRACT

The purpose of this study was to detect anti-*Toxocara* spp. and *Ascaris suum* antibodies in freely raised chickens. Two hundred and fifty-one serum samples were collected at the fresh market (Trau Quy, Gia Lam, Ha Noi) and some small-scale free-range chicken farms (Bac Giang Province). Indirect ELISA was applied using As-SWAP crude antigen to screen and choose serum samples which showed positive reactions with anti-ascarid antibodies and using Tci-ES and Asm-ES antigens to discriminate infecting species. Next, *Toxocara* Western Blotting Kit was applied to confirm *Toxocara* infection, and pre-adsorbed ELISA was conducted to confirm *A. suum* infection. The results showed that: 38.65% of serum samples contained anti-ascarid antibodies. Additionally, the result of discrimination of infecting species assumed that 11.55% and 2.79% samples containing anti-*Toxocara* spp. and anti-*A. suum* antibodies, respectively. This is the first study to detect *Toxocara* spp. and *A. suum* in naturally infected free-range chickens. The attained results of this study provides important information for chicken farmers in protecting themselves in order to avoid exposure to ascarid egg-contaminated soil. Besides, it gives evidence of the risk of getting *A. suum* infection in humans in Vietnam.

Keywords: *Ascaris suum*, ELISA, free-range chicken, *Toxocara* spp.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Ascaris suum*, *Toxocara canis* và *Toxocara*

*cati* thuộc bộ giun đũa Ascaridida (Bowman, 2009) là các giun tròn có kích thước lớn, thường gặp trong ruột non của lợn, chó và mèo, còn gọi

là nhóm giun đũa. Đồng thời, đây cũng là nhóm các tác nhân gây ra Hội chứng ấu trùng di chuyển ở người (ascarid larva migrans syndrome - LMS), bao gồm ấu trùng di chuyển đến các cơ quan nội tạng như gan, phổi (visceral larva migrans - VLM), ấu trùng di chuyển đến mắt (ocular larva migrans - OLM), ấu trùng di chuyển đến hệ thần kinh (neural larva migrans - NLM), và thể ẩn (covert infection) (Magnaval & cs, 2001). Người bị nhiễm do tiếp xúc với đất có chứa trứng gây nhiễm, hoặc nuốt phải trứng gây nhiễm lẫn vào thức ăn, nước uống hoặc do ăn phải thịt và phủ tạng sống của một số động vật như gà, bò có chứa ấu trùng gây nhiễm (Ito & cs., 1986; Nagakura & cs., 1989).

Bên cạnh các vật chủ chính và người, gà cũng có thể bị nhiễm phải ấu trùng của nhóm giun tròn này do nuốt phải trứng chứa ấu trùng gây nhiễm từ đất bị ô nhiễm. Khi xâm nhập vào gà, ấu trùng thoát vỏ, xuyên qua thành ruột, theo mạch máu lên gan, phổi, và các cơ quan khác, nhưng không phát triển thành giun trưởng thành. Vì vậy, gà còn được gọi là vật chủ ngẫu nhiên hay vật chủ dự trữ của nhóm giun tròn này (Okoshi & Usui, 1968; Taira & cs., 2003; Azizi & cs., 2007; Yoshihara & cs., 2008). Thời gian và vị trí ký sinh ở gà khác nhau tùy vào loại mầm bệnh. Đối với giun đũa chó, ấu trùng sau khi từ gan di chuyển lên phổi lại quay trở lại gan và ký sinh lâu dài ở đó. Đối với giun đũa mèo, ấu trùng sau khi lên phổi thì tiếp tục theo mạch máu di chuyển đến phần thân thịt ký sinh (Okoshi & Usui, 1968; Oryan & cs., 2010). Riêng với giun đũa lợn, ấu trùng sau khi di chuyển lên phổi thì bị đào thải ra ngoài, thời gian tồn tại ở gà chỉ khoảng 14 ngày sau khi thu nhận trứng (Yoshihara & cs., 2008). Với đặc tính bới đất để tìm kiếm thức ăn, gà còn được xem là một chỉ báo để đánh giá sự ô nhiễm của đất với trứng thông qua việc xác định kháng thể kháng nhóm giun tròn này trên gà (Compos-de-Silva & cs., 2015; Von Söhsten & cs., 2017).

Mặc dù việc xác định kháng thể trong máu chỉ là phương pháp gián tiếp xác định gà bị nhiễm hoặc phơi nhiễm với mầm bệnh, nhưng không khẳng định được sự có mặt của mầm bệnh ở gà tại thời điểm xét nghiệm. Tuy nhiên,

đây là chỉ báo cho thấy gà đã hoặc đang mang mầm bệnh. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, kháng thể kháng *Toxocara* spp. có thể duy trì với hàm lượng cao đến 12 tuần sau khi gây nhiễm trên gà (Nguyen & cs., 2017), cùng với đó là thời gian tồn tại của ấu trùng trong gà lên đến 60 ngày (Okoshi, 1967), thậm chí đến 240 ngày (Oryan & cs., 2010). Trong trường hợp gà bị nhiễm ấu trùng giun đũa lợn *A. suum*, ấu trùng chỉ tồn tại khoảng 14 ngày (Yoshihara & cs., 2008), cùng với đó là kháng thể tăng mạnh nhất sau 14 ngày và giảm mạnh sau 4 tuần gây nhiễm, đặc biệt kháng thể lại được phát hiện với hàm lượng cao hơn và thời gian xuất hiện nhanh hơn khi gà nhiễm trứng giun đũa lợn lần thứ hai (Nguyen & cs., 2017). Điều này chứng tỏ khi xác định được kháng thể kháng *A. suum* ở gà chứng minh gà mới bị nhiễm mầm bệnh.

Hiện nay, kỹ thuật hấp phụ miễn dịch có gắn enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) để chẩn đoán gà bị nhiễm nhóm giun tròn này đã được phát triển (Nguyen & cs., 2020). Vì vậy nghiên cứu này đã ứng dụng quy trình chẩn đoán dựa vào kỹ thuật này để xác định sự có mặt của kháng thể kháng nhóm giun tròn trên gà nuôi thả tự nhiên. Thông qua việc xác định kháng thể kháng nhóm giun tròn này trên gà, nghiên cứu cung cấp thông tin quan trọng về sự ô nhiễm của đất đối với trứng giun tròn này, giúp cho người chăn nuôi nhận thức và cần có biện pháp phòng bệnh khi tiếp xúc với đất. Đồng thời cần có biện pháp hữu hiệu quản lý nguồn phân và rác thải của lợn, chó và mèo.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. Huyết thanh gà

Có 251 mẫu huyết thanh gà nuôi theo phương thức chăn thả được thu thập để xác định kháng thể kháng giun đũa (giun đũa chó mèo *Toxocara* spp. và giun đũa lợn *A. suum*). Trong đó, 63 mẫu được thu từ gà thịt nuôi thả vườn bán tại chợ Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội và 188 mẫu được thu tại một số trang trại chăn nuôi gà thả vườn tại Tân Yên, Yên Thế (Bắc Giang) bằng

phương pháp ngẫu nhiên đơn giản. Các mẫu huyết thanh này được thu từ tháng 2 đến tháng 7/2019. Các thông tin về lứa tuổi, sự có mặt của chó, mèo và lợn, quy mô trang trại cũng được thu thập trong quá trình lấy mẫu tại trang trại.

### **2.1.2. Giun trưởng thành *Toxocara canis* và *A. suum***

Giun trưởng thành gồm giun đũa lợn *A. suum* và giun đũa gà *Ascaridia galli* được thu từ lợn và gà nhiễm tự nhiên tại các cơ sở giết mổ tại Hà Nội. Giun đũa chó mèo trưởng thành được thu thập từ chó mèo nhiễm tự nhiên tại các cơ sở khám chữa bệnh tại Hà Nội. Giun trưởng thành thu được được rửa sạch nhiều lần trong nước sinh lý, giun đực được bảo quản ở -20°C để làm kháng nguyên thô, giun cái được tách riêng để mổ tử cung thu trứng. Trứng thu được được rửa nhiều lần trong nước cất và đem nuôi trong dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N ở điều kiện 25°C trong 35 ngày để phát triển đến giai đoạn gây nhiễm. Trứng gây nhiễm sau đó được rửa nhiều lần trong nước cất và bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng.

### **2.1.3. Các kháng nguyên sử dụng trong nghiên cứu**

Kháng nguyên thô (crude antigen): Kháng nguyên thô của giun đũa lợn *A. suum* và giun đũa gà *A. galli* được chuẩn bị như sau: giun trưởng thành được đồng nhất qua đêm trong dung dịch PBS (phosphate-buffer saline) 0,15M, pH 7,2 bằng thiết bị đồng nhất mô (Ultrasonic Homogenizer) trên máy khuấy từ. Tiếp đó, dung dịch đồng nhất được ly tâm với tốc độ 10.000g trong 10 phút ở 4°C. Cuối cùng, dung dịch nổi thu được được tách riêng và sử dụng như kháng nguyên thô. Các kháng nguyên này được ký hiệu là As-SWAP (*Ascaris suum* soluble adult worm antigen preparation) và Ag-SWAP (*Acaridia galli* soluble adult worm antigen preparatiion).

Kháng nguyên chất tiết (excretory/secretory - ES): Kháng nguyên chất tiết bao gồm kháng nguyên có nguồn gốc từ giun đũa chó (*Toxocara canis* infective - Tci-ES) và giun đũa lợn (Asm-ES) được chuẩn bị theo quy trình như sau (Yoshida & cs, 2016a). Ấu trùng gây nhiễm giun đũa chó *T. canis* được nở cơ học sử dụng các hạt

thủy tinh (hạt glass bead, đường kính 3 mm) ở điều kiện 37°C trong 30 phút. Dung dịch thu được được lọc qua màng lọc có đường kính lỗ lọc là 425µm để loại bỏ các hạt thủy tinh, ấu trùng giai đoạn 3 của *T. canis* được thu bằng phương pháp Baermann. Tiếp đó, ấu trùng được nuôi trong dung dịch RPMI 1640 (Wako, Osaka, Nhật Bản) có bổ sung 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin và 250 ng/ml amphotericin B (Gibco, Rockville, MD) ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Dung dịch nuôi được thu hàng tuần, bảo quản ở -20°C. Cuối cùng, kháng nguyên được tách khỏi dung dịch nuôi cấy bằng các ống siêu lọc (Amicon Untra-15 3K, Millipore, Billerica, MA). Nồng độ kháng nguyên được đo bằng Kit BCA Protein (ThermoFisher, Scientific).

Đối với kháng nguyên có nguồn gốc từ giun đũa lợn (*Ascaris suum* migration - Asm-ES): ấu trùng giai đoạn 3 của giun đũa lợn *A. suum* được thu từ phổi của thỏ trắng (Kyudo, Kumamoto, Nhật Bản). Cụ thể: thỏ được gây nhiễm với liều  $1,5 \times 10^5$  trứng chứa ấu trùng gây nhiễm giun đũa lợn *A. suum*. Sau 7 ngày gây nhiễm, thỏ bị giết và phổi được tách ra, cắt nhỏ và ấu trùng *A. suum* được thu bằng phương pháp Baermann. Ấu trùng thu được được nuôi trong dung dịch RPMI 1640. Quy trình thu dịch nuôi và thu kháng nguyên được tiến hành tương tự như đối với kháng nguyên chất tiết của giun đũa chó (Tci-ES). Quá trình chuẩn bị kháng nguyên chất tiết Asm-ES được thực hiện tại phòng thí nghiệm Ký sinh trùng, Khoa Y, Trường Đại học Miyazaki, Nhật Bản.

### **2.2.2. Các mẫu huyết thanh đối chứng dương và âm sử dụng trong nghiên cứu**

Thí nghiệm gây bệnh thực nghiệm trên gà

Có 12 gà một ngày tuổi được mua tại Trung tâm Giống gia cầm Thụy Phương (Viện Chăn nuôi) và được chuyển về phòng thí nghiệm ký sinh trùng (Bộ môn Ký sinh trùng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam). Gà được nuôi trong điều kiện thí nghiệm đến 4 tuần tuổi để thích nghi. Những gà này được chia thành 4 lô (n = 3), trong đó có 3 lô thí nghiệm và 1 lô đối chứng. Các lô thí nghiệm được gây nhiễm qua đường miệng với trứng giun đũa chó *T. canis*, giun đũa mèo *T. cati* và giun đũa lợn *A. suum*

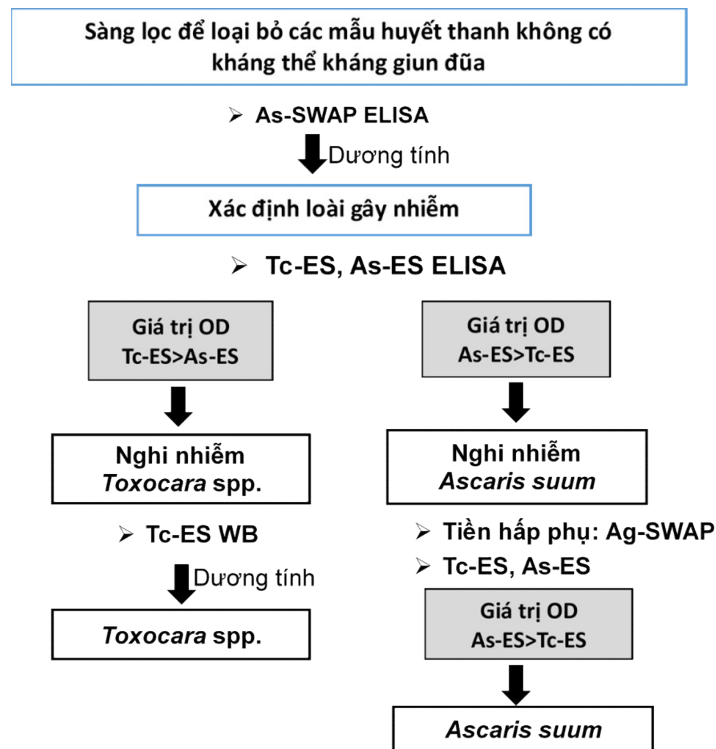
với liều 2,000 trứng/gà; lô đối chứng chỉ sử dụng PBS. Trước khi gây nhiễm, tất cả các gà đều được lấy máu, tách huyết thanh và kiểm tra kháng thể kháng giun đũa bằng kháng nguyên As-SWAP (quy trình tiến hành được mô tả ở phần dưới) và được sử dụng như là mẫu đối chứng âm. Sau 4 tuần gây nhiễm, tất cả gà đều được lấy máu, tách huyết thanh. Huyết thanh từ các lô gà gây nhiễm được sử dụng làm đối chứng dương cho kỹ thuật miễn dịch sau này.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Quy trình xác định kháng thể kháng *Toxocara spp.* và *A. suum* trên gà

Quy trình này được tiến hành theo nghiên cứu trước (Nguyen & cs., 2020). Cụ thể: quá trình xác định kháng thể kháng nhóm giun đũa được thực hiện theo 3 bước (Hình 1). Thứ nhất, thí nghiệm sàng lọc để chọn ra các mẫu huyết thanh có chứa kháng thể kháng giun đũa, sử dụng kháng nguyên As-SWAP. Thứ hai, xác định loài gây nhiễm sử dụng kháng nguyên Tci-ES và Asm-ES: các mẫu huyết thanh dương

tính ở bước 1 sẽ được kiểm tra đồng thời bằng hai kháng nguyên Tci-ES và Asm-ES. Giá trị OD (optical density) thu được được so sánh khi sử dụng hai kháng nguyên này. Các mẫu có giá trị OD cao hơn khi sử dụng kháng nguyên Tci-ES được phân loại vào nhóm nghi nhiễm *Toxocara spp.*; ngược lại các mẫu có giá trị OD cao hơn khi sử dụng kháng nguyên Asm-ES được phân loại vào nhóm nghi nhiễm *A. suum*. Cuối cùng, kết quả được khẳng định lại như sau: nhóm nghi nhiễm *Toxocara spp.* được kiểm tra bằng Kit Tc-ES WB (LDBIO Diagnostics, Lyon, Pháp), kết quả dương tính khi xuất hiện ít nhất 2 band có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng 25-34kD. Đối với các mẫu nghi nhiễm *A. suum*, do có thể có phản ứng dương tính giả với kháng thể kháng *A. galli*, vì vậy, các mẫu huyết thanh này sẽ được hấp phụ trước với kháng nguyên Ag-SWAP, sau đó thực hiện lại phản ứng với kháng nguyên Tci-ES và Asm-ES. Các mẫu nào có giá trị OD cao hơn khi thực hiện bằng kháng nguyên Asm-ES, chúng được cho là bị nhiễm *A. suum*.



Nguồn: Nguyen & cs., 2020.

Hình 1. Quy trình chẩn đoán *Toxocara spp.* và *Ascaris suum* trên gà

### 2.2.2. Quá trình tiền hấp phụ (pre-adsorbed) của huyết thanh với kháng nguyên Ag-SWAP

Để làm giảm sự gắn không đặc hiệu đối với kháng nguyên chất tiết, các mẫu huyết thanh được ủ qua đêm ở 4°C với kháng nguyên Ag-SWAP ở nồng độ 5 µg/ml. Sau khi hấp phụ, các mẫu huyết thanh tiền hấp phụ được sử dụng cho kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (ELISA).

### 2.2.3. Kỹ thuật hấp phụ miễn dịch có gắn enzyme (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay)

Kỹ thuật này được tiến hành theo mô tả của nghiên cứu đã công bố quốc tế (Nguyen & cs., 2020). Cụ thể như sau:

Quá trình gắn giữa kháng thể có trong huyết thanh với kháng nguyên giun đũa sẽ được thực hiện bằng kỹ thuật ELISA. Các đĩa 96 giếng (Nunc, Đan mạch), được phủ qua đêm hoặc kháng nguyên As-SWAP (2 µg/ml) hoặc kháng nguyên ES (Tci-ES hoặc Asm-ES, 1 µg/ml) trong dung dịch carbonate-bicarbonate 0,05M (pH 9,6) ở điều kiện 4°C. Kháng nguyên thừa được rửa bằng dung dịch PBST (PBS có chứa 0,05% Tween-20), sau đó các vị trí gắn không đặc hiệu được khóa bằng 1% casein (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Nhật Bản) trong Tris (TBS-tris buffer saline, pH 7,6). Huyết thanh pha loãng 2.000 lần được thêm vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau khi rửa bằng PBST, kháng thể IgG (horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-chicken

IgG (Bethyl Laboratory Inc., Montgomery) ở độ pha loãng 2.000 lần được bổ sung để xác định sự có mặt của kháng thể trong huyết thanh, các đĩa được ủ ở 37°C trong 60 phút. Cuối cùng, cơ chất ABTS (Kirkegard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) được thêm vào với thể tích 50 µl/giếng, ủ ở nhiệt độ phòng, trong 20 phút để phát màu. Giá trị OD được đọc bằng máy ELISA (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), ở bước sóng 405nm.

### 2.2.4. Kỹ thuật Western Blot

Để khẳng định kháng thể kháng *Toxocara* spp. trong nhóm mẫu được phân loại nghi nhiễm *Toxocara* spp., các mẫu huyết thanh này được kiểm tra lại bằng kỹ thuật WB sử dụng Kit thương mại *Toxocara* WB Kit (LDBIO Diagnostics, Lyon, Pháp). Các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, huyết thanh được pha loãng 120 lần trong PBST, ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc trong vòng 90 phút. Sau khi rửa 3 lần với PBST, các thanh này được ủ tiếp với kháng thể IgG (HPR) (Bethyl Laboratory Inc., Montgomery) ở độ pha loãng 12.500 lần, ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc trong 30 phút. Cuối cùng, màu được phát triển trong 60 phút sử dụng cơ chất. Cơ chất được chuẩn bị như sau: chuẩn bị dung dịch mẹ (Stock A) gồm có 100ml ethanol 80% (được pha từ ethanol tuyệt đối, Merk KgaA, Đức), có bổ sung 0,2g 4-chloro-1-naphthol. Khi sử dụng, pha dung dịch mẹ với tỷ lệ như sau: 4ml PBS (1X), 1ml Stock A và 2,5µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, trộn đều (pha trước khi sử dụng).

**Bảng 1. Tỷ lệ huyết thanh dương tính với kháng thể kháng nhóm giun đũa bằng As-SWAP ELISA**

| Nguồn gốc huyết thanh | Số mẫu xét nghiệm | Số mẫu dương tính | Tỷ lệ dương tính (%) |
|-----------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| Chợ                   | 63                | 57                | 90,48                |
| Trang trại            | 188               | 40                | 21,28                |
| 1                     | 19                | 0                 | 0                    |
| 2                     | 30                | 0                 | 0                    |
| 3                     | 37                | 14                | 37,84                |
| 4                     | 32                | 8                 | 25,00                |
| 5                     | 36                | 8                 | 22,22                |
| 6                     | 34                | 10                | 29,41                |
| Tổng                  | 251               | 97                | 38,65                |

Giá trị cut-off trong ELISA được xác định dựa vào công thức Mean + 3 SD. Trong đó mean là giá trị OD trung bình của 30 mẫu huyết thanh âm tính thu từ máu của gà con một ngày tuổi, SD là độ lệch chuẩn.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả sàng lọc các mẫu có chứa kháng thể kháng nhóm giun đũa bằng ELISA sử dụng kháng nguyên As-SWAP

Kháng nguyên thô có nguồn gốc từ giun đũa lợn trưởng thành As-SWAP được sử dụng trong phản ứng ELISA để xác định các mẫu huyết thanh có chứa kháng thể kháng giun tròn này (bao gồm *T. canis*, *T. cati*, *A. suum*, hoặc *A. galli*). Trong đó huyết thanh gà thu tại chợ và trang trại có tỷ lệ dương tính tương ứng là 90,48% và 21,28%. Trong số 6 trang trại lấy mẫu xét nghiệm, có 4 trang trại có gà mang kháng thể (Bảng 1).

Phản ứng chéo thường được quan sát giữa kháng thể kháng giun đũa chó mèo *Toxocara* spp. và giun đũa lợn *A. suum* với kháng nguyên của chúng (Romasanta & cs., 2003; Fan & cs., 2004). Đặc biệt, phản ứng chéo xảy ra mạnh giữa kháng nguyên có nguồn gốc giun đũa lợn As-SWAP, với kháng thể được kích thích sản sinh bởi giun đũa chó *T. canis*, giun đũa mèo *T. cati* và giun đũa gà *A. galli* (Nguyen & cs., 2017; Nguyen & cs., 2020). Chính vì vậy, để sàng lọc và lựa chọn các mẫu huyết thanh có mang kháng thể kháng nhóm giun tròn này, kháng nguyên As-SWAP được lựa chọn cho thí nghiệm đầu tiên.

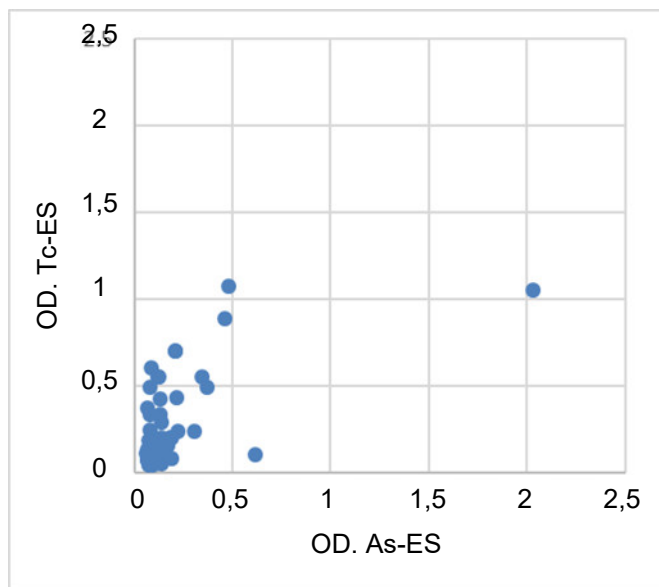
#### 3.2. Kết quả xác định loài gây nhiễm sử dụng kháng nguyên chất tiết

Sau khi sàng lọc các mẫu huyết thanh dương tính, quá trình xác định loài giun tròn gây nhiễm được thực hiện bằng kỹ thuật ELISA sử dụng hai kháng nguyên chất tiết Tci-ES có nguồn gốc từ giun đũa chó *T. canis* và Asm-ES có nguồn gốc từ giun đũa lợn *A. suum*. Kết quả

chỉ ra rằng phần lớn các mẫu huyết thanh có sự gắn yếu với cả hai loại kháng nguyên, mặc dù có một vài mẫu chỉ ra sự gắn rất mạnh. Dựa vào giá trị cut-off, có 30 mẫu huyết thanh nghi nhiễm *Toxocara* spp. và có 51 mẫu huyết thanh nghi nhiễm *A. suum*. Tuy nhiên, khi so sánh giá trị OD (optical density) của từng mẫu huyết thanh sử dụng kháng nguyên Tci-ES và Asm-ES, chỉ có 29 mẫu nghi nhiễm *Toxocara* spp. và 18 mẫu nghi nhiễm *A. suum* (Hình 2 và 3).

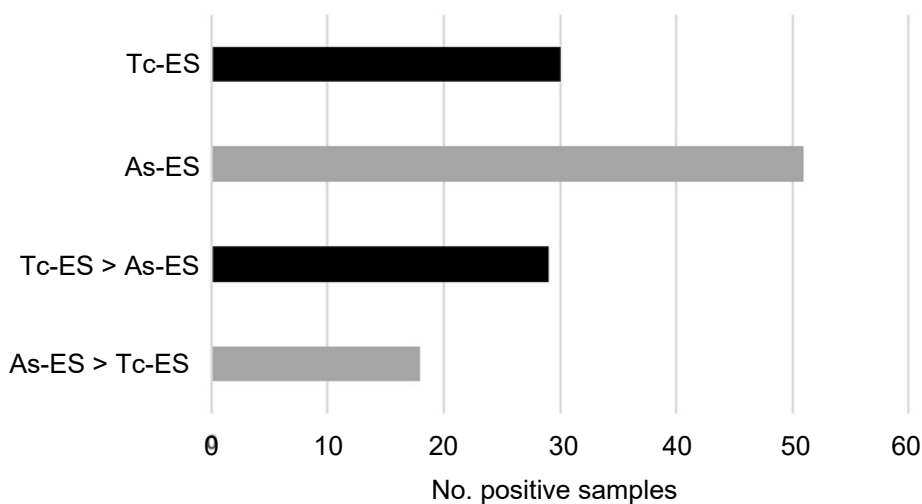
So với kháng nguyên thô được sản xuất từ giun trưởng thành thường cho phản ứng chéo, kháng nguyên chất tiết chỉ ra có sự đặc hiệu rất cao. Trong chẩn đoán toxocariasis trên người, kháng nguyên chất tiết có nguồn gốc từ giun đũa chó *T. canis* được ứng dụng rất rộng rãi. Đặc biệt kháng nguyên này đã được sử dụng để sản xuất kit thương mại chẩn đoán đối với toxocariasis ở người (Trần Thanh Dương & cs., 2014; Trần Trọng Dương & cs., 2014; Đỗ Trung Dũng & cs., 2016). Trong trường hợp chẩn đoán đối với giun đũa lợn *A. suum*, kháng nguyên sử dụng là kháng nguyên chất tiết thu từ môi trường nuôi ấu trùng giun đũa lợn đã qua quá trình di hành lên phổi của chó. Do đó, Asm-ES chỉ ra sự đặc hiệu cao hơn và tính kháng nguyên cũng cao hơn so với kháng nguyên thu từ chất tiết của ấu trùng được nở từ trứng (Nguyen & cs., 2017) và kháng nguyên này được sử dụng trong chẩn đoán nhiễm *A. suum* trên người (Yoshida & cs., 2016a; Yoshida & cs., 2016b). Vì vậy, để phân biệt các mẫu nghi nhiễm với *Toxocara* spp. và *A. suum*, hai kháng nguyên này được sử dụng.

Sau khi so sánh giá trị OD của mỗi mẫu sử dụng đồng thời hai loại kháng nguyên chất tiết Tci-ES và Asm-ES, số lượng mẫu nghi nhiễm giảm xuống. Cụ thể chỉ còn 29/30 mẫu nghi nhiễm *Toxocara* spp. và 18/51 mẫu nghi nhiễm *A. suum*. Điều này có thể được giải thích là 1 mẫu nghi nhiễm *Toxocara* spp. có giá trị OD cao hơn khi gắn với kháng nguyên Asm-ES và chuyển sang nhóm nghi nhiễm *A. suum*. 33 mẫu nghi nhiễm *A. suum*, mặc dù có giá trị OD thấp hơn khi sử dụng kháng nguyên Asm-ES, có thể nghi nhiễm *A. galli* - một loại giun đũa ký sinh phổ biến trên gà.



Ghi chú: 97 mẫu huyết thanh được lựa chọn để gắn với kháng nguyên Tci-ES và Asm-ES. Trục tung chỉ ra sự gắn của huyết thanh với kháng nguyên Tci-ES; trục hoành chỉ ra sự gắn của huyết thanh với kháng nguyên Asm-ES. Đường ---- chỉ ra giá trị cut-off.

**Hình 2. Sự gắn của huyết thanh với kháng nguyên chất tiết**



**Hình 3. Số lượng các mẫu huyết thanh dương tính khi gắn với từng loại kháng nguyên ci-ES và Asm-ES và khi so sánh giá trị OD của mỗi mẫu sử dụng hai loại kháng nguyên này**

### 3.3. Xác nhận các mẫu nhiễm *Toxocara* spp. bằng *Toxocara* WB Kit

Có 29 mẫu nghi nhiễm *Toxocara* spp. được xác nhận bằng *Toxocara* WB kit cho thấy, có 27 mẫu cho kết quả dương tính với WB kit, tức trên mỗi stripe xuất hiện 2 band nằm trong khoảng

25-34kDa. Kết quả từ nghiên cứu trước chỉ ra rằng, sự xuất hiện của ít nhất 2 band nằm trong khoảng 25-24kDa khi thực hiện bằng kit chẩn đoán này là sự khẳng định mẫu nhiễm *Toxocara* spp. (Magnaval & cs., 1991). Điều này chứng tỏ độ nhạy của kit không đạt được 100% khi được chúng tôi tiến hành. Kết quả này cũng tương

đồng với kết quả của Yoshida khi xác nhận *Toxocara* spp. gây nhiễm trên người (Yoshida & cs., 2016b). Ngoài ra, chúng tôi cũng kiểm tra một mẫu huyết thanh cho giá trị OD cao hơn khi gắn với kháng nguyên Asm-ES và không có band nào xuất hiện trong vùng 25-34kDa.

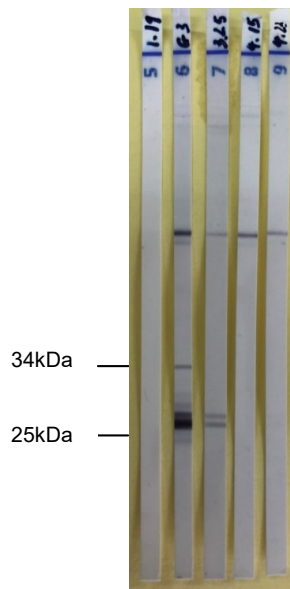
Kit chẩn đoán này được ứng dụng trong chẩn đoán toxocarosis ở người và chỉ ra độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao (Yoshida & cs., 2016b). Đồng thời đây cũng là một trong các bước xác nhận kết quả chẩn đoán bằng ELISA trong quy trình chẩn đoán *Toxocara* spp. ở gà (Nguyen & cs., 2020).

### 3.4. Xác nhận các mẫu nhiễm *A. suum* bằng kỹ thuật ELISA tiền hấp phụ với kháng nguyên Ag-SWAP

*A. galli* là giun tròn ký sinh phổ biến trên gà, thuộc bộ giun đũa Ascaridida, nên gọi là giun đũa gà (Bowman, 2009). Tỷ lệ nhiễm giun đũa gà được báo cáo là 50% (Nguyễn Hồ Bảo Trân & cs., 2015) và khoảng 15,3% trong nghiên cứu của chúng tôi (số liệu chưa công bố). Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng giun đũa lợn *A. suum* và giun đũa gà *A. galli* có sự tương đồng kháng nguyên rất cao (Nguyen & cs., 2017; Nguyen &

cs., 2020). Vì vậy, để loại bỏ các trường hợp dương tính giả với *A. suum*, các mẫu huyết thanh nghi nhiễm giun đũa lợn sẽ được tiền hấp phụ với kháng nguyên Ag-SWAP để loại bỏ sự gắn không đặc hiệu trước khi tiến hành ELISA. Sau đó mỗi mẫu này được gắn lần lượt với kháng nguyên Tci-ES và Asm-ES để so sánh giá trị OD. Các mẫu có giá trị OD cao hơn khi gắn với kháng nguyên Asm-ES là các mẫu nhiễm *A. suum*. Kết quả chỉ ra rằng: có 7/51 mẫu dương tính với *A. suum*. Không giống trong trường hợp gà nhiễm *Toxocara* spp., khi bị nhiễm giun đũa lợn *A. suum*, kháng thể đạt cao nhất sau 2 tuần và giảm mạnh sau 4 tuần nếu gà không bị tái nhiễm (Nguyen & cs., 2017). Vì vậy, sự xác định kháng thể kháng giun đũa lợn trong nghiên cứu này cho thấy gà mới bị nhiễm.

Như vậy, trong tổng số 251 mẫu huyết thanh được xét nghiệm trong nghiên cứu này có 29 mẫu nhiễm *Toxocara* spp., chiếm tỷ lệ 11,55%; và 7 mẫu nhiễm *A. suum*, chiếm tỷ lệ 2,79%. Đối chiếu với các thông tin mà chúng tôi thu thập khi lấy mẫu thì những gà có mang kháng thể kháng nhóm giun tròn này đều được nuôi tại các hộ gia đình có nuôi thêm cả chó, mèo hoặc chuồng gà được làm trên nền chuồng lợn cũ.



Ghi chú: Stripe 5. - mẫu huyết thanh âm tính; stripe 6. - mẫu dương tính; stripe 7. và stripe 9. - mẫu huyết thanh có giá trị OD cao hơn khi gắn với kháng nguyên Tci-ES; stripe 8. - mẫu huyết thanh có giá trị OD cao hơn khi gắn với kháng nguyên Asm-ES.

Hình 4. Sự xác nhận *Toxocara* spp. bằng *Toxocara* WB kit



#### 4. KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định sự có mặt của kháng thể kháng nhóm giun đũa chó mèo *Toxocara* spp. và giun đũa lợn *A. suum* trên gà nhiễm bệnh tự nhiên – vật chủ dự trữ của chúng. Mặc dù quy mô còn nhỏ, nhưng kết quả nghiên cứu đã gián tiếp chỉ ra được dấu hiệu về sự ô nhiễm của đất đối với trứng của giun đũa chó mèo *Toxocara* spp. và giun đũa lợn *A. suum*. Để có thể khẳng định chắc chắn về sự ô nhiễm của đất đối với trứng của nhóm giun tròn này, chúng tôi sẽ tiếp tục thu thập mẫu đất ở vùng chăn nuôi gà thả vườn để xác định sự có mặt của trứng giun tròn này trong đất. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu đã cung cấp thông tin quan trọng giúp người chăn nuôi cần trang bị thiết bị bảo hộ cần thiết khi tiếp xúc với đất. Đồng thời, cần có các biện pháp để quản lý nguồn phân của chó, mèo và lợn. Bên cạnh đó, nghiên cứu đưa ra dấu hiệu về sự tiềm ẩn nguy cơ nhiễm giun đũa lợn *A. suum* trên người, tác nhân gây Hội chứng ấu trùng di chuyển trên người chưa được công bố tại Việt Nam.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin gửi lời cảm ơn đến Dự án Việt - Bỉ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí để hoàn thành nghiên cứu này. Đồng thời tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Prof. Ayako Yoshida, phòng thí nghiệm Ký sinh trùng, Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Miyazaki, Nhật Bản đã cung cấp kháng nguyên để thực hiện nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Azizi S., Oryan A., Sadjjadi S.M. & Zibaei M. (2007). Histopathologic changes and larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected chickens. *Parasitol. Res.* 102: 47-52.

Bowman D.D. (2009). *Goergis' Parasitology for Veterinarians*, 9<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Elsevier, St Louis, MO: 451

Campos-da-Silva D.R., da Paz J.S., Fortunato V.R., Beltrame M.A., Valli L.C. & Pereira F.E. (2015). Natural infection of free-range chickens with the ascarid nematode *Toxocara* sp., *Parasitol. Res.* 114(11): 4289-4293.

Đỗ Trung Dũng, Trần Thanh Dương, Nguyễn Thị Hợp, Hoàng Quang Vinh, Đỗ Thị Thu Thủy & 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.

Fan C.K. & Su K.E. (2004). Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis* and *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol. Int.* 53(3): 263-271.

Ito K., Sakai K., Okajima T., Quchi K., Funakoshi A., Nishimura J., Ibayashi H. & Tsuji M. (1986). Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chicken or cow liver. *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* 75: 759-766.

Magnaval J.F., Glickman L.T., Dorchie P. & Morassin B. (2001). Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39(1): 1-11.

Magnaval J.F., Fabre R., Maurieres P., Charlet J.P. & De Larrard B. (1991). Application of the western-blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Res.* 77: 697-702.

Nagakura K., Tachibana H., Kaneda Y. & Kato Y. (1989). Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J. Infect. Dis.* 160: 735-736

Nguyen T. H.Y., Maruyama H., Yoshida A. & Nonaka N. (2017). IgG antibody development in chicken infected with *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Ascaris suum* and *Ascaridia galli* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Malaria and Parasitic Disease Control.* 6 (102): 9-15.

Nguyen Y.T.H., Hayata Y., Sonoda S., Nonaka N., Maruyama H. & Yoshida A. (2020). Establishment of a serodiagnosis system for the detection of *Toxocara* spp. and *Ascaris suum* infection in chickens. *Parasitol. Intern.* 75.

Nguyễn Hồ Bảo Trân, Trần Ngọc Bích & Nguyễn Phúc Khánh (2015). Tình hình nhiễm giun sán ký sinh trên đường tiêu hóa và một số chỉ tiêu sinh lý máu trên gà nuôi nhốt tại quận Bình Thủy, Thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ.* 37(1): 6-10.

Okoshi S. & Usui M. (1968). Experimental Studies on *Toxascaris Leonina*. VI. Experimental Infection of Mice, Chickens and Earthworms with *Toxascaris leonina*, *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. *Jap. J. Vet. Med. Sci.* 30: 151-166.

Oryan A., Sadjjadi S.M. & Azizi S. (2010). Longevity of *Toxocara cati* larvae and pathology in tissues of experimentally infected chickens. *Korean J. Parasitol.* 48(1): 79-80.

Romasanta A., Romero J. L., Arias M., Sanchez-Andrade R., Lopez C., Suarez J.L., Diaz P., Diez-

- Banos P., Morrono P. & Paz-Silva A. (2003). Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays-analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*, Immunol. Investig. 32(3): 131-142.
- Taira K., Permin A., & Kapel C.M.O. (2003). Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. Parasitology Research. 90: 521-523.
- Trần Thanh Dương, Nguyễn Thu Hương & Nguyễn Thị Hồng Liên (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, ngày 03-04/04/2014, Hải Phòng. tr. 3-10.
- 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 Y học. Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương. tr. 54
- Von Söhsten A.L., Silva A.V., Rubinsky-Elefant G., Macedo L.M.S. & Guerra M. (2017). Anti-*Toxocara* spp. IgY antibodies in poultry sold in street markets from Feira de Santana, Bahia, Northeastern Brazil. Vet. Parasitol: Reg Stud Rep. 8: 86-89.
- Yoshida A., Kikuchi T., Nakagaki S. & Maruyama H. (2016a). Optimal ELISA antigen for the diagnosis of *Ascaris suum* infection in humans. Parasitol. Res. 115(12): 4701-4705.
- Yoshida A., Hombu B., Wang Z. & Maruyama H. (2016b). Larva migrans syndrome caused by *Toxocara* and *Ascaris* roundworm infections in Japanese patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 35: 1521-1529
- Yoshihara S., Hattori J., Nishizono K., Kawamura A., Shimozaki K., Nishida Y. & Hirayama N. (2008). Hepatic lesions caused by migrating larvae of *Ascaris suum* in chickens. J. Vet. Med. Sci. 70: 1129-1131.