

## ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA *GNATHOSTOMA SPINIGERUM* Ở NGƯỜI

LÊ XUÂN TÚ

*Viện Công nghệ sinh học*

LÊ THỊ XUÂN

*Trường đại học Y - Dược, Tp. HCM*

TRẦN VINH HIỂN

*Trung tâm Bệnh nhiệt đới, Tp. HCM*

*Gnathostoma spinigerum* là một loại giun ký sinh ở chó mèo ở giai đoạn trưởng thành. Vòng đời của loại ký sinh trùng này trải qua 2 ký chủ trung gian ở dưới nước: Cyclops và cá, ếch.... Người bị nhiễm khi ăn cá, lươn, ếch mang mầm bệnh không được nấu chín. Ở người, ấu trùng chỉ phát triển đến giai đoạn giun non, không cố định ở một nơi mà thường xuyên di chuyển trong cơ thể. Biểu hiện của bệnh nhiễm *Gnathostoma spinigerum* rất phong phú và đa dạng, tùy thuộc vào nơi ký sinh trùng có mặt, thường gặp nhất là ở ngoài da, ngoài ra còn có thể gặp ở các cơ quan nội tạng khác, hệ thần kinh và mắt. Bệnh chỉ được xác định khi bắt được giun từ những nơi bị tổn thương khác nhau của cơ thể, nhưng điều này rất hiếm khi xảy ra.

Bệnh phổ biến ở Đông Nam Á, nhất là Thái Lan, Nhật Bản, Việt Nam.

Ở Việt Nam, trường hợp nhiễm đầu tiên ở người được phát hiện ở Sài Gòn năm 1963 trên một em bé trai [5], đến nay đã có 10 trường hợp được ghi nhận. Gần đây, trên thế giới đã có những công trình nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch của người đối với *Gnathostoma*, kết quả cho thấy có sự hiện diện của các kháng thể trong huyết thanh người bị nhiễm giun này. Có nhiều kỹ thuật huyết thanh học được nghiên cứu như là kết tủa, ngưng kết hồng cầu thụ động, miễn dịch enzym, phóng xạ ... Trong số đó, kỹ thuật miễn dịch enzym (ELISA) tỏ ra thích hợp

hơn trong chẩn đoán các bệnh ký sinh trùng thường quy tại các phòng xét nghiệm, do ít tốn sinh phẩm, hóa chất, thao tác đơn giản và có thể tự động hóa được. Ngoài ra, kỹ thuật này có thể phát hiện được kháng thể (AB-ELISA) và kháng nguyên lưu (AG-ELISA).

Với mục đích góp phần chẩn đoán bệnh nhiễm *Gnathostoma spinigerum* ở người, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật miễn dịch (ELISA) để phát hiện ra kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên *Gnathostoma*.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên được điều chế từ ấu trùng giai đoạn 3 của *G. spinigerum*, thu thập từ các loại thủy sản. Nồng độ protein trong dung dịch kháng nguyên được đo bằng phương pháp Lowry và cs. (1951), Bovin Serum Albumin (BSA) được dùng làm chuẩn.

#### 2. Các mẫu huyết thanh

- Đối chứng dương là mẫu gồm 6 huyết thanh trộn chung lại, được lấy từ 6 bệnh nhân đã được xác định nhiễm *G. spinigerum*, 5 người bị ấu trùng di chuyển dưới da và một người bị ấu trùng chui vào mắt.

- Đối chứng âm là mẫu gồm 20 mẫu huyết thanh trộn lẫn nhau, được lấy từ 20 người lớn

*Công trình được sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.*

khỏe mạnh, không có tiền sử bị ấu trùng di chuyển ngoài da, bạch cầu ái toan trong giới hạn bình thường, xét nghiệm phân, đờm, nước tiểu đều không tìm thấy ký sinh trùng trong thời điểm lấy máu.

- Các mẫu huyết thanh của những bệnh nhân bị nhiễm các ký sinh trùng khác được thu thập từ nhiều nguồn khác nhau và được chia làm 4 nhóm:

**Nhóm 1. Giun:** *Gnathostoma spinigerum* (8 trường hợp), *Ascaris lumbricoides* (7), giun móc (5), *Trichuris trichiura* (3), *Strongyloides stercoralis* (30), *Toxocara canis* (18), *Angiostrongylus cantonensis* (12).

**Nhóm 2. Sán dây:** *Toenia saginata* (5), *Cysticercus cellulosae* (Gạo lợn) (8).

**Nhóm 3. Sán lá:** *Fasciola* sp. (21), *Clonorchis sinensis* (2), *Paragonimus* sp. (15).

**Nhóm 4. Đơn bào:** *Entamoeba histolytica* (16), *Toxoplasma gondii* (9).

### 3. Phương pháp:

Kỹ thuật ELISA gián tiếp (Engvall và Perlmann, 1972) dùng phiến nhựa 96 giếng (Greiner, Đức).

Các thành phần tham gia phản ứng được pha loãng ở các nồng độ:

Kháng nguyên: 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml

Huyết thanh: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400 và 1/12800.

Cộng hợp: 1/500, 1/1000, 1/2000.

Các bước thực hiện phản ứng:

a. Phủ 100 µl kháng nguyên đã được pha loãng trong dung dịch đệm Carbonate, 0,1 M, pH = 9, 6 và ủ ở 37°C trong 1 giờ, sau đó để ở 4°C qua đêm.

b. Rửa các giếng 3 lần bằng dung dịch đệm PBS-0,005% Tween 20, 0,01 M, pH = 7,4 (PBS-Tween)

c. Cho 150 µl dung dịch BSA 1% vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

d. Rửa các giếng 3 lần bằng dung dịch đệm PBS-Tween

đ. Cho 100 µl huyết thanh đã pha loãng vào

mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

e. Rửa các giếng 5 lần bằng dung dịch đệm PBS-Tween.

f. Cho 100 µl cộng hợp đã pha loãng vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

g. Rửa các giếng 5 lần bằng dung dịch đệm PBS-Tween.

h. Cho 100 µl 3,3', 5,5'-tetrametyl-benzidin (TMB) vào mỗi giếng, để trong vòng 30 phút.

i. Cho 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M vào để ngưng phản ứng.

k. Kết quả được đọc bằng máy đọc ELISA tự động ở bước sóng 450 nm.

- Cộng hợp IgG thô kháng IgG người có gắn enzym peroxydase (Pasteur, Paris).

- Chất nền là TMB.

Kết quả được xem là dương tính khi có trị số OD bằng hoặc cao hơn trị số OD của trung bình cộng và độ lệch chuẩn của 20 mẫu huyết thanh được lấy từ người khỏe mạnh.

## II. KẾT QUẢ

Để tìm cách phát hiện tối ưu sự kết hợp của kháng nguyên, kháng thể và cộng hợp, các thành phần được thử nghiệm với nhiều độ pha loãng khác nhau. Kết quả cho thấy nồng độ tối ưu của kháng nguyên là 5 µg/ml, độ pha loãng tối ưu của cộng hợp và của kháng thể là 1/1000 và 1/400.

Với các nồng độ nêu trên, chúng tôi tiến hành thử nghiệm với 20 mẫu huyết thanh của người khỏe mạnh. Trung bình cộng ( $\bar{X}$ ) OD của 22 mẫu này là 0,288, và độ lệch chuẩn (SD) là 0,022. Ngưỡng phân biệt âm tính và dương tính được tính theo công thức:  $\bar{X} + SD = 0,398$ . Những mẫu có OD  $\geq 0,398$  được xem là dương tính.

Đối với 6 mẫu của những người bị nhiễm *G. spinigerum* thì kết quả ELISA cho thấy OD (0,531-1,177) đều cao hơn OD ngưỡng (0,398).

Kết quả của ELISA giữa kháng nguyên *G. spinigerum* và huyết thanh của những người bị nhiễm loài giun sán, đơn bào khác gồm 163 mẫu cho thấy có 10 mẫu có trị số OD bằng và cao hơn trị số ngưỡng, tỷ lệ 5,30%. Có 3 loài

giun sán cho dương tính giả, đó là *Paragonimus* sp. (4/15 mẫu) và *Fasciola* sp. *Angiostrongylus cantonensis* (5/12 mẫu) (1/33 mẫu).

Bảng 1

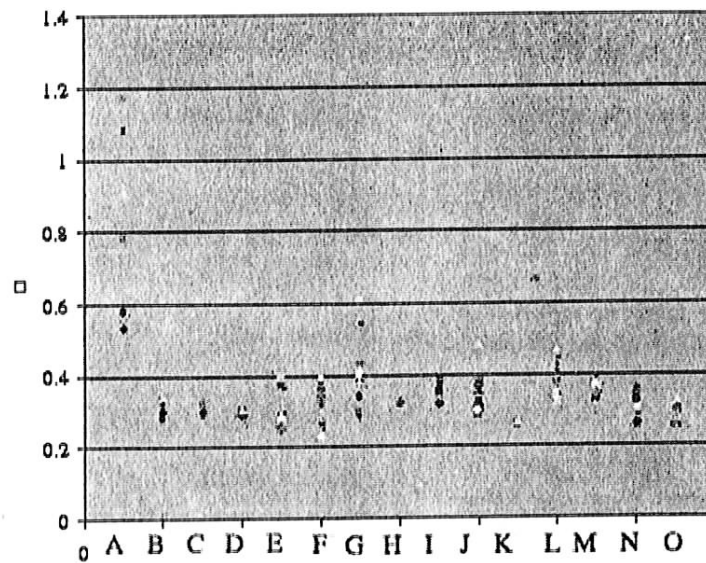
Tỷ lệ dương tính (OD ngưỡng = 0,398) của những mẫu huyết thanh người bị nhiễm *Gnathostoma spinigerum*, những người bị nhiễm các loại KST khác và người khỏe mạnh

Các loài bệnh nhiễm	Số mẫu	Dương tính OD = 0,398	% dương tính
<i>Gnathostoma spinigerum</i>	6	6	100
<i>Ascaris lumbricoides</i>	7	0	0
Giun móc	5	0	0
<i>Trichuris trichiura</i>	3	0	0
<i>Strongyloides stercoralis</i>	30	0	0
<i>Toxocara canis</i>	18	0	0
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12	5	41,5
<i>Toenia saginata</i>	5	0	0
<i>Cysticercus cellulosae</i>	8	0	0
<i>Fasciola</i> sp.	33	1	0
<i>Clonorchis sinensis</i>	2	0	0
<i>Paragonimus</i> sp.	15	4	26,6
<i>Entamoeba histolytica</i>	16	0	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	9	0	0
Người bình thường	20	0	0
Tổng cộng	189		

Bảng 2

Kết quả ELISA những mẫu huyết thanh cho phản ứng chéo với kháng nguyên *Gnathostoma spinigerum* (OD)

Các loài bệnh nhiễm	Số mẫu thử	Số mẫu có OD ≥ 0,398	DO	X ± SD
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12	5	0,398 - 0,614	0,500 ± 0,032
<i>Paragonimus</i> sp.	15	4	0,401 - 0,458	0,433 ± 0,017
<i>Fasciola</i> sp.	33	1	0,463	0,463



Hình 1. Kết quả của thử nghiệm ELISA với các huyết thanh người bị nhiễm *Gnathostoma spinigerum*, những người bị nhiễm các loại KST khác và người khỏe mạnh: A = *Gnathostoma spinigerum*, B = *Ascaris lumbricoides*, C = Giun móc, D = *Trichuris trichiura*, E = *Strongyloides stercoralis*, F = *Toxocara canis*, G = *Angiostrongylus cantonensis*, H = *Toenia saginata*, I = *Cysticercosis*, J = *Fasciola* sp., K = *Clonorchis sinensis*, L = *Paragonimus* sp., M = *Entamoeba histolytica*, N = *Toxoplasma gondii*, O = Người bình thường.

### III. BÀN LUẬN

Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu điều chế kháng nguyên và dùng kháng nguyên này để phát hiện kháng thể trong máu của người bị nhiễm *Gnathostoma*. *G. spinigerum* là loài thường gặp nhất ở người, mầm bệnh xâm nhập vào người ở dạng ấu trùng giai đoạn 3 và ở người, chúng không phát triển đến giai đoạn trưởng thành được. Chúng tôi dùng ấu trùng giai đoạn 3 để làm kháng nguyên, vì nghĩ rằng kháng nguyên được điều chế từ giun ở cùng giai đoạn phát triển với mầm bệnh ở trong cơ thể bệnh nhân cho kết quả tốt hơn.

Nồng độ protein trong dung dịch kháng nguyên tối ưu là 5 µg/ml. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Suntharasamai và cs. (1985).

Trị số trung bình cộng và độ lệch chuẩn của 20 mẫu huyết của những người khỏe mạnh  $\bar{X} + SD = 0,288 + 0,01$ . Ngưỡng để phân biệt âm tính và dương tính:  $\bar{X} \pm 5 SD = 0,288 \pm 0,110 = 0,398$ . Như vậy, kết quả được xem là dương tính khi có trị số OD  $\geq 0,398$ . Với ngưỡng này, cả 6

mẫu huyết thanh lấy từ bệnh nhân đã bắt được ấu trùng đều có trị số OD cao hơn, không có trường hợp âm tính giả.

Phản ứng chéo thường hay gặp trong một số bệnh nhiễm ký sinh trùng. Trong công trình của chúng tôi, dương tính giả được ghi nhận ở 3/13 loài KST được thử, đó là *Angiostrongylus cantonensis*, *Paragonimus* sp. và *Fasciola* sp. Ở hiệu giá kháng thể 1/400, tỷ lệ dương tính giả ở *A. cantonensis* của chúng tôi (41.5%) cao hơn của Suntharasamai và cs. (1985) (23%). Phản ứng chéo giữa *G. spinigerum* với *A. cantonensis* cũng được ghi nhận bởi Dhamkrong và cs. (1986), Maleewong và cs. (1988). Đối với *Paragonimus* thì tỷ lệ dương tính giả của chúng tôi là 26,6 %, của Suntharasamai và cs. (1985) là 40%; trong khi đó Anantaphruti (1989) thì *G. spinigerum* thì không chéo với *Paragonimus* sp. Chúng tôi có một trường hợp *Fasciola* chéo với *G. spinigerum* với tỷ lệ 3% (1/33). Kết quả của Anantaphruti (1989) cho thấy không có phản ứng chéo giữa *G. spinigerum* với *Fasciola*. Thử nghiệm của chúng tôi với *Clonorchis sinensis* (một loại sán lá nhỏ ở gan) cho thấy không có phản ứng chéo với *G. spinigerum*, nhưng kết quả

của hai tác giả Maleewong và cs. (1988) và Suntharasamai và cs. (1985) cho thấy tỷ lệ dương tính giả với *Opisthorchis* (một loại sán lá nhỏ khác ở gan) lại cao.

Chúng tôi nghĩ *Gnathostoma spinigerum* có thể chéo với *Angiostrongylus cantonensis*, *Paragonimus* và *Fasciola*, nhưng ở nước ta hiện tượng đa nhiễm có thể được đặt ra, vì đường lây nhiễm vào người của 3 loài KST này đều qua thực phẩm chưa chín. Số liệu của chúng tôi còn quá ít để có thể đưa ra kết luận lúc này. Công trình này cần được tiếp tục để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của thử nghiệm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anantaphruti MT., 1989: Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 20(2): 297-304.
2. Dhamkrong-AT A. et al., 1986: J. Clin. Microbiol., 23: 847.
3. Diaz Camacho SP. et al., 1998: Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(6): 908-15.
4. Kasemsuth R., Panut-Ampon P. and Sanghrun C., (1981): Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health., 12: 410.
5. Lê Văn Hoà và cs. 1965: Bull. Soc. Patol. Ext. 58: 236- 244.
6. Lowry O. H. et al. 1951: J. Biol. Chem., 193: 265.
7. Mellewong Moakote N. et al., 1988: Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 2, 201-205.
8. Nopparatana C. et al., 1988. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health., 19: 274.
9. Soesatyo M. H. N. E. et al., 1987: Trans. Roy. Trop. Med. Hyg., 81: 799.
10. Suntharasamai P. et al., 1985: Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health., 16: 219-224.
11. Tada J. et al., 1987: Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 18: 444.
12. Tapchalsri P. et al., 1991: Int. J. Parasitol., 21: 315-319.

## IMMUNODIAGNOSIS OF HUMAN GNATHOSTOMIASIS

LE XUAN TU, LE THI XUAN, TRAN VINH HIEN

### SUMMARY

A diagnostic method for human gnathostomiasis by ELISA was carried out. This study characterized the IgG antibodies from cases of gnathostomiasis by assaying the sera against the crude antigen (5 µg/ml) prepared from larvae of *Gnathostoma spinigerum*. The ELISA antibody titres were found to range from 1/400 to 1/ 12800. At the titre of 1:400 and above, positive results were observed in 100% of 6 parasitological confirmed and 20 samples from healthy adults which had a titre from 1/50 to 1/200. The IgG antibodies from heterologous serum samples elicited a number of false positives (10/189) from three helminthic infections ie angiostrongyliasis, paragonimiasis and fascioliasis. The results in the present study seem to be promising for the routine diagnosis of gnathostomiasis. The cross-reaction with other parasitic infections and the evaluation of the sensitivity and the specificity by this method are in progress.

Ngày nhận bài: 11-01-2002