Thiết lập qui trình nuôi ấu trùng giun đũa chó *Toxocara canis*

Hồ Đăng Minh Nhựt[1], Nguyễn Thị Kê[2], Võ Doãn Trung[1], Phan Thị Ngọc Điệp[3], Nguyễn Hữu Hùng[1,*]

[1]Khoa Công nghệ Sinh học và Môi trường, Đại học Nguyễn Tất Thành
[2]Khoa Y, Đại học Nguyễn Tất Thành
[3]Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM
[*]nhhung@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Toxocariasis là bệnh giun đũa chó/mèo lây từ thú sang người rất phổ biến, do ấu trùng giun đũa *Toxocara canis* (*T. canis*) hay *Toxocara cati* (*T. cati*) gây ra. Chẩn đoán nhiễm *Toxocara* spp. phụ thuộc vào việc phát hiện kháng thể kháng protein trong dịch bài xuất/tiết của ấu trùng giun đũa. Kể từ nghiên cứu đầu tiên của De Savigny, nhiều tiến bộ trong phương pháp nghiên cứu đã thực hiện, nhưng các phương pháp này thường khó thực hiện, tốn kém và cho nhiều kết quả khác nhau. Nghiên cứu này đề xuất một phương pháp đơn giản và hiệu quả để thu nhận tối đa trứng *Toxocara canis* đã thụ tinh. Nuôi giun trưởng thành trong môi trường dinh dưỡng để thu trứng, sau 5 – 6 ngày nuôi, giun được mổ để tận thu trứng từ trong tử cung. Sau một tháng ấp trứng, ấu trùng bên trong trứng sẽ được kích nở nhờ CO_2 sinh ra từ phản ứng hoá học trong môi trường HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Ấu trùng sau đó được lọc qua rây có đường kính lỗ 40µm để thu ấu trùng sống. Kết quả cho thấy tỉ lệ ấu trùng hình thành phôi trong phương pháp nuôi (82.5%) cao hơn so với phương pháp mổ (40%). Phương pháp này cho hiệu quả cao hơn so với phương pháp của De Savigny và các phương pháp khác theo ba cách: (i) tăng tối đa lượng ấu trùng thu được, (ii) cải thiện khả năng tinh sạch ấu trùng, (iii) giảm đáng kể thời gian và công sức thực hiện. Protein bài xuất/tiết của *T. canis* có trong dịch nuôi cấy khi phân tích bằng phương pháp điện di SDS – PAGE cho thấy có ít nhất 17 protein được phát hiện. Các protein này có trọng lượng phân tử từ 19,5 đến 498,5kDa và protein 33,1kDa là thành phần chiếm tỉ trọng cao nhất.

Nhận 20.09.2018
Được duyệt 18.02.2019
Công bố 26.03.2019

Từ khóa
Toxocariasis, *T. canis*, ấu trùng L2, kháng nguyên bài xuất/tiết, dịch E/S

® 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Bệnh giun đũa chó/mèo ở người được Wilder mô tả lần đầu năm 1950 khi phát hiện ấu trùng giun tròn trong u hạt võng mạc (retinal granuloma). Sau đó Beaver và cộng sự (1952) lần đầu tiên dùng thuật ngữ "ấu trùng di chuyển nội tạng" (visceral larva migrans) để báo cáo một loạt ca bệnh ở trẻ em có bạch cầu ái toan tăng cao trong máu, đi kèm với đau nhiều và kéo dài ở nhiều cơ quan khi làm sinh thiết phát hiện ấu trùng *T. canis* hay *T. cati*.

Người bị nhiễm do ăn phải thức ăn, nước uống có trứng chứa ấu trùng hoặc tiếp xúc nơi có trứng. Ấu trùng bên trong trứng nở ra ở ruột non, xuyên qua ruột non vào trong máu và theo dòng máu di chuyển đến các cơ quan khác nhau trong cơ thể như gan, não, mắt, hệ thần kinh và gây ra nhiều tổn thương như: ấu trùng di chuyển nội tạng, ấu trùng di chuyển ở mắt và ấu trùng di chuyển đến não. Chẩn đoán nhiễm ấu trùng *Toxocara* spp. thường được thực hiện bằng xét nghiệm huyết thanh miễn dịch tìm kháng thể đặc hiệu kháng kháng nguyên của ấu trùng tạo ra trong quá trình di chuyển.

Nhằm thu nhận một lượng lớn nguồn nguyên liệu kháng nguyên bài xuất/tiết (E/S) có chất lượng cao phục vụ trong việc xét nghiệm, chẩn đoán bệnh nhiễm giun đũa chó *T. canis*, chúng tôi tiến hành nuôi một lượng lớn ấu trùng *T. canis* trong thời gian dài. Để đạt được mục tiêu này, cần phải thu thập được một lượng lớn trứng đã thụ tinh từ những con giun đũa cái trưởng thành. Tuy nhiên, các phương pháp được mô tả trước đây cho thấy tốn nhiều thời gian, nhân công, tỉ lệ nhiễm cao. Nghiên cứu này trình bày một phương pháp được biến đổi, có hiệu quả đáng kể trong việc thu nhận ấu trùng giun đũa dùng trong nuôi cấy thu kháng nguyên E/S.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Thu nhận giun trưởng thành

T. canis trưởng thành được thu nhận từ ruột non của những con chó con (3 – 4 tháng tuổi) (n= 45) tại khu vực

quận 12 và Củ Chi. Chó được xác định nhiễm giun đũa *T. canis* bằng phương pháp soi nổi tìm trứng giun đũa trong phân. Chó được gây mê bằng Ketamin với liều 1ml/kg thể trọng. Rạch 1 đường thẳng từ giữa bụng đến gần giữa lồng ngực, sao cho vị trí cắt trùng với đường trắng trên bụng. Dùng kéo để thu nhận toàn bộ phần ruột non. Để thu giun trưởng thành, dùng tay vuốt dọc thân ruột sao cho toàn bộ giun dồn về 1 phần đầu ruột, nhẹ nhàng gắp từng giun trưởng thành bằng kẹp. Sau đó dùng kéo cắt dọc phần ruột non để tận thu giun còn sót lại. Để loại bỏ và làm giảm khả năng nhiễm khuẩn, giun được rửa nhiều lần bằng dung dịch PBS pH 7,0 bổ sung 1% formandehyde (F-PBS). Sử dụng cọ vẽ để làm sạch giun và loại bỏ những mảnh bám trên thân.

2.2 Chuẩn bị trứng thụ tinh

Có 2 phương pháp được dùng để thu trứng từ giun đũa cái gồm phương pháp nuôi và phương pháp mổ giun (Rodriguez - Caballero, Aarón, 2007). Nghiên cứu này áp dụng cả hai phương pháp. Phương pháp 1: Nuôi giun bằng dung dịch PBS vô trùng bổ sung 1% huyết thanh, 2% glucose, 5% CO_2 ở 37^{o}C. Sau 5 - 6 ngày nuôi, giun kiệt sức và chết. Thu trứng sau 5 – 6 ngày nuôi. Trứng *Toxocara* được li tâm, rửa và ủ trong dung dịch F-PBS trong một tháng cho đến khi ấu trùng hình thành bên trong trứng. Phương pháp 2: Giun sau nuôi được giải phẫu thu tử cung bằng cách sử dụng kính hiển vi soi nổi và dao mổ, rạch tử cung để lấy trứng. Trứng sau đó được ủ trong một tháng trong dung dịch F-PBS để hình thành ấu trùng.

Quan sát theo dõi thường xuyên phát hiện trứng tạo phôi. Sau đó, trứng được đếm bằng cách cho mẫu trứng vào đĩa nhựa ELISA dạng 96 giếng đáy bằng và soi dưới kính hiển vi soi ngược. Tính tỉ lệ trứng hình thành phôi theo công thức sau:

$$\%P = \frac{T_p}{\sum T}$$

Tp: Số trứng hình thành phôi

$\sum T$: Tổng số trứng hình thành phôi và không hình thành phôi

2.3 Ấp nở trứng mang phôi

Ủ trứng với dung dịch NaClO 6% khử trùng trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, trứng được ủ bằng dung dịch HBSS pH 2,0 (HBSS; 5,4mM KCl; 0,3mM Na_2HPO_4; 0,4mM KH_2PO_4; 1,3mM $CaCl_2$; 0,5mM $MgCl_2{\cdot}6H_2O$; 0.6mM $MgSO_4$ $7H_2O$; và 137mM NaCl) trong 30 phút ở 37^{o}C. HBSS trước khi dùng được chỉnh về pH = 7,4 bằng sodium bicarbonate và sau đó chỉnh về pH 2,0 bằng 10N hypochloride acid. Cuối cùng, ủ trứng trong môi trường DMEM ở 37^{o}C và CO_2 5% cho đến khi nở hoàn toàn. Khảo sát ấu trùng sau nở trứng và đếm tính hiệu quả ấp nở theo công thức sau:

$$\%H = \frac{L_l + L_d}{L_l + L_d + E_p + E_d}$$

Trong đó:
- E_d: số ấu trùng chết còn nằm trong trứng;
- L_l: số ấu trùng sống (di chuyển);
- L_d: số ấu trùng chết (không di chuyển);
- E_p: số ấu trùng sống còn nằm trong trứng.

2.4 Tinh sạch ấu trùng L2

Lọc ấu trùng khỏe mạnh bằng rây lọc tế bào (cell strainer) có đường kính lỗ 40µm.

2.5 Nuôi ấu trùng

Nuôi ấu trùng trong môi trường dinh dưỡng DMEM, bổ sung kháng sinh penicillin (100U/ml) và streptomycin (100ug/ml). Tỉ lệ 1.000 ấu trùng/ml.

2.6 Thu nhận kháng nguyên bài xuất/tiết (E/S) của ấu trùng *Toxocara canis*

Dịch E/S được thu nhận định kì mỗi 4 tuần. 80% lượng môi trường được thu nhận. Sau đó một lượng môi trường mới được bổ sung tương ứng với lượng đã lấy đi. Để loại bỏ hết cặn lắng, dịch tiết được li tâm qua màng lọc có đường kính lỗ 0,45µm. Dịch nuôi ấu trùng sau lọc được bổ sung dung dịch NaN_3 (nồng độ cuối 0,05 %) và giữ -20^{o}C.

2.7 Định lượng bằng phương pháp Bradford

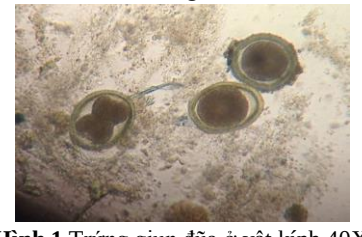
Dùng thuốc nhuộm Coomassie Briliant Blue G-250 và xây dựng đường chuẩn bằng BSA. Độ hấp phụ quang học được đo bằng máy Sunrise ở bước sóng 595nm. Phương trình y = ax + b của đường chuẩn được tính toán trên phần mềm Magellan và được dùng để tính lượng protein E/S trong mẫu. Trong đó y là giá trị OD_{595}, x là lượng protein.

2.8 Phân tích thành phần protein trong dịch tiết *Toxocara canis* bằng điện di SDS – PAGE 10%

Protein E/S *T.canis* được phân tích bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 10% có sự hiện diện của sodium dodecyl sulfate (SDS). Kháng nguyên E/S (200µg/giếng) được xử lý với β-mercaptoethanol, ở nhiệt độ 100^{o}C trong 30 phút. Mẫu protein được điện di ở 300V, 10mA trong 40 phút đối với gel gom và 20mA đối với gel tách. Thang chuẩn được sử dụng kèm để xác định trọng lượng phân tử các protein sau điện di. Sau điện di, protein trên gel được phát hiện bằng phương pháp nhuộm bạc và xác định trọng lượng phân tử bằng phần mềm Quantity One.

3 Kết quả

3.1 Xét nghiệm chó bị nhiễm giun đũa *Toxocara canis*



Hình 1 Trứng giun đũa ở vật kính 40X.

Đa số chó con bị nhiễm giun có biểu hiện bụng to, tròn (khác với bụng ăn no), kém ăn, sức khỏe yếu, mắt đỏ ghèn, phân thường có dấu hiệu sệt hoặc lỏng, một số trường hợp

giun được thải ra ngoài theo đường phân hoặc có trong dịch nôn mửa. Kết quả xét nghiệm (Hình 1) cho thấy 100% chó con phát hiện nhiễm trứng của ít nhất một loại kí sinh trùng. Trong đó, tỉ lệ nhiễm giun đũa *T. canis* là 95,5% (43/45 chó được phát hiện trứng giun đũa trong phân).

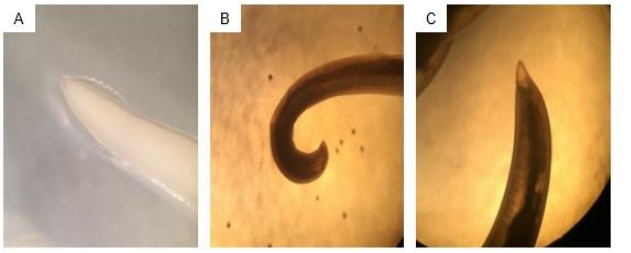
3.2 Thu nhận giun đũa trưởng thành

Xác định phần ruột non của chó có giun bằng cách vuốt dọc theo thân ruột sẽ phát hiện giun cộm lên. Trường hợp chó bị nhiễm giun nặng, số lượng giun trưởng thành nhiều, dày đặc, phân bố khắp phần ruột, có thể xác định bằng mắt thường. Dùng kéo thu đoạn ruột non có giun. Dùng mũi kéo cắt dọc theo thành ruột nhẹ nhàng. Trong quá trình thao tác phải chính xác và cẩn thận để tránh cắt nhầm giun trưởng thành (Hình 2).

Hình 2 Thu nhận giun trưởng thành từ ruột non. A, Giun đũa trưởng thành cộm lên trong thành ruột, có thể nhìn thấy bằng mắt thường. B, Giun trưởng thành được dồn về một đầu ruột bằng cách vuốt dọc thân ruột. C, Sử dụng mũi kéo cắt dọc thân ruột để tận thu những giun còn sót lại.

Giun đũa trưởng thành sau khi thu nhận từ ruột non được làm sạch, được đo kích thước và được xác định giới tính (Hình 3). Kết quả cho thấy, chiều dài trung bình của con giun đũa đực khoảng 4 – 8cm. Giun cái trưởng thành dài và to hơn, có chiều dài lên đến 20cm (Hình 3B). Việc xác định giới tính là nhờ vào hình dạng của đuôi giun: có móc là con đực và không có móc là con cái (Hình 4)

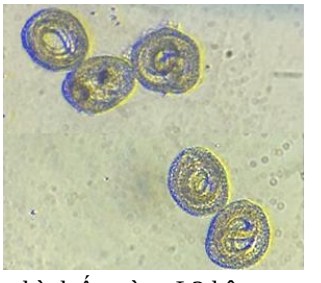
H. 3 Xác định chiều dài của giun trưởng thành. A, Chiều dài của giun cái trưởng thành có thể lên đến 20cm. B, Chiều dài trung bình của giun đũa đực khoảng 4 – 8cm. Giun cái trưởng thành có chiều dài 15 – 20cm.



Hình 4 Xác định *T. canis* bằng phương pháp hình thái học. A, Đầu *T. canis* với hai lằn gợn hai bên. B, Đuôi của giun đực có móc nhỏ. C, Đuôi của giun đũa cái có đầu tù

3.3 Chuẩn bị trứng thụ tinh

Kết quả cho thấy, với phương pháp nuôi có khoảng 82.5% trứng hình thành phôi, so với phương pháp mổ là 40%. Tỉ lệ trứng hình thành phôi trong phương pháp nuôi cao hơn so với phương pháp mổ.



H. 5 Sự hình thành ấu trùng L2 bên trong trứng sau 4 tuần ấp trứng. Trứng có ấu trùng di động bên trong. Ảnh được chụp dưới kính hiển vi soi ngược

3.4 Ấp nở và tinh lọc ấu trùng L2 khỏe mạnh

Sau ấp nở, đa số ấu trùng bên trong trứng đều thoát ra ngoài, những ấu trùng yếu hoặc chết sẽ không thể thoát khỏi vỏ trứng. Môi trường nuôi ấu trùng không bị nhiễm nấm hoặc vi sinh. Sau khi tinh lọc ấu trùng, nhận thấy 100% ấu trùng đều chui qua khỏi màng lọc (Hình 6).

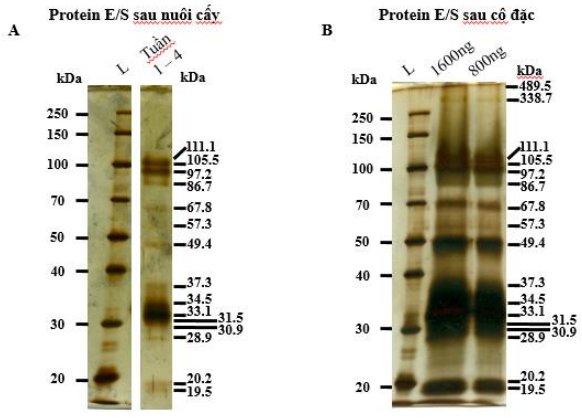
Hình 6 Ấu trùng L2 sau khi ấp nở

3.5 Thu nhận và phân tích protein bài tiết ấu trùng L2

Môi trường sau nuôi cấy được thẩm tích và protein được định lượng bằng phản ứng Bradford. Kết quả cho thấy, nồng độ protein E/S đạt 23,2µg/ml.

Bằng phương pháp điện di và nhuộm bạc, có 15 vạch được phát hiện, cho thấy dịch E/S có sự đa dạng về thành phần

protein (Hình 7). Sử dụng phần mềm phân tích Quantity One, các protein được ước tính có phân tử lượng từ 19,5kDa đến 111,1kDa. Trọng lượng phân tử trung bình của các protein E/S của *T. canis* được xác định bằng phần mềm GraphPad Prism 5.



Hình 7 Phân tích thành phần protein E/S trong dịch nuôi cấy ấu trùng sau mỗi 4 tuần liên tiếp bằng SDS-PAGE. A, 200ng protein được nạp vào giếng và nồng độ gel 10%; B, 0,8µg và 1,6µg protein E/S sau khi cô đặc bằng li tâm lọc được nạp vào giếng và nồng độ gel 10%. Sử dụng phương pháp nhuộm bạc. Phân tử lượng của các protein trong mẫu được tính toán bằng phần mềm Quantity One.

Trong số các protein này, nổi bật nhất là thành phần 33,1kDa chiếm tỉ trọng cao nhất trong dịch E/S. Phân tích phân tử lượng các protein trên gel còn cho thấy có hai nhóm protein có trọng lượng phân tử nằm gần nhau: nhóm có trọng lượng phân tử thấp (gồm 4 protein từ 30,9kDa đến 34,5kDa), và nhóm có trọng lượng phân tử cao (gồm 3 protein từ 97,2kDa đến 111,1kDa).

Dịch E/S sau cô đặc được phân tích bằng SDS-PAGE cho thấy rằng có ít nhất 17 protein được phát hiện có trọng lượng phân tử từ 19,5 đến 498,5kDa và protein 33,1kDa là thành phần chiếm tỉ trọng cao nhất.

4 Thảo luận

Nghiên cứu trước đây cho thấy việc nuôi giun trưởng thành *T. canis* (giun đực và giun cái chung với nhau) để thu trứng, cho phép thu được nhiều trứng với tỉ lệ trứng thụ tinh cao. Ngược lại, phương pháp mổ tử cung giun cái để thu trứng cho số trứng ít và trứng non không được thụ tinh rất nhiều. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kết hợp nuôi giun và sau đó mổ giun để tận thu trứng, vì vậy, tổng số lượng ấu trùng thu được tăng đáng kể. Trong quá trình nuôi giun đực cái chung, một giun cái đẻ khoảng 31 nghìn trứng, trong đó 82,5% trứng phát triển thành ấu trùng. Sau đó, giun cái kiệt sức và chúng bị mổ để tận thu trứng còn sót lại trong tử cung với số lượng trứng ít hơn so với với số trứng mà chúng đẻ ra khi nuôi. Chỉ 40% trong số trứng tận thu này phát triển thành phôi.

Quá trình ấp nở ấu trùng L2 bằng cách sử dụng HBSS pH 2,0 tỏ ra ít phức tạp hơn so với cách đã được công bố[5]. CO_2 sinh ra từ phản ứng giữa HCl và sodium bicarbonat giúp kích nở ấu trùng tốt hơn. Bước tiếp theo trong quá trình kích nở là phản ứng trung hòa pH acid khi toàn bộ trứng được rửa với môi trường DMEM. Những thay đổi đột ngột này tương tự như điều kiện môi trường trong ruột non vật chủ làm tăng tỉ lệ ấu trùng thoát ra khỏi màng bao trứng. Nghiên cứu này áp dụng qui trình kích nở trên. Kết quả cho thấy ấu trùng được kích nở một cách hiệu quả. Trong nhiều nghiên cứu trước đây, để tinh sạch ấu trùng người ta thường áp dụng phương pháp Baerman[3]. Theo đó, ấu trùng sẽ được lọc qua một lớp vải gạc được đặt trong một cái phễu có chứa môi trường dinh dưỡng. Ấu trùng sẽ di chuyển xuống đáy phễu khi được đặt trong môi trường ấm. Tuy nhiên, nếu nhiệt độ hạ trong quá trình thực hiện, ấu trùng sẽ yếu và trở nên di động chậm, ngoài ra, khả năng nhiễm khuẩn khá cao. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp Baermann đã được biến đổi, ấu trùng được lọc qua một rây lọc tế bào có đường kính lỗ 40µm. Trong suốt quá trình thực hiện, toàn bộ thiết bị được đặt trong tủ ấm 37^{o}C, đảm bảo cho sự di chuyển của ấu trùng xuống đáy, phương pháp lọc đơn giản, không gây nhiễm. Sau quá trình lọc, ấu trùng thu được là những ấu trùng khỏe mạnh, di động tốt. Những ấu trùng chết, yếu hoặc trứng chưa hình thành phôi được giữ lại bên trên.

Nghiên cứu này không hoàn toàn thống nhất với những nghiên cứu trước đây[4]. Trong nghiên cứu này, có một số vạch xuất hiện trên gel nhưng trong nghiên cứu của Page thì không. Những khác biệt này có thể là do sự khác nhau về điều kiện thí nghiệm và do sự khác nhau về loài *T. canis* phân bố ở những khu vực địa lí khác nhau và do đó cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn về vấn đề này.

5 Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định được hình thái của giun đũa chó *Toxocara canis*, giới tính đực/cái, trứng giun và đã nuôi thành công ấu trùng giun đũa chó *T. canis* để thu nhận protein E/S phục vụ cho ứng dụng chẩn đoán bệnh trên người. Ngoài ra, nghiên cứu này còn xác định được trong dịch E/S bằng SDS-PAGE gồm ít nhất 17 thành phần protein, trong đó protein 33,1kDa chiếm tỉ trọng lớn nhất.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2017.01.50/ HĐ-KHCN

Tài liệu tham khảo

1. Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH & Lafferty JW (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. Pediatrics, 9, 7 – 19.

2. Beaver PC (1956). Larva migrans. Exp. Parasitol., 5, 587 – 621.

3. Dickson Despommier (2003), "Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects", Clinical microbiology reviews, 16 (2), 265 – 272.

4. Page, A.P., et al. (1991). "Comparison of isolates and species of Toxocara and Toxocarasis by biosynthestic labelling of somatic and ES protein from infective larvae". *Parasitology*. 103 Pt 3, pp. 451 – 66.

5. Ponce-Macotela, Martha, et al. (2011), "A Simplified method for hatching and isolating *Toxocara canis* larvae to facilities excretory-secretory antigen collection in vitro", *Veterinary Parasitology*. 175(3 - 4), pp. 382 – 385.

6. Rodríguez-Caballero, Aarón, et al. (2007), "A simple and inexpensive in vitro method for retrieving fertilized *Toxocara canis* eggs", pp. 829 – 832.

The process establishment of raising *Toxocara canis*

Ho Dang Minh Nhut[1], Nguyen Thi Ke[2], Vo Doan Trung[1], Phan Thi Ngoc Diep[3], Nguyen Huu Hung[1,*]

[1]Faculty of Biotechnology and Environment, Nguyen Tat Thanh University
[2]Faculty of Medicine, Nguyen Tat Thanh University
[3]Faculty of Biology and Biotechnology, Ho Chi Minh University of Science, Vietnam National University HCMC
[*]nhhung@ntt.edu.vn

Abstract Toxocariasis *is a prevalent zoonotic disease which is caused by Toxocara canis* larvae or *Toxocara cati* larvae. Diagnosis of human toxocariasis depends on antibody detection against excretions–secretions (E/S) from *Toxocara* larvae. Since the earliest work of De Savigny, describing the hatching methods and culturing *Toxocara* larvae, few advances in the method have been made, but those methods are difficult to follow, expensive and have different results. In this work, we propose a simple and effective method for maximizing fertilized *Toxocara canis* eggs. Adult worms were cultured in medium to collect fertilized eggs, after 5-7 days, eggs were obtained using uterus excision method. The larvae inside the eggs will be triggered by CO_2 produced by the HBSS reaction. The larvae were then filtered through 40µl diameter sieve to collect larvae. The results showed that the proportion of fertilized eggs from culture method (82.5%) is higher than that of those obtained using uterus excision method (40%). This method proved more effective than the original De Savigny method in three ways: (i) Maximizing the number of larvae collected, (ii) improving the larval purity, and (iii) markedly reducing the execution time and labours of the protocol. E/S *Toxocara canis* proteins were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis , showing at least 17 proteins detected. These proteins have molecular weights from 19.5 to 498.5 kDa and the 33.1 kDa protein has the highest proportion.

Keywords Toxocariasis, *T. Canis*, Larvae L2, excretion/secretion antigens, E/S product