

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8400-27:2014**

Xuất bản lần 1

**BỆNH ĐỘNG VẬT – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –  
PHẦN 27: BỆNH SÁN LÁ GAN**

*Animal diseases - Diagnostic procedure –*

*Part 27: Fasciolosis*

HÀ NỘI – 2014

**Lời nói đầu**

TCVN 8400-27:2014 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương - Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 27: Bệnh sán lá gan

*Animal diseases - Diagnostic procedure - Part 27: Fasciolosis*

**CẢNH BÁO** – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình chẩn đoán bệnh sán lá gan trên gia súc.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

#### 2.1 Bệnh sán lá gan (Fasciolosis)

Bệnh sán lá gan là một bệnh lây giữa người và động vật, do hai loài *Fasciola hepatica* và *Fasciola gigantica* gây ra. Các sán này thường ký sinh ở ống dẫn mật, có khi ở cả phổi, tim, hạch lâm ba, tuyến tụy của gia súc, thậm chí trên cả người. Bệnh lây lan qua loài ký chủ trung gian là ốc nước ngọt như *Limnaea auricularia*, *L. swinhoci*...

**CHÚ THÍCH:** bệnh thường thấy ở thể mạn tính trên gia súc và vật nuôi, tuy nhiên gần đây bệnh nổi lên như một bệnh lý quan trọng ở người, ảnh hưởng sức khỏe cộng đồng.

**2.2 ELISA (Enzymed Linked Immunosorbent Assay):** phép thử miễn dịch liên kết enzyme.

**2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction):** phản ứng chuỗi polymeraza.

**2.4 TAE (tris acetate EDTA):** dung dịch đệm axetat.

2.5 PBS (phosphate buffered saline): dung dịch đệm phosphat.

2.6 OD (optical density): mật độ quang học.

### 3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử có cấp độ tinh khiết phân tích được công nhận và nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

3.1 Dung dịch kẽm - muối (xem điều A.2 phụ lục A)

3.2 Cặp môi dùng để phát hiện sản lá gan (xem bảng 1)

### 4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm sinh học và cụ thể như sau:

4.1 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 80 °C.

4.2 Tủ lạnh, có thể duy trì nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

4.3 Kính hiển vi quang học, có độ phóng đại 40 lần, 100 lần, 400 lần.

4.4 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở 37 °C.

4.5 Cân phân tích, có thể từ 0,1 g đến 10 g.

4.6 Máy ly tâm, có thể ly tâm với gia tốc 500 g, 1 000 g, 3 000 g.

4.7 Máy đọc ELISA.

4.8 Máy PCR.

4.9 Phiến kính.

4.10 Lamén.

4.11 Lưới lọc phân, có kích thước lỗ lọc 200 µm.

### 5 Cách tiến hành

5.1 Chẩn đoán lâm sàng

5.1.1 Đặc điểm dịch tễ

- Sán lá gan gây bệnh cho động vật ăn cỏ như trâu, bò, dê, cừu, ngoài ra bệnh còn gặp ở lợn và người;
- Bệnh xảy ra ở mọi lứa tuổi, mọi giống và không phân biệt tính biệt. Tỷ lệ và cường độ nhiễm sán tỷ lệ thuận với tuổi của động vật cảm nhiễm;
- Bệnh thường gặp ở vùng đồng bằng và miền núi, nhất là những nơi lầy lội, ẩm thấp, nước ngập quanh năm.

## 5.1.2 Triệu chứng

### 5.1.2.1 Thể cấp tính

- Bệnh ở thể cấp tính thường gặp ở gia súc non. Bê, nghé, dê, cừu bỏ ăn, mệt mỏi, lười vận động, chướng hơi dạ cỏ, sau đó tiêu chảy dữ dội, phân lỏng màu xám, có mùi tanh. Chỉ vài ngày sau con vật nằm bệt và chết trong tình trạng mất nước, rối loạn điện giải và kiệt sức;
- Bệnh nặng hơn khi bê nghé nhiễm thứ phát các vi khuẩn gây bệnh có sẵn trong đường ruột như: *Salmonella*, *E. coli*, *Proteus*. Đôi khi, trâu bò chết cấp tính mà không biểu hiện triệu chứng;
- Ở bê, nghé hoặc cừu non bệnh thường thấy ở trạng thái cấp hoặc á cấp tính, có hiện tượng xuất huyết do sán di hành hoặc nhiễm độc kế phát từ bệnh gây ra do *Clostridium* (viêm ruột hoại tử) hoặc bệnh *Corynebacteria* (áp xe gan);
- Ở giai đoạn sớm và trong trường hợp số lượng sán lá gan trong đường mật chưa có nhiều, các biểu hiện của bệnh thường ít được chú ý. Các biểu hiện có thể gặp là đau vùng thượng vị, sốt, nôn, tiêu chảy, ngứa.

### 5.1.2.2 Thể mạn tính

- Phổ biến ở trâu, bò, dê, cừu trưởng thành được nuôi dưỡng tốt và sán đã ở giai đoạn trưởng thành, ký sinh trong ống mật với số lượng ít. Triệu chứng thể mạn tính xuất hiện sau thể cấp tính nửa tháng tới hai tháng;
- Gia súc ăn ít, gầy còm, suy nhược;
- Con vật có biểu hiện thiếu máu, niêm mạc nhợt nhạt, lông xù xỉ, thủy thũng mi mắt, ngứa;
- Tiêu chảy kéo dài, đôi khi táo bón, phân màu đen, mất dần khả năng sinh sản và làm việc;
- Gia súc có thể chết do suy kiệt.

## 5.1.3 Bệnh tích

### 5.1.3.1 Thể cấp tính

- Gan xuất huyết, trên mặt gan có khi thấy những đường đi của sán non làm thành những vết đỏ thẫm dài từ 2 mm đến 4 mm, trong ống dẫn mật có sán non nhỏ, số lượng nhiều;
- Lớp thanh mạc xuất huyết nhẹ, đôi khi có tơ huyết;
- Khi nhiễm nặng thì viêm phúc mạc, gan xuất huyết nhiều, niêm mạc nhợt nhạt.

### 5.1.3.2 Thể mạn tính

- Viêm túi mật mạn tính, ống dẫn mật dày lên do mô liên kết tăng sinh;
- Thành ống mật có hiện tượng canxi hóa;
- Tổ chức gan tổn thương thoái hóa và cuối cùng là dẫn đến xơ gan. Những nơi mô gan bị phá hủy, có những đám màu vàng xám, khi kiểm tra dưới kính hiển vi thấy nhu mô gan mất màu;
- Bệnh ở thể mạn tính xuất hiện sán trưởng thành trong túi mật và ống dẫn mật.

## 5.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

### 5.2.1 Lấy mẫu

#### 5.2.1.1 Lấy mẫu cho xét nghiệm kháng thể

- Mẫu huyết thanh: sử dụng xy lanh vô trùng để lấy 1 ml đến 5 ml máu ở tĩnh mạch cổ hoặc động mạch đùi của trâu, bò, dê, cừu nghi mắc bệnh chưa tiêm vắc xin phòng bệnh sán lá gan. Máu lấy ra được chứa trong bơm tiêm, rút pit tông tạo khoảng trống (hoặc bơm máu vào ống nghiệm vô trùng), ghi ký hiệu mẫu trên bơm tiêm hoặc ống nghiệm rồi đặt nằm nghiêng 45° trong hộp đựng mẫu, để đông máu trong 1 h đến 2 h ở nhiệt độ bình thường, tránh ánh nắng trực tiếp. Sau đó, chất huyết thanh sang ống nghiệm vô trùng khác (hoặc ống eppendorf) thực hiện xét nghiệm mô tả tại 5.2.3 – phát hiện kháng thể bằng phương pháp ELISA;
- Mẫu sữa: lấy sữa trực tiếp ngay từ con vật hoặc lấy sữa đã vắt cho vào ống vô trùng có nắp đậy để thực hiện xét nghiệm mô tả tại 5.2.3 – phát hiện kháng thể bằng phương pháp ELISA.

#### 5.2.1.2 Lấy mẫu cho xét nghiệm kháng nguyên

- Mẫu phân: dùng túi nilon sạch, lộn ngược rồi đeo vào tay hoặc đeo găng tay bảo hộ, đưa tay vào trực tràng lấy phân trực tiếp trong trực tràng con vật hoặc lấy phân con vật vừa thải ra ngoài môi trường, đựng mẫu phân lấy được vào lọ miệng rộng hoặc túi nilon sạch thực hiện xét nghiệm mô tả tại 5.2.2.1 – phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp lắng cận; 5.2.2.2 – phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp lắng cận – phù nổi; và 5.2.2.3 – phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp ELISA;

- Trứng sán: thu hồi trong phân của gia súc bằng phương pháp lắng cặn hoặc lắng cặn - phù nổi thực hiện xét nghiệm mô tả tại 5.2.2.4 – phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp PCR;
- Con sán: cắt nhỏ từng nhu mô gan hay bộc lộ ống dẫn mật, túi mật để lấy sán thực hiện xét nghiệm mô tả tại 5.2.2.4 – phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp PCR.

### 5.2.1.3 Bảo quản mẫu

Trong quá trình vận chuyển phải bảo quản mẫu trong thùng bảo ôn (nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C) không quá 48 h. Ở phòng thí nghiệm, nếu chưa xét nghiệm ngay, phải được giữ trong tủ lạnh âm sâu (4.1) đối với mẫu huyết thanh và tủ lạnh (4.2) đối với mẫu máu chống đông.

CHÚ THÍCH: không lấy mẫu huyết thanh ở trâu bò đã được tiêm vắc xin phòng bệnh sán lá gan để xét nghiệm kháng thể vì các phương pháp trong tiêu chuẩn này không phân biệt được kháng thể nhiễm tự nhiên hay kháng thể do tiêm vắc xin.

## 5.2.2 Phát hiện kháng nguyên

### 5.2.2.1 Phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp lắng cặn

#### 5.2.2.1.1 Nguyên tắc

Dựa vào sự chênh lệch khối lượng riêng giữa trứng sán lá gan và khối lượng riêng của nước, trứng sán lá gan có khối lượng riêng lớn sẽ chìm xuống.

CHÚ THÍCH: phương pháp này cho phép phát hiện trứng sán trong phân khi sán đã trưởng thành và thải trứng, tức là sau nhiễm từ 8 tuần đến 10 tuần.

#### 5.2.2.1.2 Cách tiến hành

- Dùng cân phân tích (4.5) cân 3 g phân cần xét nghiệm, cho vào cốc thủy tinh hoặc cốc nhựa thứ nhất;
- Đổ 50 ml nước cất vào cốc chứa phân. Dùng thìa thủy tinh khuấy cho tan thành huyền dịch;
- Dùng lưới lọc phân (4.11) lọc huyền dịch ở cốc thứ nhất chuyển sang cốc thứ hai và loại bỏ cặn lớn;
- Để lắng cốc thứ hai trong 3 min, đổ bỏ phần nước phía trên và thu lấy phần cặn;
- Thêm 50 ml nước cất vào cốc chứa phần cặn trên, khuấy đều;
- Để lắng trong 3 min, đổ bỏ phần nước phía trên và thu lấy phần cặn;
- Thêm 50 ml nước sạch vào cốc chứa phần cặn, khuấy đều;
- Để lắng trong 3 min, đổ bỏ phần dung dịch phía trên và thu lấy phần cặn đổ vào đĩa petri;

- Kiểm tra trên kính hiển vi quang học (4.3) ở độ phóng đại 40 lần hoặc 100 lần.

CHÚ THÍCH: có thể giữ cặn trong đĩa petri ở 4 °C để kiểm tra vào hôm sau.

### 5.2.2.1.3 Đọc kết quả

- Kết quả được coi là dương tính khi tìm thấy trứng sán lá gan, màu vàng chanh, trong chứa phôi bào xếp kín, kích thước chiều dài từ 0,11 mm đến 0,15 mm, chiều rộng từ 0,07 mm đến 0,08 mm;

- Cần phân biệt về kích thước và màu sắc giữa trứng sán lá gan với trứng sán lá dạ cỏ:

1) Sán lá dạ cỏ: trứng có màu tro, phôi bào xếp thành từng cụm, rời rạc, kích thước chiều dài từ 0,12 mm đến 0,19 mm và chiều rộng từ 0,07 mm đến 0,09 mm;

2) Sán lá gan: trứng có màu vàng chanh, phôi bào xếp kín, đều, kín vỏ trứng, có nắp, kích thước chiều dài từ 0,11 mm đến 0,15 mm và chiều rộng từ 0,07 mm đến 0,08 mm.

### 5.2.2.2 Phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp lắng cặn - phù nổi

#### 5.2.2.2.1 Nguyên tắc

Dựa vào khối lượng riêng giữa trứng sán lá gan và dung dịch kẽm - muối (xem điều A.2 phụ lục A), trứng sán lá gan có khối lượng riêng nhỏ hơn sẽ nổi lên phía trên.

CHÚ THÍCH: Phương pháp này cho phép phát hiện trứng sán trong phân khi sán đã trưởng thành và thải trứng, tức là sau nhiễm từ 8 tuần đến 10 tuần.

#### 5.2.2.2.2 Cách tiến hành

- Dùng cân phân tích (4.5) cân 4 g phân cho vào cốc nhựa có dung tích 100 ml;
- Đổ 50 ml dung dịch formol 1 % (xem điều A.3 phụ lục A) vào cốc chứa phân;
- Hoà nhuyễn dung dịch phân, lọc ba lần qua lưới lọc phân (4.11) để loại bỏ cặn lớn;
- Đổ thêm 50 ml dung dịch formol 1 %, để dung dịch lắng ít nhất 1 h;
- Đổ phần dung dịch nổi phía trên, thu lấy phần cặn rồi đổ vào ống có dung tích 15 ml;
- Ly tâm ống với gia tốc 1 000 g trong 5 min (4.6);
- Đổ dung dịch nổi phía trên;
- Cho dung dịch kẽm – muối (xem điều A.2 phụ lục A) đến cách mép ống 2 cm. Đảo đều dung dịch phân trong ống;



- Ly tâm ống với gia tốc 500 g trong 5 min (4.6);
- Đổ thêm dung dịch kẽm – muối (xem điều A.2 phụ lục A) đầy ống, phủ lamen (4.10) lên phía trên miệng ống và để yên 1 min;
- Nhấc lamen lên cho vào phiến kính (4.9);
- Kiểm tra trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40 lần hoặc 100 lần (4.3).

### 5.2.2.2.3 Đọc kết quả

Kết quả được coi là dương tính khi tìm thấy trứng sán lá gan, màu vàng chanh, trong chứa phôi bào xếp kín, kích thước chiều dài từ 0,11 mm đến 0,15 mm, chiều rộng từ 0,07 mm đến 0,08 mm.

CHÚ THÍCH: do khối lượng riêng của dung dịch kẽm - muối bão hòa cao do đó trứng có thể bị phá hủy, gây khó khăn cho việc chẩn đoán phân biệt với trứng sán lá dạ cỏ nên cần đọc kết quả ngay sau khi tiến hành các bước.

### 5.2.2.3 Phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp ELISA

Hiện nay các kit ELISA thương mại đã có sẵn trên thị trường dùng để phát hiện kháng nguyên sán lá gan trên trâu bò (xem phụ lục B).

### 5.2.2.4 Phát hiện kháng nguyên bằng phương pháp PCR

#### 5.2.2.4.1 Tách chiết ADN

- Xử lý mẫu
  - 1) Sán lá gan: cắt một mẫu sán có kích thước khoảng 0,5 mm x 0,5 mm;
  - 2) Trứng sán lá gan thu hồi từ phân gia súc bằng phương pháp lắng cặn hoặc phương pháp lắng cặn phù nổi;
  - 3) Các mẫu trên rửa ba lần với dung dịch PBS 0,01M pH 7,2, sau đó bảo quản trong etanol 70° ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C cho đến khi sử dụng.
- Tách chiết ADN: sử dụng kit tách chiết mô thương mại:

Các mẫu được cắt nhỏ, nghiền nhuyễn bằng cối chày sứ, cho vào ống chứa 600 µl dung dịch đệm (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM, pH 8,0; SDS 2 %; NaCl 150 mM và proteinase K 200 mg/ml), trộn đều, sau đó ủ ở nhiệt độ 56 °C trong 2 h hoặc qua đêm ở nhiệt độ 37 °C.

Lọc huyền dịch qua màng lọc chuyển phần nước lọc vào ống 2 ml, ly tâm dung dịch với gia tốc 3 000 g (4.6) trong 3 min. Bỏ phần nước trong phía trên, thu lấy phần cặn.

#### 5.2.2.4.2 Tiến hành phản ứng PCR

Phản ứng PCR xét nghiệm *Fasciola hepatica* trong qui trình này sử dụng các cặp mồi để phát hiện gen đích COX 1. Trình tự cặp mồi được nêu trong Bảng 1.

**Bảng 1 – Trình tự cặp mồi**

Gen đích	Mồi	Trình tự cặp mồi 5' - 3' <i>F. hepatica</i>	Kích cỡ sản phẩm bp	Chu trình nhiệt
COX1	Mồi xuôi	TATGTTTTGATTTTACCCGGG	405	Chu trình 30 vòng : 95 °C, 60 s; 56 °C, 90 s; 72 °C, 90 s
	Mồi ngược	ATGAGCAACCACAAACCATGT		

#### 5.2.2.4.3 Hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt

– Chuẩn bị hỗn hợp (master - mix) (ví dụ theo hướng dẫn bộ kit Qiagen của nhà sản xuất) với tổng lượng 50 µl bao gồm KCl 50mM; Tris-HCl 10mM (pH 9,0); Triton X - 100; dNTP 200 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM; mồi xuôi 0,1 mM; mồi ngược 0,1 mM; Taq ADN 1,0 U.

GHI CHÚ: phản ứng PCR phải bao gồm mẫu kiểm tra, mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm.

#### 5.2.2.4.4 Điện di sản phẩm PCR

Pha 1,2 g bột agarose (gel) với 100 ml TAE 1 X, rồi đun nóng trong lò vi sóng cho đến khi tan hoàn toàn. Khi hỗn hợp nguội bớt (khoảng 50 °C đến 60 °C), cho tiếp 2 µl etidium bromua vào. Sau đó đổ vào khay và cắm lược. Để gel cứng lại trong khoảng 1 h, rồi rút lược ra.

Đổ đầy dung dịch TAE 1 X vào bể điện di (đến vạch "full level"), đặt khay gel vào vị trí trong bể điện di. Pha 2 µl đệm tải mẫu với 15 µl của sản phẩm mẫu vừa khuếch đại, mẫu đối chứng dương, âm cho vào giếng của miếng gel.

Điện di gel ở 80 V đến 100 V trong 30 min đến 40 min. Đặt gel đã điện di vào máy chiếu UV có bước sóng 590 nm.

#### 5.2.2.4.5 Đọc kết quả

- Mẫu dương tính khi hiển thị vạch sản phẩm giống như đối chứng dương và có kích thước 405 bp với điều kiện đối chứng âm không có vạch sản phẩm xuất hiện;
- Mẫu âm tính khi không có vạch sản phẩm xuất hiện và giống đối chứng âm;

– Mẫu nghi ngờ hiển thị vạch sản phẩm không rõ nét hoặc hiển thị nhiều hơn 1 vạch sản phẩm. Trường hợp này cần xét nghiệm lại hoặc sử dụng các phương pháp để khẳng định.

### **5.2.3 Phát hiện kháng thể bằng phương pháp ELISA**

Hiện nay các kit ELISA thương mại đã có sẵn trên thị trường dùng để phát hiện kháng thể sán lá gan trên trâu bò (xem phụ lục C).

CHÚ THÍCH: kit phát hiện kháng thể sán lá gan không thể phân biệt được kháng thể do nhiễm tự nhiên hay kháng thể do tiêm vắc xin.

## **6 Kết luận**

Gia súc được kết luận là mắc bệnh sán lá gan khi có các đặc điểm dịch tễ, triệu chứng và bệnh tích điển hình của bệnh và có kết quả xét nghiệm kháng nguyên hoặc kháng thể dương tính bằng một trong những phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

**Phụ lục A**  
(Quy định) .

**Môi trường và dung dịch thuốc thử**

**cho phương pháp lắng cặn - phù nổi phát hiện trứng sán lá gan**

**A.1 Nước muối bão hòa, khối lượng riêng 1,2**

Natri clorua (NaCl):	400 g
Nước:	1 lít

Dùng đũa thủy tinh khuấy đều cho đến khi muối không tan được nữa thì ngừng.

**A.2 Dung dịch kẽm - muối, khối lượng riêng 1,53**

Kẽm clorua (ZnCl <sub>2</sub> )	1280 g
Nước	610 ml
Nước muối bão hoà	650 ml

**A.3 Dung dịch formol 1 %**

Formaldehyd:	1 ml
Nước cất:	99 ml

## **Phụ lục B**

### **(Tham khảo)**

### **Phương pháp ELISA phát hiện kháng nguyên sán lá gan**

#### **B.1 Chuẩn bị nguyên liệu**

- Dung dịch đệm pha loãng mẫu (5 X): pha loãng dung dịch đệm với nước cất đã khử ion theo tỷ lệ 1/5 (cho 20 ml dung dịch đệm 5 X vào 80 ml nước cất đã khử ion);
- Dung dịch rửa (20 X): pha loãng dung dịch rửa với nước cất đã khử ion theo tỷ lệ 1/20 (cho 50 ml dung dịch rửa 20X vào 950 ml nước cất đã khử ion);
- Kháng kháng thể gắn enzyme biotin (50 X): pha loãng kháng kháng thể gắn enzyme biotin với dung dịch đệm đã pha loãng theo tỷ lệ 1/50 (cho 20 µl kháng kháng thể gắn enzyme biotin 50 X và 980 µl dung dịch đệm đã pha loãng);
- Kháng kháng thể gắn enzyme avidine – peroxidase (50 X): pha loãng kháng kháng thể gắn enzyme avidine – peroxidase với dung dịch đệm đã pha loãng theo tỷ lệ 1/50 (cho 20 µl kháng kháng thể gắn enzyme avidine – peroxidase 50 X và 980 µl dung dịch đệm đã pha loãng);
- Pha loãng mẫu phân phân cần kiểm tra: dùng cân phân tích (4.5) cân 2 g phân, rồi cho 2 ml dung dịch đệm pha loãng sau khi đã pha loãng. Ly tâm với gia tốc 1 000 g trong 10 min (4.6). Thu lấy phần dịch nổi phía trên.

#### **B.2 Cách tiến hành**

- Nhỏ 100 µl mẫu phân đã pha loãng vào 2 giếng. Đối chứng dương cho vào 2 giếng (theo sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên). Phủ đĩa bằng giấy nhôm, giữ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 2 h;
- Rửa đĩa ba lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng;
- Nhỏ 100 µl kháng kháng thể gắn enzyme biotin đã pha loãng vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 h;
- Rửa đĩa ba lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng;
- Nhỏ 100 µl kháng kháng thể gắn enzyme avidine – peroxidase đã pha loãng vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 h;

- Rửa đĩa ba lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng;
- Nhỏ 100 µl TMB vào mỗi giếng, tránh ánh sáng;
- Ủ đĩa 10 min ở nhiệt độ phòng;
- Nhỏ 50 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng;
- Đọc đĩa ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA (4.7)

### B.3 Đọc kết quả

$$OD = \frac{\Delta OD \text{ mẫu}}{OD \text{ mẫu đối chứng dương}} \times 100$$

Trong đó:

- OD: là mật độ quang học của mẫu
- $\Delta$  OD mẫu: giá trị trung bình giữa 2 giá trị OD của mẫu
- $\Delta$  OD mẫu đối chứng dương: giá trị trung bình giữa 2 giá trị OD của mẫu đối chứng dương:

1) Mẫu dương tính: OD của mẫu lớn hơn 7,99.

2) Mẫu âm tính: OD của mẫu nhỏ hơn 7,99.

CHÚ THÍCH: với mỗi bộ kit khác nhau thì ngưỡng OD để đánh giá là khác nhau

#### Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ĐC(+)	M4	M8	M12	M16	M20	M24	M28	M32	M36	M40	M44
B	ĐC(+)	M4	M8	M12	M16	M20	M24	M28	M32	M36	M40	M44
C	M1	M5	M9	M13	M17	M21	M25	M29	M33	M37	M41	M45
D	M1	M5	M9	M13	M17	M21	M25	M29	M33	M37	M41	M45
E	M2	M6	M10	M14	M18	M22	M26	M30	M34	M38	M42	M46
F	M2	M6	M10	M14	M18	M22	M26	M30	M34	M38	M42	M46
G	M3	M7	M11	M15	M19	M23	M27	M31	M35	M39	M43	M47
H	M3	M7	M11	M15	M19	M23	M27	M31	M35	M39	M43	M47

**CHÚ THÍCH:** các dòng A,C,E,G phủ kháng thể đặc hiệu; các dòng B,D,F,H không phủ kháng thể đặc hiệu

**ĐC (+):** đối chứng dương (có sẵn trong bộ kit)

**Từ M1 đến M47:** mẫu xét nghiệm từ số 1 đến số 47.

## Phụ lục C

(Tham khảo)

### Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể sán lá gan

Có thể sử dụng bộ kit có bán sẵn để phát hiện kháng thể sán lá gan có trong mẫu huyết thanh và sữa.

CHÚ THÍCH: do chi phí phát hiện kháng thể sán lá gan bằng phương pháp ELISA cao nên thường dùng trong điều tra huyết thanh học.

#### C.1 Chuẩn bị nguyên liệu

– Dung dịch rửa (20 X): pha loãng dung dịch rửa với nước cất đã khử ion theo tỷ lệ 1/20 (cho 50 ml dung dịch rửa 20 X vào 950 ml nước cất đã khử ion);

– Kháng kháng thể gắn enzyme peroxidase (100 X): pha loãng kháng kháng thể gắn enzyme peroxidase với dung dịch đệm 1 theo tỷ lệ 1/100 (cho 10 µl kháng kháng thể gắn enzyme peroxidase 100 X và 990 µl dung dịch đệm 1);

– Pha loãng mẫu:

1) Đối với mẫu đối chứng và đối chứng dương cần pha loãng theo tỷ lệ 1/20 bằng dung dịch đệm 2 (cho 10 µl mẫu đối chứng vào 190 µl dung dịch đệm 2);

2) Đối với mẫu huyết thanh kiểm tra: pha loãng mẫu huyết thanh cần kiểm tra theo tỷ lệ 1/20 bằng dung dịch đệm 2 (cho 10 µl huyết thanh cần kiểm tra vào 190 µl dung dịch đệm 2).

#### C.2 Cách tiến hành

– Nhỏ vào hai giếng, mỗi giếng 200 µl đối chứng âm đã pha loãng;

– Nhỏ vào bốn giếng, mỗi giếng 200 µl đối chứng dương đã pha loãng;

– Nhỏ vào hai giếng, mỗi giếng 200 µl huyết thanh cần kiểm tra đã pha loãng;

– Hoặc nhỏ vào hai giếng, mỗi giếng 200 µl mẫu sữa không pha loãng (theo sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng thể);

– Lắc đều đĩa; phủ đĩa bằng giấy nhôm hoặc giấy dính, ủ đĩa 1 h ở tủ ấm 37 °C (4.4);

– Rửa đĩa ba lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng;



- Cho 100 µl kháng kháng thể gắn enzyme peroxidase đã pha loãng vào từng giếng, phủ đĩa và ủ ở nhiệt độ 37 °C (4.4) trong vòng 30 min;
- Rửa đĩa ba lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng;
- Cho 100 µl TMB vào từng giếng;
- Ủ đĩa ở 21 °C trong 20 min, tránh ánh sáng;
- Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng;
- Lắc đều đĩa cho đến khi có màu đồng nhất;
- Đọc đĩa ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA (4.7)

### C.3 Đánh giá kết quả

- OD hiệu chỉnh của mẫu = (OD của giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu – OD của giếng chưa phủ kháng nguyên đặc hiệu);
- Kết quả tin cậy nếu thỏa mãn 2 điều kiện sau:
  - 1) Giá trị OD trung bình hiệu chỉnh của đối chứng dương lớn hơn 0,35;
  - 2) Tỷ lệ giữa OD trung bình hiệu chỉnh của đối chứng dương và OD trung bình hiệu chỉnh của đối chứng âm không nhỏ hơn 3,5.
- Đối với mẫu kiểm tra, tỷ lệ S/P tính như sau:

$$S/P (\%) = \frac{\text{OD hiệu chỉnh của mẫu kiểm tra}}{\text{OD trung bình hiệu chuẩn của mẫu đối chứng dương}} \times 100 \%$$

Kết quả S/P (%) được trình bày ở bảng sau:

S/P của mẫu kiểm tra %	Độ nhiễm (đối với từng cá thể)	Mức độ nhiễm bệnh (trong đàn)	
Bằng hoặc lớn hơn 150	+++	Nhiễm nặng (lớn hơn 50 % nhiễm)	+++
Lớn hơn 80 đến 150	++	Nhiễm trung bình (từ 20 % đến 50 % nhiễm)	++
Lớn hơn 30 đến 80	+	Nhiễm thấp (ít hơn 20 % nhiễm)	+
Bằng hoặc nhỏ hơn 30	0	Không nhiễm hoặc nhiễm không đáng kể	0

CHÚ THÍCH: độ nhiễm (đối với từng cá thể)

+++ : nhiễm nặng

++ : nhiễm trung bình

+ : nhiễm thấp

0 : không nhiễm hoặc nhiễm không đáng kể

**Sơ đồ đĩa phản ứng ELISA phát hiện kháng thể**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	M6	M6	M14	M14	M22	M22	M30	M30	M38	M38
B	P	P	M7	M7	M15	M15	M23	M23	M31	M31	M39	M39
C	P	P	M8	M8	M16	M16	M24	M24	M32	M32	M40	M40
D	M1	M1	M9	M9	M17	M17	M25	M25	M33	M33	M41	M41
E	M2	M2	M10	M10	M18	M18	M26	M26	M34	M34	M42	M42
F	M3	M3	M11	M11	M19	M19	M27	M27	M35	M35	M43	M43
G	M4	M4	M12	M12	M20	M20	M28	M28	M36	M36	M44	M44
H	M5	M5	M13	M13	M21	M21	M29	M29	M37	M37	M45	M45

CHÚ THÍCH:

Cột 1, 3, 5, 7, 9, 11: phủ kháng nguyên đặc hiệu

Cột 2, 4, 6, 8, 10: không phủ kháng nguyên đặc hiệu

N: đối chứng âm (Có sẵn trong bộ kit)

P: đối chứng dương (Có sẵn trong bộ kit)

Từ M1 đến M45: mẫu xét nghiệm từ số 1 đến số 45

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Phạm Văn Khuê và Phan Lục, 1996. *Giáo trình ký sinh trùng thú y*. Nhà xuất bản Đại học Nông Nghiệp I, trang 53 - 64.
  - [2] Marcela A.Cucher et all, *Diagnosis of Fasciola hepatica in field-collected Lymnaea columella and Lymnaea viatrix snails*, Veterinary Parasitology 137 (2006) 74–82PCR
  - [3] Levecke B et all, *Mixed Giardia duodenalis assemblage A, B, C and E infections in pet chinchillas (Chinchilla lanigera) in Flanders (Belgium)*. Veterinary Parasitology 2011 Apr 19;177(1-2):166-70. Epub 2010 Nov 21.
  - [4] <http://www.biox.com/Default.aspx?tabid=64&utid=46>
  - [5] [http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/livestock-poultry/fasciolosis-verification-test-insert.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/livestock-poultry/fasciolosis-verification-test-insert.pdf)
  - [6] <http://www.fao.org/wairdocs/ILRI/x5492E/x5492e05.htm>
  - [7] JICA. Third edition, 2003. *Standard Diagnostic Manual for livestock diseases in Thailand*. p.73 – 74.
-