

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT LAMP TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH DO *ECHINOCOCCUS* Ở QUY MÔ PHÒNG XÉT NGHIỆM

Nguyễn Thu Hương¹, Nguyễn Thị Anh Vân¹, Nguyễn Phương Thoa¹
Phí Thị Hương Liên¹, Nguyễn Minh Toàn¹, Nguyễn Ngọc Hương Ly²
Đặng Anh Sơn³, Nguyễn Thị Hương Bình⁴

TÓM TẮT

Mục tiêu: Hoàn thiện quy trình kỹ thuật trong phát triển bộ sinh phẩm chẩn đoán nhiễm *Echinococcus* trên người Việt Nam (ECHO-LAMP). **Đối tượng và phương pháp:** Các hoạt động thực nghiệm trong phòng thí nghiệm gồm: 1) Thiết kế bộ sinh phẩm dựa trên nguyên lý phản ứng LAMP để chẩn đoán trường hợp nhiễm *Echinococcus*, 2) Khảo sát khả năng phát hiện trường hợp nhiễm *Echinococcus* của bộ sinh phẩm chế tạo. **Kết quả:** Bộ sinh phẩm LAMP chẩn đoán *Echinococcus* có khả năng phát hiện trường hợp nhiễm trên lâm sàng. Bộ sản phẩm khuếch đại LAMP chế tạo gồm 6 thành phần, trong đó, cặp mồi thiết kế có kích thước 228bp, chứng dương tạo ra cùng bộ Kít có nồng độ 100 ng/μL. Phản ứng LAMP chế tạo có nồng độ MG 0,004% và MgSO₄ 8 mM, phản ứng khuếch đại gen mồi tại 63^oC trong 60 phút, ngưỡng phát hiện bộ Kít là 10⁻⁸ng/μL tương đương với 2,82 x 10⁰ bản sao gen/μL. Khả năng phát hiện ca nhiễm *Echinococcus* của bộ sinh phẩm với độ nhạy trên 93% và độ đặc hiệu trên 98%. **Kết luận:** Bộ kít LAMP chế tạo có thể thực hiện trong phòng thí nghiệm cơ bản mà không cần các trang thiết bị đặc biệt và rất phù hợp với việc phát hiện tác nhân gây bệnh lây truyền từ động vật sang người.

* Từ khóa: *Echinococcus*; Gen 18SrRNA; LAMP.

Development of LAMP Technique in the Detection of Human *Echinococcosis* at the Laboratory Scale

Summary

Objectives: To perfect the technical process in developing the *Echinococcus* diagnostic kit and evaluate the sensitivity and specificity of the biological kit in the laboratory. **Subjects and methods:** The study was carried out on the experimental activities in the laboratory, including 1) Designing a biological kit based on the LAMP reaction principle to diagnose *Echinococcus* infections, 2) Surveying the ability of the preparation kit to detect human *Echinococcus* infections. **Results:** The performance of the *Echinococcus*-LAMP test (ECHO-LAMP) was found to be stable includes 6 components. In which the designed primer pair was 228 bp in size,

¹Trường Đại học Y tế Công cộng

²Trường PTTH Chuyên Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

³Bệnh viện Đa khoa Vinmec

⁴Viện Sốt rét - Ký sinh trùng Côn trùng Trung ương

Người phản hồi: Nguyễn Thu Hương (nth14@huph.edu.vn)

Ngày nhận bài: 19/11/2021

Ngày được chấp nhận đăng: 16/12/2021

the positive control was created with the kit with a concentration of 100 ng/ μ L. The fabricated LAMP reaction has MG concentration of 0.004% and MgSO₄ 8 mM, primer gene detection reaction at 63^oC for 60 minutes, the detection threshold of the kit is 10⁻⁸ ng/ μ L corresponding to 2.82x10⁰ gene copies/ μ L. The sensitivity and specificity were high above 95% for humane *Echinococcus*. **Conclusion:** The developed ECHO-LAMP test does not require a cold chain or a sophisticated laboratory. It holds promise for use as a routine simple molecular tool for point-of-care *Echinococcosis* diagnosis in zoonotic endemic diseases areas.

* Keywords: Human *Echinococcus*; Gen 18S rRNA; LAMP.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh nang nước (hydatid disease) hay còn gọi là bệnh hydatidosis hoặc *Echinococcosis* là bệnh nhiễm ký sinh trùng lây truyền từ chó sang người. Người nhiễm bệnh do nuốt trứng sán trong thức ăn, nước uống hoặc đất bị ô nhiễm, hoặc sau khi tiếp xúc trực tiếp với động vật. Trên thế giới, có hơn 1 triệu người bị nhiễm *Echinococcus* với tỷ lệ tử vong sau phẫu thuật là 2,2% và khoảng 6,5% tái phát sau khi can thiệp [6]. Việc chẩn đoán bệnh hiện nay chủ yếu dựa vào các triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm miễn dịch phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể lưu hành trong máu. Tuy nhiên, triệu chứng lâm sàng thường không đặc hiệu, thời gian ủ bệnh dài và khi có những biểu hiện của bệnh đã vào giai đoạn muộn và khó điều trị. Việc phát hiện nhanh do *Echinococcus* để có biện pháp điều trị hiệu quả là rất quan trọng. Hiện nay, các kỹ thuật xét nghiệm *Echinococcus* chủ yếu dựa vào xét nghiệm tìm nang ấu trùng sán trong cơ thể. Xét nghiệm này được xem là phương pháp chuẩn vàng trong chẩn đoán xác định ca bệnh. Một số kỹ thuật được sử dụng phổ biến tại các phòng xét nghiệm gồm kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp, nhuộm soi mô bệnh học, hoặc các kỹ thuật miễn dịch phát hiện kháng nguyên, kháng thể...

[4, 7, 8, 9, 10]. Tuy nhiên, xét nghiệm huyết thanh học là các xét nghiệm hữu ích trong giai đoạn người mới nhiễm sán hoặc những trường hợp bệnh mạn tính nhưng không tìm thấy trứng trong phân. Các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch có độ nhạy cao, độ đặc hiệu tùy thuộc vào từng loại test, có hiện tượng dương tính kéo dài và phản ứng chéo giữa các loài, khó triển khai tại thực địa.

Xét nghiệm sinh học phân tử như PCR, Real-time PCR hay giải trình tự là các phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, song đòi hỏi phải có trang thiết bị hiện đại và kỹ thuật viên có trình độ đào tạo cao. Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt LAMP được nghiên cứu và phát triển bởi Công ty Eiken Chemical (Nhật Bản) là phương pháp nhân bản gen đẳng nhiệt đang được ứng dụng nhiều nhất. Kết quả của phản ứng LAMP có thể được quan sát trực tiếp bằng mắt thường, thời gian xét nghiệm nhanh (khoảng 45 - 60 phút), xét nghiệm đồng thời nhiều mẫu. Trên thế giới và Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được công bố để ứng dụng kỹ thuật LAMP vào chẩn đoán nhiễm *Echinococcus*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển bộ kit và đánh giá kỹ thuật LAMP để phát hiện *Echinococcus*, hướng tới phát triển thành bộ kit dùng cho chẩn đoán nhanh từ các mẫu bệnh phẩm.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu chứng chuẩn: Sán và nang *Echinococcus* đã định loại bằng hình thái và khẳng định bằng kỹ thuật PCR.

- Mẫu nghiên cứu: Mẫu được thu thập từ phòng khám chuyên ngành của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng Côn trùng Trung ương lưu trữ tại Khoa Sinh học phân tử; mẫu huyết thanh người không nhiễm *Echinococcus* và một số ký sinh trùng khác thu từ xã Mai Trung, huyện Bắc Giang.

- Hóa chất dùng cho LAMP như Bst DNA polymerase được mua của Hãng New England Biolabs, Mỹ. Kit tách chiết ADN từ mẫu mô, mẫu phân của Hãng Qiagen, Đức. Các trình tự môi thiết kế được đặt tổng hợp của Hãng IDT, Mỹ.

* Thời gian và địa điểm nghiên cứu:

- Thời gian: tháng 01/2021 - 9/2021.

- Địa điểm: Phòng Xét nghiệm Sinh học phân tử của Trường Đại học Y tế Công cộng và Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

2. Phương pháp nghiên cứu

* Cỡ mẫu và chọn mẫu:

- Mẫu chuẩn sử dụng cho thiết kế và đánh giá hoạt động của bộ môi LAMP:

+ Mẫu chuẩn dương để chuẩn kỹ thuật: 03 mẫu ở các giai đoạn (ấu trùng và sán trưởng thành) thu trên linh trưởng và chó do Bộ môn Ký sinh trùng, Học viện Nông nghiệp cung cấp. Các mẫu này được thẩm định loài bằng qPCR trước khi đưa vào nghiên cứu, mỗi mẫu tiến hành xét nghiệm lặp lại 3 lần.

+ Mẫu chứng âm: Ấu trùng hoặc con trưởng thành: Giun chó mèo, sán lá gan lớn *Fasciola*, Giun móc/mỏ, *Teania solium*, *Strongyloides stercoralis* và nước cất khử ion.

- Mẫu sử dụng cho đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit ECHO-LAMP:

+ Mẫu dùng so sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm: Mẫu lựa chọn có chủ đích và được thực hiện với quy mô nhỏ trong phòng thí nghiệm dựa vào lượng mẫu dương tính tập hợp mẫu lâm sàng thử nghiệm với giả định tỷ lệ nhiễm (P) là 5%. Độ nhạy và đặc hiệu mong đợi của kit ECHO-LAMP khoảng 95%, sai số ước tính của hai xác suất là 5% với độ tin cậy (giá trị $\alpha = 0,05$) 95%. Số mẫu cần có để ước tính độ nhạy và độ đặc hiệu được xác định bằng công thức giữa hai tỷ lệ. Tính được $n_{se} = 3,46$ làm tròn 4 mẫu dương tính và $n_{sp} = 76,83$ làm tròn 77 mẫu âm tính. Trên thực tế, nghiên cứu 4 mẫu huyết thanh dương tính được lưu trữ tại phòng thí nghiệm (1 mẫu thu trên linh trưởng và 3 mẫu bệnh nhân) và 88 mẫu âm tính thu từ người khỏe mạnh, khẳng định âm tính các loại ký sinh trùng bằng ELISA và PCR.

- Mẫu sử dụng đánh giá phản ứng chéo các loại giun sán là 19 mẫu, trong đó *Toxocara* sp. (8 mẫu), ấu trùng sán lợn (2 mẫu); sán lá gan lớn *Fasciola* (5 mẫu), sán lá gan nhỏ (2 mẫu), giun *Strongyloides stercoralis* (2 mẫu). Các mẫu này cũng được thẩm định bằng qPCR.

- Mẫu sử dụng cho xác định ngưỡng phát hiện của bộ kit ECHO-LAMP:

Trên vùng trình tự bảo tồn trên gen 18s rRNA của sán dây *Echinococcus* sp. có kích thước 596 bp được chèn vào vector pUC19 và nhân dòng. Sản phẩm thu được là plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen 18S rRNA đặc trưng cho sán dây *Echinococcus* sp. có kích thước 3282 bp. Lượng plasmid thu hồi là 5 µg và hòa tan trong 50 µL nước cất để thu được nồng độ 100 ng/µL.

- Mẫu DNA phân tích:

DNA tổng số được phân tách từ con sán trưởng thành và mẫu bệnh phẩm thu từ bệnh nhân bằng bộ tách chiết DNA micro kit và QIAamp DNA stool mini kit của Qiagen (Germany). Quy trình tách chiết thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Thiết kế bộ mồi:

Mồi cho phản ứng LAMP sẽ được thiết kế trên vùng gen đặc hiệu cao Cox1 theo các nghiên cứu trước đã công bố trên thế giới (2,3). Phần mềm chuyên dụng thiết kế mồi cho phản ứng LAMP được sử dụng là phần mềm Primer Explorer v.5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Các trình tự gen 18s rRNA của các loài sán dây *Echinococcus* sp. trên ngân hàng dữ liệu NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) được tải về và sử dụng phần mềm MEGA 7 với tính năng chức năng Clustal W để sắp giống các trình tự bảo tồn gen của *Echinococcus* spp. Kết quả thu được đoạn trình tự bảo tồn cho *Echinococcus* spp. có kích thước 596 bp và sản phẩm sau phản ứng LAMP bằng cặp mồi F3-B3 có kích thước theo lý thuyết là 228bp < 280 bp.

Bảng 1: Trình tự mồi LAMP thiết kế trên vùng gen 18s rRNA phát hiện *Echinococcus* sp.

Tên mồi	Vị trí 5'	Vị trí 3'	Chiều dài (nu)	Tm (°C)	Tỷ lệ GC	Trình tự mồi
F3	283	303	21	56,60	0,38	AGAGGGTTTAAACCAGACATT
B3	489	510	22	57,89	0,41	CTTCGAACCTCTAACTTTCGTT
FIP			45			GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA- GGTCTAGCATGGAATAACACT
BIP			50			TACGTTAGAGGTGAAATTCCTTGGAC- CTTGATTAATGAAAACATTCTTGGC
F2	316	336	21	56,79	0,43	GGTCTAGCATGGAATAACACT
F1c	373	396	24	63,00	0,46	GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA
B2	464	488	25	57,47	0,32	CTTGATTAATGAAAACATTCTTGGC
B1c	408	432	25	60,49	0,40	TACGTTAGAGGTGAAATTCCTTGGAC
LB	437	457	21	64,14	0,57	GCGAGACGTCCTACTGCGAAA

- Khảo sát và tối ưu hóa phản ứng ECHO-LAMP:

Các thông số cần được khảo sát tối ưu hóa trong phản ứng LAMP là nồng độ Mg²⁺, nhiệt độ hoạt động của bộ mồi, thời gian phản ứng, chất chỉ thị màu dùng để quan sát phát hiện sản phẩm LAMP và độ

nhạy (ngưỡng phát hiện) của hệ mồi thiết kế trên cơ sở tiếp theo kết quả chế tạo các bộ kit LAMP chẩn đoán một số loài ký sinh trùng của đề tài cấp Nhà nước KC10/10.16-20. MgSO₄ được khảo sát ở các nồng độ 4, 6 và 8 mM. Phản ứng LAMP được thực hiện ở dải nhiệt độ từ 60 - 65°C,

sử dụng chất chỉ thị màu MG với các nồng độ 0,012, 0,008, 0,004 và 0,001% [5]. Thời gian thực hiện phản ứng LAMP được khảo sát ở 40 và 60 phút. Tiêu chí đánh giá lựa chọn các thông số dựa vào việc quan sát sản phẩm LAMP trên gel agarose 2% và sự chuyển màu dung dịch trong các ống mẫu âm và dương sau phản ứng. Đọc kết quả quan sát trên tổng số 12 lần xét nghiệm thông qua sự lặp lại 3 lần, với 4 mẫu chứng và được đánh giá bởi 3 kỹ thuật viên quan sát độc lập tại các thời điểm xét nghiệm.

- Độ nhạy (Se) và độ đặc hiệu (Sp) của bộ ECHO-LAMP:

Bộ mẫu dùng đánh giá Se và Sp của bộ kit LAMP chẩn đoán *Echinococcus* là các mẫu dương tính lưu tại phòng thí nghiệm và các mẫu thu thực địa. Tất cả mẫu này đều đã được xét nghiệm khẳng định bằng qPCR trước khi thử nghiệm. Hiện chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán *Echinococcus* được thương mại hóa. Do vậy, chúng tôi sử dụng một bộ kit có cùng các điều kiện phản ứng nhưng bộ môi đã công bố của Salant và CS, 2012 [12] để so sánh với bộ kit ECHO-LAMP chế tạo.

$Se = \frac{\text{Số mẫu dương thật}}{\text{Số mẫu dương thật} + \text{Số mẫu âm giả}} \times 100\%$

$Sp = \frac{\text{Số mẫu âm thật}}{\text{Số mẫu âm thật} + \text{Số mẫu dương giả}} \times 100\%$.

* Các kỹ thuật khác được sử dụng trong nghiên cứu:

- Thu thập và bảo quản mẫu theo quy trình thu mẫu.

- Xử lý mẫu và tách chiết DNA theo phương pháp tủa cồn.

- Kỹ thuật qPCR xác định *Echinococcus*.

- Phương pháp tạo dòng: Trình tự DNA đích cần tạo dòng được chuyển vào plasmid tạo dòng. Plasmid tái tổ hợp mang đoạn

trình tự đích, sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5 α , theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm.

- Kỹ thuật giải trình tự trên máy giải trình tự tự động 3500.

* Phương pháp phân tích và xử lý số liệu:

- Phân tích số liệu bằng các phần mềm đi kèm với các máy và các phần mềm tin sinh: AB7500 version 2.06, Primer Explorer v.5, Primer Blast, Mega 7.

- Tính độ nhạy, độ đặc hiệu, hệ số tương đồng Kappa trên phần mềm Medcalc.

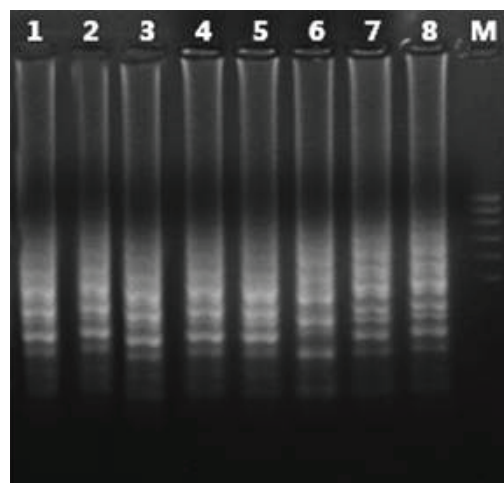
* Đạo đức nghiên cứu:

Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức trong NCYSH Trường Đại học Y tế Công cộng theo Quyết định số 191/2021/YTCC-HD3, ngày 26/4/ 2021. Những quy định về đạo đức trong nghiên cứu đã được thực hiện nghiêm túc trong suốt quá trình nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Chế tạo bộ Kit LAMP chẩn đoán *Echinococcus*

* Khảo sát khả năng hoạt động của bộ môi LAMP:



Hình 1: Sản phẩm LAMP sử dụng bộ môi tự thiết kế đặc hiệu cho *Echinococcus* sp.

Để đánh giá khả năng hoạt động của bộ mồi thiết kế, kết quả điện di trên gel agarose 2% cho thấy, sản phẩm sau phản ứng (cột 1-8) của mẫu dương chuẩn có dạng dải băng dài tương đương thang chuẩn DNA (M), đây là hình ảnh đặc trưng của sản phẩm LAMP.

Bảng 2: Kết quả hoạt động các cặp mồi đặc hiệu *Echinococcus* sp.

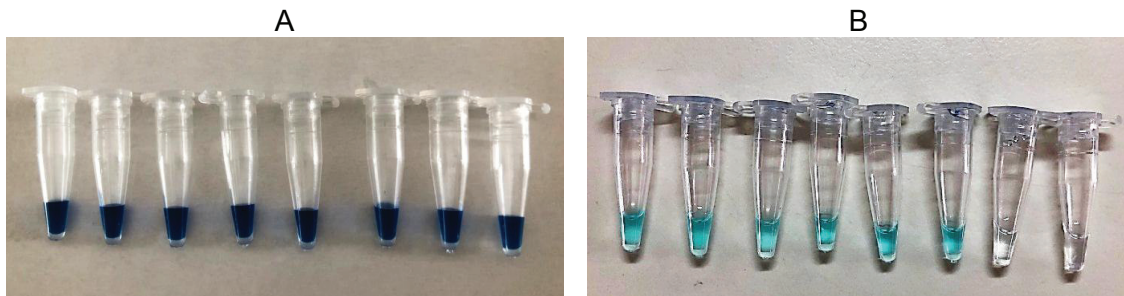
ADN	Mồi F3-B3
Sản dây nhỏ chó <i>Echinococcus</i> sp.	+
Giun móc/mỏ	-
Giun đũa chó mèo <i>Toxocara</i>	-
Sán lá gan lớn <i>Fasciola</i>	-
Sản dây <i>Teania solium</i>	-
Giun lươn đường ruột <i>Strongyloides stercoralis</i>	-
Nước cất khử ion	-

Bảng 2 cho thấy khả năng hoạt động các cặp mồi thiết kế chỉ phát hiện được mẫu tách ADN của *Echinococcus* sp, không phản ứng với mẫu ADN tách từ giun chó mèo, sán lá gan lớn *Fasciola*, giun móc/mỏ, *Teania solium*, *Strongyloides stercoralis* và nước cất khử ion.

* *Kết quả khảo sát chất chỉ thị màu cho phản ứng LAMP:*

Bảng 3: Kết quả quan sát chất chỉ thị màu MG ở các nồng độ khác nhau.

Nồng độ MG	Mẫu	Màu xanh lam		% Dương tính	% Âm tính
		Có	Không		
0,001%	Chứng dương	0	36	0	100
	Chứng âm	0	36	0	100
0,004%	Chứng dương	36	0	100	0
	Chứng âm	0	36	0	100
0,008%	Chứng dương	36	0	100	0
	Chứng âm	27	9	75	25
0,012%	Chứng dương	36	0	100	100
	Chứng âm	31	5	86,1	13,8

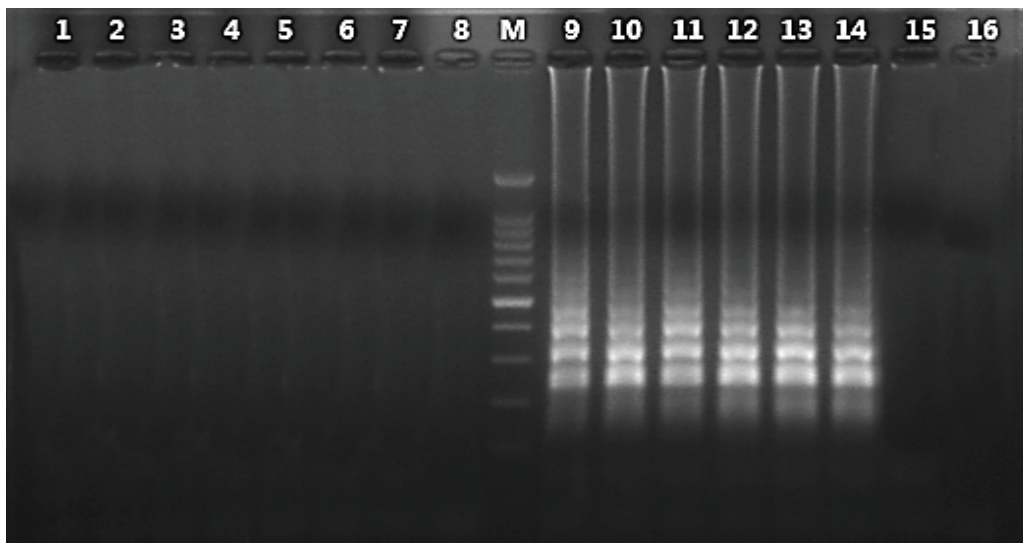


Hình 2: Phản ứng màu tại các mẫu chứng dương và âm.

A. Hình ảnh các ống trước phản ứng; B. Hình ảnh màu của các ống sau phản ứng: Mẫu dương có màu xanh nhạt, mẫu âm không màu.

Các nồng độ MG được khảo sát là 0,012%, 0,008%, 0,004% và 0,001%. Kết quả biểu diễn tại bảng 1, hình 2, cho thấy nồng độ MG 0,004% là nồng độ tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính.

* Kết quả khảo sát thời gian thực hiện phản ứng:



Hình 3: Sản phẩm LAMP sau thời gian phản ứng 40 phút (Làn 9 - 16) và 60 phút (Làn 1 - 8).

Khảo sát thời gian tối thiểu thực hiện phản ứng LAMP ở 40 và 60 phút, các thành phần phản ứng: DNA khuôn, mồi, đệm phản ứng, nồng độ Mg^{2+} 8 mM và các điều kiện khác giữ nguyên và đồng nhất, chỉ thay đổi thời gian thực hiện phản ứng. Do mong muốn giảm thiểu thời gian phản ứng nên trong nghiên cứu này, chúng tôi không tiến hành thực nghiệm ở các khoảng thời gian dài hơn 60 phút. Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để khuếch đại DNA trong phản ứng LAMP là 60 phút.

* Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ kit LAMP:

Bảng 4: Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ mồi LAMP.

Nồng độ (ng/μl)	Kết quả		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
10 ⁻⁶	(+)	(+)	(+)
10 ⁻⁷	(+)	(+)	(+)
10 ⁻⁸	(+)	(+)	(+)
10 ⁻⁹	(-)	(-)	(-)
10 ⁻¹⁰	(-)	(-)	(-)
10 ⁻¹¹	(-)	(-)	(-)
Neg1	(-)	(-)	(-)
Neg2	(-)	(-)	(-)

Kết quả cho thấy, ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ Kit là 10⁻⁸ ng/μL tương ứng với 2,82 x 10⁰. Thử nghiệm LOD95% của bộ mồi là 2,12 x 10⁰ số bản sao gen/μL (95%CI: 1,71 x 10⁰ bản sao gen/μL đến 2,89 x10⁰ bản sao gen/μL).

3. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit ở phòng thí nghiệm

Bảng 5: Kết quả so sánh kit ECHO-LAMP so với qPCR.

ECHO-LAMP chế tạo	qPCR		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	29	1	30
Âm tính	2	148	150
Tổng số	31	149	180

$$Pse = (29/(29+2))*100\% = 93,55\%, Psp = (148/(148+1)) * 100\% = 99,33\%$$

$$Po = 0,983 \text{ và } Pe = 0,719$$

$$Kappa = 0,94$$

Bảng 6: Kết quả so sánh kit ECHO-LAMP so bộ kit LAMP mồi của Salant và CS.

ECHO-LAMP chế tạo	LAMP-Salant và CS, 2012		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	29	1	30
Âm tính	2	49	51
Tổng số	31	50	81

$$Pse = (29/(29+2))*100\% = 93,55\%, Psp = (49/(49+1)) * 100\% = 98,00\%$$

$$Po = 0,963 \text{ và } Pe = 0,530$$

$$Kappa = 0,921$$

BÀN LUẬN

Tiêu chuẩn vàng cho việc phát hiện các trường hợp nhiễm *Echinococcus* sp. ở người là theo truyền thống dựa trên việc phát hiện hình thể ký sinh trùng đối với con trưởng thành đường tiêu hóa và/hoặc khi có các nang dạng bọc nước tại các mô, tạng đặc trong cơ thể. Các phương pháp phát hiện ký sinh trùng này thường không quá tốn công, phát hiện tốt nhưng bản chất là thủ thuật can thiệp xâm lấn có thể gây tổn thương khó hồi phục trên người. Hơn nữa, phương pháp kiểm tra đơn giản của kính hiển vi quang học dựa vào hình thể của ký sinh trùng không thể phân biệt hình thái giữa tất cả loại trứng, nang ấu trùng các loài thuộc họ Taenida [6]. Ngoài ra, các test chẩn đoán *Echinococcosis* không có sẵn trên thị trường. Phương pháp PCR có sẵn nhưng chi phí cao về trang thiết bị, hoá chất, con người và ít nhất 3 - 4 giờ để hoàn thành quá trình khuếch đại DNA và điện di phân tích trên gel agarose. Do đó, yêu cầu đối các bộ kit chẩn đoán đơn giản hơn, rẻ hơn nhưng độ nhạy, độ đặc hiệu cao và phương pháp phát hiện sàng lọc hàng loạt rất cần thiết, đặc biệt là ở các khu vực dịch tễ có tần suất đồng nhiễm *Echinococcus* với các loài sán dây khác (Zoonotic Taeniid). Phương pháp LAMP có thể được thực hiện nhanh trong vòng chưa đến 1 giờ dưới điều kiện đẳng nhiệt bằng cách sử dụng thiết bị ổn nhiệt đơn giản, chẳng hạn như nồi cách thủy hoặc máy gia nhiệt khối. Không cần gel agarose điện di để đánh giá trực quan kết quả thử nghiệm [6, 7, 8]. Các kết quả có thể được quan sát ngay sau phản ứng và kiểm tra đánh giá trực quan bằng cách

thêm màu xanh bằng MG vào hỗn hợp khuếch đại để phân biệt phản ứng LAMP dương tính với phản ứng âm tính.

* *Tối ưu hóa các điều kiện phản ứng ECHO-LAMP:*

- Nhiệt độ của phản ứng LAMP:

Nhiệt độ gắn mồi (Ta) là yếu tố quan trọng hàng đầu, quyết định tính chính xác cũng như hiệu quả khuếch đại của kỹ thuật PCR và các kỹ thuật khác được phát triển từ PCR. Một đặc trưng của LAMP là khuếch đại DNA hiệu quả trong điều kiện đẳng nhiệt, trong đó nhiệt độ phù hợp cho phản ứng có thể dao động từ 50 - 68°C. Trên cơ sở này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát nhiệt độ trong khoảng 60 - 65°C. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy, ở nhiệt độ 63°C sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất. Nhiệt độ 63°C được đánh giá là tạo điều kiện ủ mồi và tăng cường khả năng chịu đựng các chất ức chế thường được tìm thấy trong các mẫu chẩn đoán bệnh.

- Nồng độ MgSO₄:

Nồng độ MgSO₄ ảnh hưởng đến hiệu quả và tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Trong dung dịch đệm, quan trọng nhất là ion Mg²⁺ làm tăng nhiệt độ nóng chảy (T_m-melting temperature) của DNA mạch đôi, tạo ra phức chất tan với dNTPs để hình thành cơ chất mà enzyme polymerase có thể nhận ra, điều này rất cần thiết cho quá trình liên kết của các dNTPs. Trong phản ứng LAMP, nồng độ MgSO₄ thích hợp thường nằm trong khoảng 4 - 10 mM. Sau khảo sát, chúng tôi nhận thấy rằng, MgSO₄ ở nồng độ 4 mM không có sản phẩm khuếch đại, MgSO₄ ở nồng độ 6 mM cho sản phẩm không ổn định, hiệu suất không cao,

MgSO₄ ở nồng độ 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định. Do vậy, chúng tôi chọn MgSO₄ ở 8 mM là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP.

Chất chỉ thị màu sử dụng để đọc kết quả LAMP: Có nhiều nghiên cứu đã chứng minh kỹ thuật LAMP là một kỹ thuật có độ đặc hiệu cao, độ nhạy, thời gian phản ứng ngắn và cho phép phát hiện sản phẩm khuếch đại trực quan đơn giản bằng cách quan sát độ đục, bằng thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc thuốc nhuộm chỉ thị pH. Gần đây, chất chỉ thị màu MG đã được sử dụng thành công như một chất chỉ thị nhạy với pH để phát hiện các sản phẩm LAMP. Sự thay đổi màu sắc của MG (dạng cation) phụ thuộc vào pH của dung dịch (pH10: không màu). Bước sóng hấp thụ cho MG là 621 nm. Trong xét nghiệm LAMP-MG, các mẫu dương tính và âm tính dễ dàng được phân biệt bằng mắt thường là màu xanh nhạt và không màu, tương ứng (Hình 3).

Việc bổ sung MG vào đệm LAMP trước khi tiến hành phản ứng không ảnh hưởng đến hoạt động của Bst DNA polymerase, đồng thời loại bỏ nguy cơ tạp nhiễm giữa các mẫu. Ưu điểm của xét nghiệm LAMP-MG có thể cải thiện và khắc phục những hạn chế từ các phát hiện LAMP khác như đã đề cập ở trên. Các nồng độ MG được khảo sát là 0,012%, 0,008%, 0,004% và 0,001%. Kết quả cho thấy, có sự đồng nhất giữa 3 người quan sát và họ kết luận rằng nồng độ MG 0,004% là nồng độ tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính.

Nghiên cứu phát triển bộ kit ECHO-LAMP của chúng tôi có thể có tiềm năng lớn ở các nước đang phát triển, nơi các

bệnh lây truyền lưu hành và hiện đang còn khan hiếm trang thiết bị, chuyên gia kỹ thuật. Kỹ thuật LAMP đã đang được thiết lập thực hiện thí điểm các điểm kính hiển vi tại thực địa, cộng đồng cho chẩn đoán sốt rét, sán lá gan lớn, sán lá gan nhỏ thuộc đề tài cấp Nhà nước KC10/10. 16-20 [3].

* Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP:

Nhóm nghiên cứu của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng Côn trùng Trung ương đã phát triển bộ kit LAMP với bộ môi tự thiết kế trên dãy nồng độ pha loãng ADN tổng số, tách chiết từ mẫu mô sán lá gan lớn trưởng thành cho thấy ngưỡng phát hiện đạt 10 - 6 ng [1], hay với *Plasmodium falciparum* là 10 - 2 ng và *P. vivax* 10 - 3 ng [5]. Trong nghiên cứu này, ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP phát hiện ca nhiễm *Echinococcus* sp. là 10 - 8 ng/phản ứng, tương đương với 0,294 bản sao/phản ứng. Ngưỡng phát hiện này tương đương, thậm chí tốt hơn so với các nghiên cứu khác của các tác giả trên thế giới với ngưỡng phát hiện từ 10 - 3 [11] đến 10 - 5 ng [10]. Đồng thời, kỹ thuật LAMP cũng cho kết quả tốt với khả năng phát hiện ở ngưỡng rất thấp khi tiến hành trên các mẫu giả định.

* Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu bộ kit ECHO-LAMP:

Khi so sánh độ nhạy và độ đặc hiệu ECHO-LAMP chế tạo với bộ kit LAMP có cặp môi thiết kế bởi Salant và CS, 2012 [9] có độ nhạy 93,55%, độ đặc hiệu 98,00% với sự phù hợp cao (Kappa = 0,92 > 0,8). Kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu so với qPCR của bộ kit ECHO-LAMP có độ nhạy 93,55%, độ đặc hiệu 99,33% và sự phù

hợp cao ($Kappa = 0,94 > 0,8$). Như vậy, bộ kit ECHO-LAMP trong nghiên cứu có sự phù hợp cao với phương pháp PCR đối sánh. Kết quả này góp phần củng cố thêm dữ liệu về hiệu quả của LAMP trong chẩn đoán nhiễm *Echinococcus* là đạt mức tương đồng cao các phương pháp PCR [3]. Tác giả Xing-Wei Ni và CS (2014), nghiên cứu phát triển LAMP áp dụng vào chẩn đoán nhiễm *Echinococcus* trên chó tại Trung Quốc đã dùng phương pháp Real-time PCR làm phương pháp tham chiếu thì độ nhạy của LAMP so với PCR thông thường, xét nghiệm LAMP cung cấp độ đặc hiệu 88,8% và độ nhạy 100% [13]. Agathe Nkouawa và CS năm 2010, đã so sánh khả năng chẩn đoán LAMP với multiplex PCR để phát hiện phân biệt loài *Taenia* trong mẫu phân của bệnh nhân nhiễm sán dây. Phương pháp LAMP không có dương tính giả, cho thấy độ nhạy cao hơn (88,4%) so với multiplex PCR (37,2%) [14]. Do đó, phương pháp LAMP có giá trị cao trong chẩn đoán phân tử bệnh sán dây trên người.

Nghiên cứu này có một số hạn chế khi chưa có nhiều nghiên cứu ứng dụng LAMP cho chẩn đoán *Echinococcosis* trên người và mới được thực hiện tại phòng thí nghiệm nên chưa đánh giá đầy đủ tính ổn định của bộ sinh phẩm. Ở nghiên cứu này, chúng tôi mạnh dạn so sánh với kỹ thuật qPCR, bộ kit ECHO-LAMP và số liệu bước đầu cho thấy hiệu quả khả quan trong chẩn đoán bệnh *Echinococcus* trên người. Tuy nhiên, để ứng dụng trong lâm sàng, chúng tôi cần thử nghiệm và so sánh với cỡ mẫu lớn hơn, hướng đến ứng dụng rộng rãi trên cộng đồng.

KẾT LUẬN

Bộ mồi thiết kế trong nghiên cứu hoạt động tốt, có tính đặc hiệu cao với *Echinococcus* không có sự bắt cặp chéo với các loài sán khác. Phản ứng LAMP chế tạo có nồng độ MG 0,004% và $MgSO_4$ 8 mM, phản ứng khuếch đại gen mồi tại 63°C trong 60 phút. Kết quả phản ứng sau khi sử dụng bộ sinh phẩm ECHO-LAMP chế tạo có thể quan sát bằng mắt thường sau khi bổ sung chất chỉ thị màu MG. Ngưỡng phát hiện bộ kit là 10^{-8} ng/ μ L tương ứng với $2,82 \times 10^0$ bản sao gen/ μ L. Bộ kit ECHO-LAMP chế tạo có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (trên 93% và trên 98%). Bộ kit này cho phép ứng dụng kỹ thuật LAMP thuận tiện hơn, khả năng chính xác tương đương các kỹ thuật PCR khác và có triển vọng thể triển khai tại cơ sở y tế địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Nguyễn Thị Hương Bình, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Thị Thu Huyền, Trần Văn Hải, Trần Thanh Dương. Phát triển kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan lớn *Fasciola* spp. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam 2020; 62(7):23-28.
2. Nguyễn Thị Hương Bình. Báo cáo Tổng kết nhiệm vụ khoa học thường quy: Ứng dụng và phát triển kỹ thuật LAMP để định loại *P. falciparum* và *P.vivax* tại phòng thí nghiệm, năm 2015.
3. Trần Thanh Dương và CS. Nghiên cứu chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét, sán lá gan lớn, sán lá gan nhỏ, giun lươn đường ruột tại thực địa", mã số KC.10.16/16-20. Bộ Khoa học và Công nghệ <https://most.gov.vn/vn/tin-tuc/18760/thong-tin-ve-ket-qua-thuc-hien-nhiem-vu-cap-quoc-gia->

nguyen-cuu-che-tao-bo-kit-lamp-chan-doan-ky-sinh-trung-sot-ret-san-la-gan.aspx cập nhật ngày 13/11/2020.

4. Anh Đào Nguyễn Thị, Nguyễn Đỗ Phúc, Hoàng Hoài Phương, Lê Thị Hiên. Ứng dụng kỹ thuật LAMP để phát hiện *Listeria monocytogenes* trong thực phẩm. Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh. 2012; 16(3):27-32.

5. Hong Ngoc NT, Huong Binh NT, Hong NV, Thang ND, Huong NT, et al. In-house validation of a lamp Kit for diagnosis of Plasmodium, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in Vietnam. Glob J Infect Dis Clin Res 2020; 6(1):048-053. DOI: <https://doi.org/10.17352/2455-5363.000035>.

6. Mcmanus DP, Zhang W, Li J, et al. *Echinococcosis*. Lancet. 2003; 362:1295-1304.

7. Aboelhadida M., Khaled M. El-D., Tokuma Y., et al Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Egyptian donkeys Veterinary Parasitology 2013; 193:292-296.

8. Adwan G., Kamel A., Sami B., Sameh A., Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* isolated from sheep in Palestine Experimental Parasitology 2013; 134:195-199.

9. Ali TI. Ibrahim OEm, Al-sultan II. Hydatid hepatic-broncho-pleural (hepato-pulmonary) fistula caused by *Echinococcus granulosus*: A zoonotic case report. Malaysian Journal of Veterinary Research 2018; 9:91-97.

10. Avcioglu H., Esin G., Ibrahim B., et al. First Molecular Characterization of *Echinococcus multilocularis* in Turkey Vector-borne and zoonotic diseases 2016; 20(20) Mary Ann Liebert, Inc. Doi: 10.1089/vbz. 2016. 1983

11. Cruz M.L., Perez A., Domínguez M., et al. Assessment of the sensitivity and specificity of serological (IFAT) and molecular (direct-PCR) techniques for diagnosis of leishmaniasis in lagomorphs using a Bayesian approach. Veterinary Medicine and Science 2016; 2(3):211-220.

12. Harold Salant, Ibrahim Abbasi, and Joseph Hamburger. The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* coprodetction Am. J. Trop. Med. Hyg 2012; 87(5):883-887 doi:10.4269/ajtmh 2012.12-0184.

13. Xing-Wei Ni, Donald P. McManus et al. A comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with other surveillance tools for echinococcus granulosus diagnosis in canine definitive hosts PLUS ONE Published: July 9, 2014 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100877>.

14. Agathe Nkouawa, Yasuhito Sako, et al., Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of taenia species from humans. Journal of Clinical Microbiology, Sept 2010; 3350-3352 Vol. 48, No. 90095-1137 doi:10.1128/JCM.00697-10 Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.