

## SO SÁNH HAI PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM CỦA SUỐI TÌM ẤU TRÙNG SÁN LÁ PHỔI

Lưu Anh Tú<sup>1,2</sup>, Hoàng Văn Hiền<sup>3</sup>, Bùi Khánh Linh<sup>4</sup>, Phạm Ngọc Doanh<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Bệnh viện phổi Trung ương

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Các loài sán lá thuộc giống *Paragonimus* gây bệnh sán lá phổi ở người và động vật. Nguyên nhân nhiễm bệnh là do ăn phải cua suối bị nhiễm ấu trùng sán lá phổi ở giai đoạn cảm nhiễm - metacercaria. Vì vậy, xét nghiệm cua suối tìm ấu trùng sán lá phổi rất cần thiết cho nghiên cứu dịch tễ học bệnh sán lá phổi. Cho đến nay, 2 phương pháp xét nghiệm cua suối được sử dụng phổ biến là ép cua giữa hai tấm kính (Nguyễn Thị Lê và cs., 1997; Phạm Ngọc Doanh và cs., 2002; Cheng et al., 2010; Sugiyama et al., 2012) và giã-lọc cua (Habe et al., 1993; Iwagami et al., 2003; Sohn et al., 2009; Cheng et al., 2010). Tuy nhiên chưa có tác giả nào mô tả kỹ phương pháp giã-lọc cua cần lọc bao nhiêu lần, thời gian để lắng giữa các lần lọc là bao nhiêu phút, cũng như chưa có nghiên cứu so sánh phương pháp nào để thực hiện hơn. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu các vấn đề này.

### I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

Cua suối *Indochinamon tannanti* bắt tại xã An Lạc, huyện Lục Yên, tỉnh Yên Bái và *Vietopotamon aluoiense* bắt tại xã Hương Sơn, huyện Hương Hóa, tỉnh Quảng Trị, là 2 địa điểm bị nhiễm sán lá phổi *P. heterotremus* và *P. westermani* với tỷ lệ nhiễm cao (Doanh et al., 2013). Cua suối *Indochinamon tannanti* bắt tại xã Yên Quang, huyện Lương Sơn, tỉnh Hòa Bình - vùng không bị nhiễm ấu trùng sán lá phổi (Phạm Ngọc Doanh và cs, 2002).

#### 2. Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp giã-lọc cua:** Để xác định số lần gạn lọc và thời gian lắng cặn giữa các lần lọc, dùng chày cối giã một cá thể cua suối có kích thước trung bình (chiều ngang mai cua 30 mm) bắt ở xã Yên Quang, huyện Lương Sơn, tỉnh Hòa Bình - vùng không nhiễm sán lá phổi và cho vào 50 metacercaria của sán lá phổi *P. westermani* thu từ cua suối bắt tại Quảng Trị. Cho vào 250 ml nước, khuấy đều và lọc qua lưới lọc kích thước 1 x 1 mm vào cốc nhựa thể tích 300 ml. Tiến hành gạn-lọc đến khi phần cặn trong cốc thể xem dưới kính hiển vi soi nổi. Thử nghiệm thời gian lắng cặn giữa các lần lọc là: 3 phút, 2 phút và 1 phút bằng cách dùng đồng hồ bấm giờ. Từ dịch lọc ban đầu, để lắng cặn trong thời gian thử nghiệm 3 phút, gạn ½ phần nước trong ở phía trên sang một cốc khác (giữ lại để kiểm tra), cho thêm nước vào phần cặn đến đầy cốc, để lắng và lặp lại quy trình gạn-lọc đến khi dung dịch trong. Dem phần cặn ở lần cuối cùng kiểm tra dưới kính hiển vi soi nổi tìm ấu trùng sán lá phổi. Nếu đếm đủ 50 metacercaria thì thực hiện thí nghiệm với thời gian gạn lọc ngắn hơn (2 phút, 1 phút). Nếu đếm không đủ 50 metacercaria thì kiểm tra phần nước lọc của tất cả các bước trước đó. Từ đó xác định thời gian lắng cặn thích hợp nhất là thời gian ngắn nhất mà vẫn thu lại đủ 50 metacercaria ở phần cặn của lần lọc cuối cùng. Thí nghiệm với mỗi thời gian lắng cặn lặp lại 3 lần. Làm tương tự như vậy với metacercaria của loài *P. heterotremus*.

*Phương pháp ép cua giữa 2 tấm kính:* Loại bỏ mai cứng, dùng panh gấp riêng phần mang và gạch cua ép giữa 2 tấm kính để kiểm tra dưới kính hiển vi. Đối với phần thân và chân, dùng kéo và dao để nạo phần cơ rồi ép giữa 2 tấm kính, quan sát dưới kính hiển vi tìm ấu trùng sán lá phổi. Đếm số lượng metacercaria ở từng bộ phận cơ thể cua.

*So sánh 2 phương pháp ép cua và giã-lọc cua:*

So sánh 2 phương pháp xét nghiệm cua về thời gian xét nghiệm và số nang sán thu được từ 10 cá thể cua suối bắt tại Yên Bái - nơi có tỷ lệ nhiễm *P. heterotremus* cao.

Xét nghiệm từng bộ phận (mang, gạch cua, cơ thân và cơ chân) của từng cá thể cua bằng phương pháp ép giữa 2 tấm kính trước. Đếm số lượng metacercaria ở từng bộ phận. Sau đó chuyển sang giã-lọc cua theo quy trình mô tả như trên với số lần lọc và thời gian để lắng thích hợp nhất đã được xác định. Đếm số lượng metacercaria ở từng bộ phận cơ thể cua. So sánh thời gian xét nghiệm và số lượng metacercaria thu được từ 2 phương pháp trên.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Xác định thời gian lắng cặn và số lần lọc của phương pháp giã-lọc cua.

Kết quả thí nghiệm xác định thời gian lắng cặn giữa các lần lọc được trình bày ở bảng 1. Sau 8 lần lọc thì dung dịch lọc đã trong có thể quan sát dưới kính hiển vi soi nổi để tìm ấu trùng sán lá phổi. Đối với metacercaria của loài *P. westermanni*, nếu thời gian lắng cặn là 3 và 2 phút đều thu đủ 50 metacercaria ở lần lọc cuối cùng. Với thời gian lắng cặn 1 phút chỉ có một lần thí nghiệm thu được 50 metacercaria ở lần lọc cuối cùng, ở 2 đợt thí nghiệm lặp lại chỉ thu được 48 và 49 metacercaria, 1 - 2 metacercaria thu được ở nước lọc của các lần lọc trước (Bảng 1).

Đối với metacercaria của loài *P. heterotremus*, thời gian lắng cặn 3 phút cũng thu đủ 50 metacercaria ở lần lọc cuối cùng. Nhưng với thời gian lắng cặn 2 phút chỉ thu được 46-47 metacercaria ở lần lọc cuối cùng, 3-4 metacercaria thu được ở nước lọc các lần lọc thứ 1-7.

Bảng 1

**Metacercaria thu được với thời gian lắng cặn khác nhau**

Metacercaria	Lần lọc	Số lượng metacercaria thu được ở thời gian lắng cặn		
		3 phút	2 phút	1 phút
<i>P. westermanni</i>	1 đến 7	0	0	0 - 2 (1,0)
	Cuối cùng	50	50	48-50 (49,0)
	Tổng số	50	50	50
<i>P. heterotremus</i>	1 đến 7	0	3 - 4 (3,3)	
	Cuối cùng	50	46-47 (46,7)	
	Tổng số	50	50	

**Ghi chú:** số trong ngoặc đơn là giá trị trung bình.

Phương pháp giã-lọc cua đã và đang được sử dụng phổ biến để thu metacercaria sán lá phổi ở nhiều nước, như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Thái Lan, Malaysia và Việt Nam (Habe et al., 1993; Iwagami et al., 2003; Sohn et al., 2009; Cheng et al., 2010). Nguyên tắc của phương pháp này là giã cua để tách metacercaria khỏi phần cơ (thịt) và các nội quan của cua, sau đó dùng nước để lọc qua lưới lọc có kích thước 1 x 1mm (vì metacercaria sán lá phổi lớn nhất có đường kính khoảng 0,8 mm; Kong et al. 2015) để loại bỏ bớt phần cặn có kích thước lớn. Sau đó gạn-lọc để loại bỏ những cặn có tỷ trọng nhỏ hơn metacercaria còn lơ lửng ở trên khi metacercaria đã lắng xuống đáy. Vì vậy, nếu thời gian để lắng quá lâu thì các cặn nhỏ cũng lắng xuống, do đó khó lọc được đến khi dung dịch trong để có thể quan sát dưới kính hiển vi thu ấu trùng. Ngược lại, nếu thời gian để lắng quá ngắn thì metacercaria vẫn còn lơ lửng ở trên sẽ bị

mất đi khi gạn lọc. Vì vậy, xác định thời gian lắng cặn thích hợp để thu được metacercaria nhanh và chính xác nhất là rất cần thiết trong nghiên cứu dịch tễ sán lá phổi. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có tác giả nào thử nghiệm để tìm ra thời gian để lắng giữa các lần lọc bao nhiêu phút là thích hợp nhất. Khi trình bày phương pháp nghiên cứu trong các công bố trước đây, các tác giả chỉ mô tả để lắng trong vài phút, duy nhất Sohn et al. (2009) ghi rõ để lắng trong 15 phút. Tuy nhiên, áp dụng thời gian này chúng tôi thấy quá lâu, khó lọc được đến dịch trong. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy bằng phương pháp giã-lọc cua với cá thể cua có kích thước trung bình (chiều ngang mai cua 30mm) thì lọc khoảng 8 lần có thể xem dưới kính. Về thời gian để lắng giữa các lần lọc, đối với metacercaria của loài *P. westermani* là 2 phút, và *P. heterotremus* là 3 phút thì metacercaria sẽ lắng hết xuống đáy. Điều này được lý giải là kích thước metacercaria của *P. westermani* (khoảng 400  $\mu\text{m}$ ) lớn hơn so với *P. heterotremus* ( $\leq 300 \mu\text{m}$ ) (Kong et al., 2015), vì vậy thời gian lắng xuống nhanh hơn. Metacercaria của loài *P. heterotremus* là nhỏ nhất so với các loài sán lá phổi khác (Doanh et al., 2015), vì vậy trong phương pháp giã-lọc cua thì thời gian lắng giữa các lần lọc 3 phút là thích hợp nhất để thu được metacercaria của tất cả các loài sán lá phổi.

## 2. So sánh hai phương pháp xét nghiệm cua

### *Thời gian xét nghiệm bằng phương pháp ép cua và giã-lọc cua.*

Để so sánh thời gian xét nghiệm bằng 2 phương pháp, cùng một người tiến hành xét nghiệm 3 cá thể cua bị nhiễm ấu trùng sán lá phổi. Thực hiện phương pháp ép cua trước, sau đó chuyển sang phương pháp giã-lọc cua với thời gian lắng cặn 3 phút. Kết quả cho thấy thời gian xét nghiệm một cá thể cua bằng phương pháp ép giữa hai tấm kính hết 76-85 phút (trung bình 80,3 phút), trong khi đó phương pháp giã-lọc cua mất 33-38 phút (trung bình 35,3 phút) (bảng 2). Như vậy, xét nghiệm cua bằng phương pháp giã-lọc cua nhanh hơn so với phương pháp ép cua. Hơn nữa, khi xét nghiệm bằng phương pháp giã-lọc cua thì dễ thu metacercaria hơn, vì chúng đã được tách khỏi thịt cua, có thể hút bằng pipet, còn với phương pháp ép cua thì khó thu metacercaria vì chúng vẫn còn lẫn trong thịt cua.

Bảng 2

**So sánh thời gian xét nghiệm bằng phương pháp ép và giã-lọc cua**

Cá thể cua thứ	Thời gian xét nghiệm (phút) bằng phương pháp	
	Ép cua	Giã-lọc cua
1	80	35
2	85	38
3	76	33
<b>Trung bình</b>	<b>80,3</b>	<b>35,3</b>

### *So sánh số lượng metacercaria thu được của 2 phương pháp ép cua và giã-lọc cua*

Kết quả so sánh 2 phương pháp xét nghiệm 10 con cua bắt tại xã An Lạc, huyện Lục Yên, tỉnh Yên Bái được trình bày ở bảng 3. Kết quả cho thấy metacercaria thu được từ phương pháp giã-lọc cua (902 metacercaria) cao hơn nhiều so với phương pháp ép cua (252 metacercaria), số lượng metacercaria thu được ở phương pháp ép cua chỉ tương đương với 28,0% của phương pháp giã-lọc cua.

Tính riêng từng bộ phận cơ thể cua thì thấy phương pháp ép cua thu được số lượng metacercaria ở cơ thân, cơ chân và gạch thấp hơn so với phương pháp giã-lọc cua, ngược lại số lượng metacercaria ở mang thì thu được nhiều hơn. Vì khi ép mang cua giữa 2 tấm kính có thể quan sát được toàn bộ metacercaria, không bị sót, ngược lại khi giã mang cua thì một số

metacercaria dính ở giữa mang sẽ bị mất đi khi lọc. Trái lại, các bộ phận cơ thì khó tách hết phần thịt ra khỏi thân và chân, nên bị sót nhiều đặc biệt là phần cơ chân. Phần gạch cua khó dàn mỏng trên tấm kính để quan sát hết metacercaria. Do đó ở phương pháp ép cua thu được ít metacercaria hơn so với phương pháp giã-lọc cua. Vì vậy, để thu được số lượng metacercaria chính xác nhất thì ép mang của giữa 2 tấm kính, còn phần cơ và gạch cua thì áp dụng phương pháp giã-lọc cua.

Bảng 3

So sánh số lượng metacercaria thu được từ 2 phương pháp xét nghiệm cua

Các bộ phận cơ thể cua	Metacercariae thu được theo hai phương pháp				
	Ép cua		Giã-lọc cua		Tỷ lệ ép/giã-lọc (%)
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Mang	97	38,5	84	9,3	115,5
Gạch	52	20,6	82	9,1	63,4
Cơ thân	64	25,4	358	39,7	17,9
Cơ chân	39	15,5	378	41,9	10,3
<b>Tổng số</b>	<b>252</b>	<b>100,0</b>	<b>902</b>	<b>100,0</b>	<b>28,0</b>

Với phương pháp ép cua thì số lượng metacercaria thu được nhiều nhất ở mang (38,5%), sau đó đến cơ thân (25,4%), gạch (20,6%) và thấp nhất ở cơ chân (15,5%). Kết quả này cũng tương tự với công bố của Nguyễn Thị Lê và cs (1997). Ngược lại, với phương pháp giã-lọc cua thì số lượng metacercaria thu được nhiều nhất ở cơ chân (41,9%) và cơ thân (39,7%), ở mang (9,3%) và gạch cua (9,1%) thấp hơn. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Habe et al. (1993) về phân bố metacercaria sán lá phổi ở cơ thể cua thu tại Malaysia. Các tác giả thu được metacercaria nhiều nhất ở phần cơ, sau đó đến mang và gạch cua. Tại Việt Nam, Hứa Văn Thuộc và cs. (2007) phân tích số lượng metacercaria ở cua suối thu tại Lương Sơn, tỉnh Lào Cai cũng thu được nhiều nhất ở cơ chân (41,08%), tiếp đến cơ thân (35,34%), và nội tạng (23,57%). Tác giả không trình bày xét nghiệm cua theo phương pháp nào, nhưng kết quả này cho thấy có thể tác giả đã sử dụng phương pháp giã-lọc cua. Tóm lại, phương pháp giã-lọc cua thu được số lượng metacercaria nhiều hơn và chính xác hơn, phương pháp này cũng đơn giản, dễ thực hiện và nhanh hơn so với phương pháp ép cua.

### III. KẾT LUẬN

Với phương pháp giã-lọc cua, thời gian để lắng giữa các lần lọc 3 phút là thích hợp nhất để thu được metacercaria sán lá phổi nhanh và chính xác nhất.

Phương pháp giã-lọc có nhiều ưu điểm hơn so với phương pháp ép cua tìm ấu trùng sán lá phổi: dễ thu metacercaria hơn, thời gian xét nghiệm nhanh hơn và chính xác hơn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Cheng Y. Z., Li L. S., Lin G. H., Zhou P. C., Jiang D. W., Fang Y. Y., Lin C. X., Li Y. R.,** 2010. Survey on the foci of *Paragonimus* in Youxi, Yongtai and Pinghe Counties of Fujian Province. Chinese Journal of parasitology & parasitic diseases, 28(6):406-10.
2. **Phạm Ngọc Doanh, Nguyễn Thị Lê, Đặng Tất Thế,** 2002. Phân bố của loài sán lá phổi *Paragonimus heterotremus* và vật chủ trung gian của nó tại vùng núi Tây Bắc. Tạp chí sinh học, 24(1):14-22.
3. **Doanh P. N., Thaenkham U., AnP. T., Hien H. V., Horii Y., Nawa Y.,** 2015. Metacercarial polymorphism and genetic variation of *Paragonimus heterotremus*

- (Digenea: Paragonimidae), and a re-appraisal of the taxonomic status of *Paragonimus pseudoheterotremus*. *Journal of Helminthology*, 89(2):182-188.
4. **Nguyễn Thị Lê, Đặng Tất Thế, Phạm Ngọc Doanh**, 1997. Tình hình nhiễm metacercariae của sán lá phổi (giống *Paragonimus*, 1899) ở cua suối thuộc huyện Sìn Hồ - Lai Châu. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 213(2):35-40.
  5. **Habe S., Lai K. P. F., Agatsuma T., Yang O. C. K., Kawashima K.**, 1993. Crab hosts for *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) in Malaysia. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21(3):137-142.
  6. **Iwagami M., Rajapakse R. P. V. J., Paranagama W., Agatsuma T.**, 2003. Identities of two *Paragonimus* species from Sri Lanka inferred from molecular sequences. *Journal of Helminthology* 77:239-245.
  7. **Kong Y., Doanh P. N., Nawa Y.**, 2015. *Paragonimus*. In Xiao L, Ryan U and Feng Y, eds. *Biology of Foodborne Parasites*. CRC Press, pp.445-462.
  8. **Sohn W. M., Ryu J. S., Min D. Y., Song H. O., Rim H. J., Vonghachack Y., Bouakhasith D., Banouvong V.**, 2009. Indochinamon ou (Crustacea: Potamidae) as a new second intermediate host for *Paragonimus harinasutai* in Luang Prabang Province, Lao PDR. *Korean Journal of Parasitology*, 47(1):25-29.
  9. **Sugiyama H., Shibata K., Morishima Y., Muto M., Yamasaki H., Kawakami Y.**, 2012. Current status of lung fluke metacercarial infection in freshwater crabs in the Kawane area of Shizuoka Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(3):249-53.
  10. **Hứa Văn Thuộc và cs.**, 2007. Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ, hình thái, sinh thái của ấu trùng sán lá phổi trong trung gian truyền bệnh (cua suối) tại một số tỉnh phía Bắc giáp Trung Quốc. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 11(2):136-142.

## COMPARISON OF TWO METHODS OF CRAB EXAMINATION FOR *PARAGONIMUS METACERCARIA*

**Luu Anh Tu, Hoang Van Hien,  
Bui Khanh Linh, Pham Ngoc Doanh**

### SUMMARY

Examination of freshwater crabs for *Paragonimus* metacercariae are essential for the study of the epidemiology of paragonimiasis. So far, two methods of crab examination (pressing between two glasses and grinding-filtering) are commonly used. However, there has been no detail description of grinding-filtering method, and there has been no report on the comparison of these two methods as well. The results of the present study indicated that in grinding-filtering method, the best interval time between two filtrations is 3 minutes to examine crabs fastest and to collect metacercariae accurately. The method of grinding-filtering has some advantages (easier, faster and more accurate) over the method of pressing crabs.