

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SÓT RẾT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

BỘ Y TẾ

-----*

TRẦN THỊ KIM CHI

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO BỘ KIT LAMP CHÂN
ĐOÁN NHIỄM GIUN LƯƠN ĐƯỜNG RUỘT
(*Strongyloides stercoralis*) Ở NGƯỜI

2017-2020

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Hà Nội – Năm 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
VIỆN SÓT RÉT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

TRẦN THỊ KIM CHI

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO BỘ KIT LAMP CHÂN
ĐOÁN NHIỄM GIUN LƯƠN ĐƯỜNG RUỘT
(*Strongyloides stercoralis*) Ở NGƯỜI**

2017-2020

Chuyên ngành: Ký sinh trùng y học

Mã số: 62 72 01 16

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Cán bộ hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. TRẦN XUÂN MAI

PGS.TS. NGUYỄN THỊ HƯƠNG BÌNH

Hà Nội – Năm 2021

LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thành luận án này, tôi đã được PGS.TS. Trần Xuân Mai và PGS.TS. Nguyễn Thị Hương Bình nhiệt tình hướng dẫn, chỉnh sửa và giúp đỡ trong suốt thời gian qua. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến hai quý thầy cô hướng dẫn của mình.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Trần Thanh Dương Viện trưởng Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương đã luôn động viên, tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành quá trình học. Thầy cũng là chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước “*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. Một lần nữa tôi xin được cảm ơn thầy cùng các thành viên trong đề tài này đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài nghiên cứu.

Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ, nhắc nhở và động viên của PGS. TS. Cao Bá Lợi cùng toàn thể cán bộ Phòng Khoa học – Đào tạo Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương để tôi có thể từng bước hoàn thành luận án của mình trong thời gian cho phép.

Ngoài ra tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến các thầy đã tham gia các hội đồng đánh giá kết quả nghiên cứu và luận án các cấp của tôi. Các thầy đã có rất nhiều đóng góp quý báu, chỉ dẫn giúp tôi hoàn thiện luận án của mình tốt hơn như thầy PGS. TS. Lê Xuân Hùng, PGS. TS. Nguyễn Mạnh Hùng, PGS. TS. Nguyễn Quang Thiệu, PGS. TS. Đoàn Huy Hậu, PGS. TS. Nguyễn Khắc Lực, GS. TS. Nguyễn Văn Ba, TS. Nguyễn Thị Hồng Ngọc, TS. Đỗ Trung Dũng, TS. Đỗ Ngọc Ánh, TS. Đỗ Như Bình và TS. Trương Văn Hạnh.

Tôi xin cảm ơn Khoa Sinh học phân tử, Khoa Ký sinh trùng của Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương; Bộ môn Vi sinh – Ký sinh – khoa Y – Đại học Y Dược TP.Hồ Chí Minh, Bộ môn Ký sinh trùng, trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch và Trung tâm y tế huyện và các xã của huyện Đức Hòa, tỉnh Long An đã giúp tôi trong suốt quá trình thu thập mẫu và thực hiện đề tài nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn vô hạn đến bố, mẹ, chồng, các con, các anh chị em trong gia đình và bạn bè, đồng nghiệp đã không ngừng động viên, khích lệ, tạo mọi điều kiện giúp tôi vượt qua khó khăn để hoàn thành luận án.

Luận án là bước khởi đầu trong sự nghiệp khoa học của mình, vì vậy những lời cảm ơn này chưa đủ để nói hết những tình cảm thật đáng quý của tất cả mọi người đã bên tôi và giúp đỡ tôi. Tôi sẽ mang theo những tình cảm này trong suốt hành trang cuộc đời mình.

Trần Thị Kim Chi

Luận án này là một nhánh của đề tài cấp nhà nước “*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. mà tôi là một thành viên tham gia.

Tôi xin cam đoan đây các kết quả, số liệu thu được trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ luận án nào khác.

Các bước tiến hành thực hiện đề tài đúng như đề cương nghiên cứu, chấp hành đầy đủ các quy định khi tiến hành nghiên cứu.

Nếu có sai sót, tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Hà Nội, ngày tháng năm 2021

Tác giả

Trần Thị Kim Chi

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Danh mục các từ viết tắt tiếng Việt:

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ADN	Acid Deoxy Ribonucleic	
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải
AT		Ấu trùng
ATGL		Ấu trùng giun lươn
bp	Base pair	Cặp bazơ nitơ
BYT		Bộ Y Tế
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật
cox1	Cytochrome c oxidase subunit 1	Tiểu đơn vị 1 enzym Cytochrom C oxidaza
CS		Cộng sự
ĐHYK		Đại học y khoa
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết Enzyme
GL		Giun lươn
HIV	Human Immunodeficiency Virus	
HTLV-1	Human T-Cell Lymphotropic Virus-1	
IgG	Immunoglobulin G	
IgM	Immunoglobulin M	
K	Kappa	Hệ số Kappa

KHV		Kính hiển vi
KST		Kỹ sinh trùng
KT		Kích thước
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification	Khuếch đại đẳng nhiệt vòng trung gian
LIPA	Luciferase Immunoprecipitation System	Hệ thống kết tủa miễn dịch Luciferase
LIPS	Luciferase Immunoprecipitation Assay	Xét nghiệm kết tủa miễn dịch Luciferase
MG	Malachite Green	Xanh malachit
Multiplex PCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction	PCR đa môi
nested PCR	Nested Polymerase Chain Reaction	PCR lồng
NPV	Negative Predictive Value	Giá trị tiên đoán âm
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
PPV	Positive Predictive Value	Giá trị tiên đoán dương
RNA	Ribonucleic Acid	
Se	Sensitivity	Độ nhạy
SHPT		Sinh học phân tử
Sp	Specificity	Độ đặc hiệu
Tp.HCM		Thành phố Hồ Chí Minh
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1 Lịch sử phát hiện, nghiên cứu giun lươn <i>Strongyloides stercoralis</i>	3
1.2 Đặc điểm sinh học, bệnh học của giun lươn <i>S. stercoralis</i>	4
1.2.1 Hình thái học.....	4
1.2.2 Chu kỳ phát triển.....	6
1.2.3 Triệu chứng của bệnh giun lươn	8
1.3 Chẩn đoán và điều trị bệnh giun lươn.....	9
1.3.1 Định nghĩa ca bệnh do giun lươn <i>Strongyloides stercoralis</i>	9
1.3.2 Các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán nhiễm giun lươn.....	10
1.3.3 Điều trị bệnh giun lươn.....	16
1.4 Tình hình nhiễm giun lươn.....	17
1.4.1 Tình hình nhiễm giun lươn trên thế giới	17
1.4.2 Tình hình nhiễm giun lươn tại Việt Nam.....	19
1.5 Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng LAMP	20
1.5.1 Lịch sử phát triển LAMP.....	20
1.5.2 Nguyên lý của kỹ thuật LAMP	21
1.5.3 Ưu, nhược điểm của kỹ thuật LAMP.....	25
1.5.4 Một số ứng dụng của kỹ thuật LAMP trong chẩn đoán bệnh ở người	25
1.6 Nghiên cứu xây dựng và chuẩn hóa bộ kit LAMP chẩn đoán tác nhân gây bệnh.....	27
1.6.1 Thiết kế môi cho phản ứng LAMP	28
1.6.2 Chuẩn hóa các điều kiện của phản ứng LAMP	29

1.6.3	Xác định ngưỡng phát hiện, xây dựng chuẩn dương của kỹ thuật.....	29
1.6.4	Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit LAMP.....	30
1.6.5	Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit.....	33
Chương 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....		34
2.1	Mục tiêu 1: Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột <i>Strongyloides stercoralis</i> ở người.....	34
2.1.1	Đối tượng nghiên cứu.....	34
2.1.2	Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	34
2.1.3	Thiết kế nghiên cứu.....	34
2.1.4	Nội dung nghiên cứu.....	35
2.1.5	Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu.....	40
2.1.6	Các chỉ số đánh giá.....	41
2.2	Mục tiêu 2: Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa.....	41
2.2.1	Đối tượng nghiên cứu.....	41
2.2.2	Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	42
2.2.3	Thiết kế nghiên cứu.....	42
2.2.4	Nội dung nghiên cứu.....	45
2.2.5	Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu.....	48
2.2.6	Các chỉ số đánh giá.....	49
2.2.7	Xử lý số liệu.....	49
2.3	Kiểm soát sai số.....	51
2.4	Đạo đức trong nghiên cứu.....	51
Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....		53
3.1	Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột <i>Strongyloides stercoralis</i> ở người.....	53
3.1.1	Kết quả thiết kế môi.....	53
3.1.2	Kết quả xác định các điều kiện phản ứng LAMP với bộ môi tự thiết kế.....	59
3.1.3	Ngưỡng phát hiện của bộ kit LAMP.....	64

3.1.4	Kết quả xây dựng chứng dương.....	68
3.1.5	Kết quả chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm <i>S. stercoralis</i>	70
3.2	Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa	73
3.2.1	Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP tại phòng thí nghiệm..	73
3.2.2	Điều kiện bảo quản và độ ổn định của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột.....	75
3.2.3	Đánh giá bộ kit tại thực địa, so sánh bộ kit với bộ môi Pedro và với hai phương pháp chẩn đoán giun lươn thường dùng.....	80
3.2.4	Kiểm định tiêu chuẩn cơ sở bộ kit.....	86
Chương 4 BÀN LUẬN		87
4.1	Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột <i>Strongyloides stercoralis</i> ở người	87
4.1.1	Kết quả thiết kế môi.....	87
4.1.2	Kết quả xác định các điều kiện phản ứng LAMP với bộ môi tự thiết kế	90
4.1.3	Ngưỡng phát hiện của bộ kit	95
4.1.4	Kết quả xây dựng chứng dương.....	96
4.1.5	Kết quả chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm <i>S. stercoralis</i>	97
4.2	Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa	97
4.2.1	Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP tại phòng thí nghiệm..	97
4.2.2	Điều kiện bảo quản và độ ổn định của bộ kit.....	98
4.2.3	Đánh giá bộ kit tại thực địa, so sánh bộ kit với bộ môi Pedro và với hai phương pháp chẩn đoán giun lươn thường dùng	100
4.2.4	Đăng ký kiểm định tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit.....	109
KẾT LUẬN.....		110
5.1.	Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột <i>Strongyloides stercoralis</i> ở người	110

5.2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa	111
KIẾN NGHỊ.....	112
DANH MỤC CÁC BÀI BÁO LIÊN QUAN TRỰC TIẾP ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1 Yêu cầu khoảng cách giữa các môi [108]	36
Bảng 2.2 Yêu cầu nhiệt độ nóng chảy (Tm) của từng môi	36
Bảng 2.3 Thành phần phản ứng LAMP	37
Bảng 2.4: Các điều kiện cần tối ưu hóa	37
Bảng 2.5 Bảng tính độ nhạy, độ đặc hiệu	50
Bảng 3.1 Trình tự môi LAMP thiết kế để chẩn đoán giun lươn đường ruột ..	55
Bảng 3.2 Vị trí của các môi được thiết kế	55
Bảng 3.3 Khoảng cách giữa các môi được thiết kế	56
Bảng 3.4 Nhiệt độ nóng chảy và khả năng tạo bắt cặp dimer môi (dG <- 2,34) của bộ môi xác định giun lươn đường ruột	56
Bảng 3.5 Kết quả đánh giá tính đặc hiệu của cặp môi	59
Bảng 3.6 Báo cáo quan sát chất chỉ thị màu MG ở các nồng độ khác nhau trong thử nghiệm LAMP	63
Bảng 3.7 Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ môi LAMP	65
Bảng 3.8 Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ kit chẩn đoán giun lươn đường ruột	67
Bảng 3.9 Thành phần của bộ kit	71
Bảng 3.10 Tóm lược kết quả xét nghiệm mẫu phân chẩn đoán GLĐR bằng các phương pháp soi phân trực tiếp và real-time PCR	73
Bảng 3.11 Tóm lược kết quả xét nghiệm mẫu phân chẩn đoán GLĐR bằng các phương pháp soi phân trực tiếp và LAMP.	74
Bảng 3.12 Kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột	75
Bảng 3.13 Kết quả khảo sát độ ổn định của bộ Kit sau 6 tháng bảo quản	76
Bảng 3.14 Kết quả khảo sát độ ổn định sau 4 lần làm tan và đông đá.	77
Bảng 3.15 Kết quả khảo sát độ ổn định của bộ Kit sau 12 tháng bảo quản. ..	79
Bảng 3.16 Nội dung hoạt động tập huấn và đánh giá kit tại thực địa	80

Bảng 3.17 Kết quả tầm soát giun lươn tại thực địa của 3 phương pháp.....	81
Bảng 3.18 Kết quả chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột tại thực địa của qPCR và LAMP.....	81
Bảng 3.19 Kết quả đánh giá độ phù hợp giữa bộ kit LAMP trong nghiên cứu và Bộ môi Perdro	82
Bảng 3.20 Tóm lược kết quả chẩn đoán nhiễm giun lươn tại khoa Khám bệnh chuyên ngành bằng 3 phương pháp.....	84
Bảng 3.21 Kết quả đánh giá độ phù hợp giữa bộ kit LAMP trong nghiên cứu và soi phân trực tiếp.....	84
Bảng 3.22 Kết quả đánh giá độ phù hợp giữa bộ kit LAMP trong nghiên cứu và phương pháp ELISA	85
Bảng 3.23 Tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột <i>Strongyloides stercoralis</i>	86

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Trứng giun lươn [76] KT 40x30 μm	5
Hình 1.2: Phần đầu của AT thực quản ụ phình cho thấy ụ quản phình (mũi tên xanh), xoang miệng ngắn (mũi tên đỏ) [39] KT 350 x 20 μm ...	5
Hình 1.3: AT thực quản hình ống, có đuôi chẻ (mũi tên đỏ) [39] Chiều dài 500 - 700 μm	5
Hình 1.4: Giun lươn cái trưởng thành, có hàng trứng bên trong [39] KT 2–2,5 mm x 50 μm	5
Hình 1.5: Chu kỳ phát triển của giun lươn [39] (nguồn CDC có Việt hóa) Giun lươn có những đặc điểm sinh học cần lưu ý như sau:	7
Hình 1.6: Các vị trí thiết kế các môi LAMP [108]	22
Hình 1.7: Sơ đồ phản ứng tạo vật liệu khởi đầu [117]	23
Hình 1.8: Tái bản và kéo dài chuỗi ADN [108]	24
Hình 3.1. Kết quả giống hàng của 30 trình tự giun lươn đường ruột trên phần mềm MEGA 7.	53
Hình 3.2 Phần mềm Primer Explorer V5 để thiết kế môi LAMP	54
Hình 3.3 Bộ môi được thiết kế từ phần mềm Primer Explorer V5	54
Hình 3.4: Kết quả khảo nghiệm tính đặc hiệu trên ngân hàng gen	57
Hình 3.5: Sản phẩm PCR sử dụng cặp môi F3-B3 của <i>Strongyloides stercoralis</i>	58
Hình 3.6 Sản phẩm LAMP khảo sát ở dải nhiệt độ 60 ⁰ C – 65 ⁰ C	60
Hình 3.7.A: Sản phẩm LAMP ở nồng độ 8mM (Làn 1-8) và 6mM (Làn 10-16).	61
Hình 3.7.B: Sản phẩm LAMP ở nồng độ 4mM	61
Hình 3.8 Sản phẩm LAMP sau thời gian phản ứng 40 phút (Làn 1-8) và 60 phút (Làn 9-16)	62
Hình 3.9.A: Hình ảnh các ống trước phản ứng.	62

Hình 3.9.B: Hình ảnh màu của các ống sau phản ứng: Mẫu dương có màu xanh nhạt; mẫu âm không màu	62
Hình 3.10 Kết quả khảo sát nồng độ MG để đọc kết quả LAMP	63
Hình 3.11. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ môi LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột.	66
Hình 3.12. Đồ thị biểu diễn LOD 95% của bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR. 68	
Hình 3.13. Sản phẩm PCR chứa trình tự gen đích <i>Strongyloides stercoralis</i> . 68	
Hình 3.14. Plasmid tái tổ hợp mang gen 18S rRNA của giun lươn đường ruột.	69
Hình 3.15 Hình ảnh bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột.	71
Hình 3.16 Kết quả real-time PCR.....	74
Hình 3.17A. Kết quả khảo sát tính ổn định của bộ kit sau 1 tháng bảo quản quan sát dựa vào chỉ thị màu.....	77
Hình 3.17B. Kết quả khảo sát tính ổn định của bộ kit sau 6 tháng bảo quản quan sát dựa vào chỉ thị màu.....	77
Hình 3.18 Hình ảnh điện di sản phẩm LAMP sau 1 tháng và 6 tháng bảo quản.....	77
Hình 3.19 Kết quả khảo sát tính ổn định của bộ kit sau 12 tháng bảo quản...	79

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh giun lươn (*Strongyloidiasis*) là bệnh nhiễm ký sinh trùng đường ruột mạn tính ở người do giun *Strongyloides* spp. gây ra. Tỷ lệ lưu hành phần lớn chưa được xác định nhưng ước tính có khoảng 30 – 100 triệu người nhiễm [28], [39]. Khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam là vùng dịch tễ lưu hành của bệnh [99].

Người bị nhiễm giun lươn có thể biểu hiện từ không có triệu chứng đến triệu chứng không đặc hiệu của bệnh dạ dày tá tràng [16]. Vấn đề chẩn đoán chính xác ca bệnh gặp nhiều khó khăn và dễ bị bỏ sót [29], [85]. Nếu bệnh nhân không được phát hiện sớm, giun lươn có thể gây những tổn thương ở ruột rất khó hồi phục, cũng như ở nhiều cơ quan khác với các mức độ nặng khác nhau. Ngoài ra, những bệnh nhân cơ địa đặc biệt có nguy cơ mắc hội chứng tăng nhiễm giun lươn hay bệnh giun lươn lan tỏa với tỷ lệ tử vong cao [39], [84]. Vì vậy việc chẩn đoán nhiễm giun lươn là rất cần thiết.

Việc ứng dụng các phương pháp chẩn đoán giun lươn hiện nay vẫn tồn tại nhiều thách thức [29]. Soi phân tìm ấu trùng là phương pháp xét nghiệm chẩn đoán nhiễm giun lươn thường được sử dụng nhiều nhất nhưng lại có độ nhạy rất thấp [31], [39]. Một phương pháp chẩn đoán khác cũng được sử dụng rộng rãi là tìm kháng thể giun lươn trong huyết thanh. Phương pháp này có độ nhạy cao nhưng có độ đặc hiệu thấp [39]. Phương pháp Baermann, cấy phân trên đĩa thạch hay nuôi cấy từ giấy lọc (Harada- Mori) giúp tăng khả năng phát hiện ấu trùng giun lươn trong phân nhưng có nhược điểm là: cần lượng phân nhiều, dụng cụ chuyên biệt, tốn nhân lực và thời gian, vì vậy không được sử dụng thường quy [16], [26], [39].

Việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán các tác nhân sinh học gây bệnh là một xu thế. Phương pháp PCR, real-time PCR có độ chính xác cao nhưng gặp nhiều khó khăn khi áp dụng tại thực địa do cần có quy trình kỹ thuật phức tạp, máy móc hiện đại và điều kiện nhiệt độ quy chuẩn, phù hợp với những trung tâm y học lớn. Các phương pháp khuếch đại ADN đẳng nhiệt (trong đó thường dùng nhất là kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian - Loop-mediated Isothermal Amplification LAMP) không có các bước luân nhiệt nên chỉ cần các thiết bị xét nghiệm đơn giản, nhỏ gọn; kết quả xét nghiệm có thể quan sát bằng mắt thường; thời gian xét nghiệm nhanh mà vẫn đạt được độ nhạy và đặc hiệu cao gần bằng với PCR. Vì vậy việc dùng LAMP với vai trò là một kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán tác nhân gây bệnh tại thực địa hay với mục tiêu tầm soát trên diện rộng là khả thi.

Hiện nay, tại Việt Nam cũng như trên thế giới chưa có bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột nào được thương mại hóa. Trong khi đó, Việt Nam có đủ điều kiện, cơ sở và nhu cầu thực tiễn để tiến hành nghiên cứu, phát triển ứng dụng kỹ thuật LAMP trong chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột, giúp khắc phục được nhiều tồn tại của các phương pháp chẩn đoán khác và có thể áp dụng rộng rãi tại thực địa. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài “*Nghiên cứu chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột (Strongyloides stercoralis) ở người 2017-2020*” với các mục tiêu:

1. Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở người.
2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Lịch sử phát hiện, nghiên cứu giun lươn *Strongyloides stercoralis*

Strongyloides stercoralis được Normand phát hiện lần đầu tiên năm 1876 trong những mẫu phân tiêu chảy của lính Pháp đã từng ở Việt Nam, Bavay đã đặt tên *Stercoralis* với ý nghĩa sinh vật tìm thấy “trong phân” [46], [76]. Grassi (1879), Perroncito (1880), Leuckart (1882) đã chứng minh có 2 dạng tồn tại của *S. stercoralis* ở trong ruột và phân [46]. Askanazy (1900) đã cung cấp bằng chứng *S. stercoralis* ký sinh ở dưới lớp nhày ruột [46]. Looss (1905) và Fulleborn (1914) đã chứng minh ấu trùng (AT) thực quản hình ống lây nhiễm có trong đất, chui qua da người và sau đó chu du đến phổi giống như giun móc [46]. Fulleborn (1926), Nishigori (1928), Faust (1932-1940), Hartz (1946) đã phát hiện *S. stercoralis* còn có chu kỳ tự nhiễm do AT thực quản ủ phình chui qua da quanh hậu môn [46].

Giống *Strongyloides* có khoảng 50 loài ký sinh ở đường tiêu hóa của động vật có xương sống. Trong đó có 2 loài được xác định là gây bệnh ở người, chủ yếu là *S. stercoralis* và hiếm gặp hơn là *S. fuelleborni* [39]. Vật chủ chính của *S. stercoralis* là người, trong khi vật chủ chính của *S. fuelleborni* là khỉ. *S. fuelleborni* đã được tìm thấy rải rác ở các quốc gia Châu Phi và Papua New Guinea [15]. Một số loài khác như: *S. procyonic* (ký sinh ở gấu trúc), *S. myopotami* và *S. ratti* (ký sinh ở chuột và loài gặm nhấm) được xem là các bệnh ký sinh trùng (KST) lây từ động vật sang người [7].

Phân loại khoa học của giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis*

Giới (Kingdom): *Animalia*

Ngành (Phylum): *Nematoda*

Lớp (Class): *Secernentea*

Bộ (Order): *Rhabditida*

Họ (Familia): *Strongyloididae*

Giống (Genus): *Strongyloides*

Loài (Species): *Strongyloides stercoralis*

1.2 Đặc điểm sinh học, bệnh học của giun lươn *S. stercoralis*

Giun lươn (GL) *S. stercoralis* là một trong những loại giun tròn ký sinh ở người và có chu kỳ phát triển phức tạp nhất, nó có chu kỳ tự nhiễm trong cơ thể vật chủ đồng thời cũng có chu kỳ tự do ngoài vật chủ. Khi ở trong cơ thể vật chủ ấu trùng giun lươn (ATGL) có sự di chuyển ngẫu nhiên qua các mô. Vì vậy vật chủ có thể bị nhiễm GL suốt đời, bệnh cảnh nặng trong trường hợp tăng nhiễm GL hay nhiễm GL lan tỏa [33].



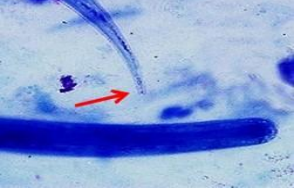

1.2.1 Hình thái học

Giun lươn có 2 giai đoạn: sống ký sinh trong cơ thể người và sống tự do ở ngoại cảnh. Hình thể giun cũng khác nhau tùy theo giai đoạn ký sinh hay không ký sinh [13], [16], [76].

Đặc điểm hình thái và sinh học của GL ký sinh được một số tác giả miêu tả như sau: Miệng có 2 môi, vỏ thân có khía ngang, nông. Kích thước (KT) nhỏ 2–2,5 mm x 50 µm, ký sinh ở trong niêm mạc ruột non. Người ta chưa tìm thấy giun đực ký sinh, giun cái có thể đẻ trứng mà không cần thụ tinh (hiện tượng trinh sản). Một con GL cái trưởng thành đẻ tối đa 40 trứng mỗi ngày. Trứng GL hình bầu dục, vỏ mỏng trong suốt giống trứng giun móc, trứng mới đẻ đã có sẵn AT bên trong. Trứng nở ngay ở trong niêm mạc ruột non tại các khe tuyến Lieberkühn [16], [76], vì vậy rất hiếm khi thấy được

trứng GL. Trứng GL chỉ có thể thấy trong phân trong những trường hợp tăng nhiễm GL hoặc qua sinh thiết phế quản, phế nang trong nhiễm GL lan tỏa.

ATGL trải qua 2 dạng: AT có thực quản ụ phình (nở từ trứng, xoang bao miệng ngắn, đuôi nhọn, thực quản có eo thắt nên có đoạn phình tròn) có KT 350 x 20 µm và AT có thực quản hình ống (phát triển từ AT thực quản ụ phình, kích thước thay đổi tùy theo giai đoạn phát triển, thực quản có dạng hình ống dài từ ½ - 1/3 chiều dài toàn thân, đuôi AT chẻ làm hai) [13], [16], [76].

	
<p>Hình 1.1: Trứng giun lươn [76] KT 40x30 µm</p>	<p>Hình 1.2: Phần đầu của AT thực quản ụ phình cho thấy ụ quản phình (mũi tên xanh), xoang miệng ngắn (mũi tên đỏ) [39] KT 350 x 20 µm</p>
	
<p>Hình 1.3: AT thực quản hình ống, có đuôi chẻ (mũi tên đỏ) [39] Chiều dài 500 - 700 µm</p>	<p>Hình 1.4: Giun lươn cái trưởng thành, có hàng trứng bên trong [39] KT 2–2,5 mm x 50 µm</p>

1.2.2 Chu kỳ phát triển

Có 2 chu kỳ phát triển mà các AT này có thể trải qua [7], [13], [16].

- **Chu kỳ gián tiếp (chu kỳ sống tự do):**

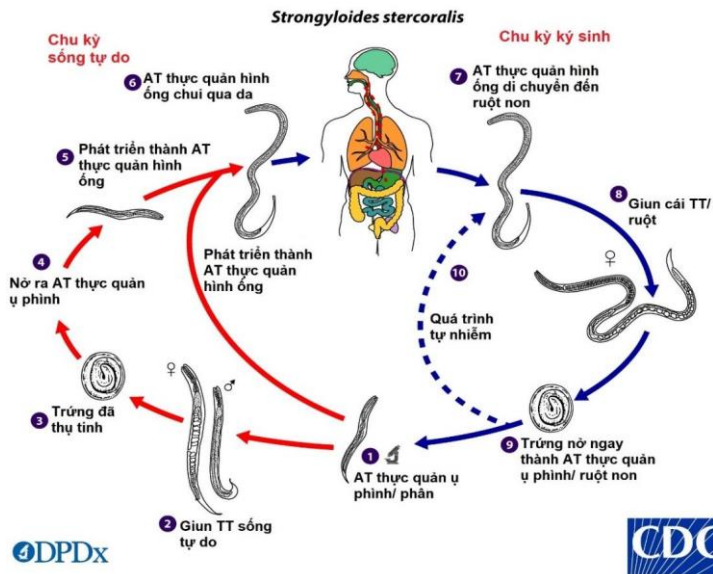
AT thực quản ụ phình ra ngoài theo phân, AT có thể phát triển trực tiếp thành AT giai đoạn nhiễm (L3) để xâm nhập qua da người hoặc lột xác 4 lần thành giun đực và cái trưởng thành. Chúng giao phối, giun cái đẻ trứng và nở thành AT thực quản ụ phình mới. Giun trưởng thành trong môi trường tự do chỉ sống được 2 – 4 ngày. Trứng sẽ phát triển thành AT trong tử cung và thoát khỏi cơ thể giun mẹ đang phân rã. Những AT thực quản ụ phình này ăn vi khuẩn trong đất, lột xác và phát triển thành AT giai đoạn 3 có thực quản hình ống, chờ ký sinh vào vật chủ thích hợp. Các AT tự do này tồn tại tối đa 3 tuần ở điều kiện lý tưởng độ ẩm cao và nhiệt độ 20 – 28°C, nếu không tìm vật chủ, chúng sẽ chết mà không thể phát triển thành giun trưởng thành.

- **Chu kỳ trực tiếp (chu kỳ ký sinh):**

Người bị nhiễm giun lươn khi AT thực quản hình ống có nguồn gốc từ giun sống tự do hoặc AT giai đoạn 3 thải trong phân chui lại qua da. Sau khi chui qua da, AT di chuyển vào máu và theo mạch máu đi đến tim, phổi rồi đến khí quản, hầu họng, thực quản và bị nuốt vào ruột non. Sau 14 - 21 ngày, những AT mới có thể được tìm thấy trong phân. Trong trường hợp tự nhiễm nhất là trên các đối tượng suy giảm miễn dịch, rất nhiều ATGL tích tụ trong ruột. Vì vậy GL được xem là một tác nhân bệnh cơ hội [16], [76], [91].

Trong một số điều kiện nhất định, xảy ra quá trình tự nhiễm như sau: tại ruột, những AT thực quản ụ phình lột xác thành AT giai đoạn 2 nhưng vẫn có thực quản dạng ụ phình và lột xác thêm một lần nữa thành AT giai đoạn 3 có thực quản hình ống, có tính tự nhiễm, không rời khỏi vật chủ (tiếp tục ở trong ruột hoặc chui qua da quanh hậu môn). Chúng phát triển thành GL cái trưởng thành, tiếp tục sinh sản. Bằng cách này, GL có thể duy trì trong vật chủ nhiều

thập niên (có trường hợp lên đến 65 năm), tồn tại độc lập với môi trường bên ngoài.



Hình 1.5: Chu kỳ phát triển của giun lươn [39] (nguồn CDC có Việt hóa)

Giun lươn có những đặc điểm sinh học cần lưu ý như sau:

- Giun lươn ký sinh ở ruột non, đẻ ra trứng số lượng mỗi ngày rất ít, trứng nhanh chóng nở ra thành AT ngay tại ruột non. Vì vậy số lượng AT theo phân ra ngoài thấp và không liên tục làm cho xét nghiệm phân tìm ATGL có độ nhạy thấp, đặc biệt là các trường hợp nhiễm mạn tính.
- Trong chu kỳ phát triển của GL có quá trình tự nhiễm là cơ hội cho các bệnh cảnh lâm sàng như hội chứng tăng nhiễm GL và bệnh GL lan tỏa [99], [113]. Quá trình này chưa được chú trọng đúng mức trong việc phòng chống với nguồn bệnh là người bệnh, mà hiện nay chủ yếu mới chú trọng đến phòng chống lây nhiễm từ môi trường.

1.2.3 Triệu chứng của bệnh giun lươn

Hai đặc điểm sinh học quan trọng của GL ảnh hưởng đến lâm sàng là: Có khả năng tự nhiễm và duy trì quá trình nhiễm dai dẳng [33]. Bệnh do GL có thời gian ủ bệnh khoảng 1 tháng, đa số các trường hợp nhiễm ở vùng dịch tễ thường không có triệu chứng hoặc triệu chứng mơ hồ [16]. Hai thể bệnh chính của bệnh giun lươn là [3]:

- **Thể bệnh thông thường:** Bệnh nhân có biểu hiện các triệu chứng:

+ **Đau bụng:** thường đau ở vùng thượng vị, đầy bụng sau ăn, ợ nóng và có các đợt tiêu chảy ngắn không liên tục.

Tác giả Trần Thị Kim Dung ghi nhận 18/22 (81,82%) trường hợp bệnh tìm thấy ấu trùng GL tại dạ dày có triệu chứng đau thượng vị [5]. Các triệu chứng trên cũng được ghi nhận và mô tả trong các nghiên cứu khác của Trần Phú Mạnh Siêu, Huỳnh Hồng Quang [18], [19].

+ **Rối loạn tiêu hoá:** Tiêu chảy là triệu chứng thường gặp nhất, mỗi ngày đi 5-7 lần, phân lỏng, nhầy, nhiều nước, có thể kéo dài trên 2 tuần. Đôi khi có táo bón, xuất huyết tiêu hóa.

+ **Ngứa, nổi mẩn, nổi mề đay:** Kéo dài, rải rác toàn thân. Phát ban hoặc nổi mề đay có thể lặp lại dọc theo móng, đáy chậu và đùi do quá trình tự nhiễm lặp đi lặp lại. Phát ban, mề đay do ATGL di chuyển có tốc độ 10cm/giờ. Có tới 75% những người mắc bệnh GL mạn tính có tăng bạch cầu ái toan nhẹ hoặc tăng nồng độ IgE [39].

+ Ngoài ra có thể có các triệu chứng giống như nhiễm các loại giun tròn khác: Mệt mỏi, biếng ăn, gầy sút cân; nôn và buồn nôn; thiếu máu: da xanh, niêm mạc nhợt.

- **Thể bệnh nặng: Hội chứng tăng nhiễm GL và bệnh GL lan tỏa:**

Hội chứng tăng nhiễm GL và bệnh GL lan tỏa thường gặp nhất trên những bệnh nhân dùng corticosteroid liều cao để điều trị như trong bệnh hen

suyễn hoặc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), hội chứng thận hư, lupus. Ngoài ra, thể bệnh nặng này cũng thường gặp trên các đối tượng mắc hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS) [62], nhiễm virus hướng ung thư tế bào lympho T type 1 (HTLV – 1) [58], các cơ địa suy giảm miễn dịch khác như lao, ung thư máu [92], ghép thận và các cơ quan khác [51]. Nguyên nhân là do miễn dịch của vật chủ bị suy yếu dẫn đến sự gia tăng nhanh số lượng ATGL và AT di chuyển nhanh, nhiều nơi. Trong hội chứng tăng nhiễm GL, AT chỉ gây bệnh giới hạn ở đường tiêu hóa và phổi, còn trong bệnh GL lan tỏa, AT di chuyển đến nhiều cơ quan mà không hề liên quan đến chu kỳ sinh phát triển bình thường như đường tiết niệu, hệ thần kinh trung ương, gan [20], [21]. Bệnh GL lan tỏa nặng có thể dẫn đến nhiễm trùng máu, viêm màng não mà nguyên nhân là do các vi khuẩn đường ruột có trên thân của ATGL mang theo khi di chuyển hoặc các vi khuẩn này có thể đi vào máu thông qua các vết loét ở ruột. Nếu không được điều trị, tỉ lệ tử vong của hội chứng nhiễm trùng và nhiễm GL lan tỏa có thể lên đến 90% [39], [50].

1.3 Chẩn đoán và điều trị bệnh giun lươn

Qua tổng quan ở những phần trên cho thấy việc chẩn đoán nhiễm GL là rất cần thiết và quan trọng. Biểu hiện lâm sàng của nhiễm giun lươn không đặc hiệu và khá phức tạp dẫn đến bệnh có thể bị bỏ sót, đặc biệt với các thể bệnh nhẹ ở vùng dịch tễ. Quá trình chẩn đoán cần có sự phối hợp giữa lâm sàng với yếu tố dịch tễ, các xét nghiệm chẩn đoán xác định và các xét nghiệm mang tính hỗ trợ [7].

1.3.1 Định nghĩa ca bệnh do giun lươn *Strongyloides stercoralis*

Theo *Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và phòng bệnh giun lươn* của Bộ y tế ban hành tháng 5/ 2020 (Số: 2139/QĐ-BYT), ca bệnh nhiễm GL được chẩn

đoán trong trường hợp bệnh nghi ngờ và trường hợp bệnh xác định như sau [3]:

- Trường hợp bệnh nghi ngờ: Bệnh nhân có dấu hiệu lâm sàng hướng tới bệnh giun lươn.
- Trường hợp bệnh xác định:
 - + Bệnh nhân có bệnh cảnh lâm sàng.
 - + Xét nghiệm tìm thấy ấu trùng giun lươn trong phân hoặc dịch tá tràng hoặc
 - + Chẩn đoán huyết thanh: ELISA kháng thể kháng giun lươn dương tính.

Như vậy so với tiêu chuẩn ca bệnh của Bộ y tế năm 2016 (ICD 10-2016) [6], [8]; thì tiêu chuẩn về chẩn đoán huyết thanh ELISA đã được đưa thêm vào trong tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh giun lươn mới năm 2020.

1.3.2 Các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán nhiễm giun lươn

Những bệnh phẩm có thể dùng để xét nghiệm trực tiếp tìm GL như: phân, dịch hút từ tá tràng, các bệnh phẩm khác trong trường hợp hội chứng tăng nhiễm giun lươn: đàm, dịch rửa phế quản, dịch màng phổi, dịch não tủy...

Các kỹ thuật để phát hiện trực tiếp GL như soi phân, soi bệnh phẩm dưới kính hiển vi (KHV), cấy phân, kỹ thuật tập trung dùng Ether-formaline, kỹ thuật Baermann, sinh học phân tử, miễn dịch tìm kháng nguyên. Ngoài ra còn có phương pháp gián tiếp phát hiện GL như miễn dịch phát hiện kháng thể, các cận lâm sàng hỗ trợ chẩn đoán như đếm bạch cầu ái toan, hình ảnh học. Hiện nay, bệnh GL chủ yếu được chẩn đoán bằng các kỹ thuật xét nghiệm soi phân hoặc dùng kỹ thuật Baermann, cấy phân trên giấy lọc, đĩa thạch để phát hiện ấu trùng, miễn dịch [31], [42]. Độ nhạy của các kỹ thuật

dựa trên KHV thấp, đặc biệt là trong các trường hợp nhiễm mạn tính. Các kỹ thuật như Baermann hoặc nuôi cấy đĩa thạch rất công kềnh và tốn thời gian. Số lượng mẫu phân cần được thu thập nhiều vào các ngày khác nhau để cải thiện tỉ lệ phát hiện. Miễn dịch là một công cụ hữu ích nhưng nó có thể cho kết quả cao hơn thực tế, không xác định được đang mắc hay đã mắc do chủ yếu là phát hiện kháng thể, và có phản ứng chéo với các bệnh nhiễm KST khác. Hiệu giá kháng thể sau khi điều trị thay đổi chậm và cần được thực hiện sau 6 đến 12 tháng sau khi điều trị mới có thể thấy giảm đáng kể [31], [42].

1.3.2.1 Phương pháp hình thái học

- Soi phân trực tiếp tìm AT

Phương pháp soi phân trực tiếp tìm ATGL là phương pháp quan sát phết phân bằng KHV dựa vào các đặc điểm hình thái như: Ấu trùng thực quản ụ phình có xoang bao miệng ngắn; thực quản có ụ phình, đuôi nhọn [16], [76]. Đây là một kỹ thuật tương đối đơn giản với chi phí thấp. Tuy nhiên, ở những người nhiễm giun lươn mạn tính, số lượng ấu trùng có trong phân rất ít và xuất hiện từng đợt, không liên tục. Độ nhạy của kỹ thuật này thấp, chỉ khoảng 30% [91]. Các nghiên cứu cho thấy có thể tăng độ nhạy bằng cách lặp lại xét nghiệm bảy lần trên một mẫu [31], [102] hoặc kích thích thải ấu trùng *S. stercoralis* bằng cách cho bệnh nhân uống albendazole đơn liều 400mg [114]. Ngoài ra kỹ thuật tập trung ấu trùng GL dùng Ether-formaline cũng cho kết quả cải thiện đáng kể [31].

- Phương pháp Baermann

Phương pháp Baermann (1917) được sử dụng dựa vào đặc tính ấu trùng giun lươn là có ái tính với nhiệt độ (độ ẩm) và độ ẩm [26], [31]. Lượng phân cần rất nhiều (toàn bãi, khoảng 150g phân). Khi so sánh với các phương pháp thông thường khác, cho thấy hiệu quả phát hiện ấu trùng tăng gấp 3,6 - 4 lần

so với soi trực tiếp và kỹ thuật Ether-formaline [31]. Tuy nhiên, kỹ thuật này đòi hỏi nhiều công sức và dụng cụ thường không có sẵn trong các phòng thí nghiệm. Ngoài ra, mẫu phân cần sử dụng là phân tươi, không bảo quản lạnh nên dễ lây nhiễm cho nhân viên thao tác [26].

- **Phương pháp cấy phân tìm AT**

Phương pháp nuôi cấy trên giấy lọc (Kỹ thuật Harada-Mori) dựa vào đặc tính hướng ẩm của ATGL. Phân tươi được phết trên giấy thấm, ngâm với nước ở nhiệt độ khoảng 30°C và có thể cần đến 10 ngày. Các cặn lắng của nước cấy phân được thu thập hàng ngày để tìm ATGL [26], [31]. Phương pháp này có độ nhạy cao hơn phương pháp soi trực tiếp nhưng thấp hơn phương pháp Baermann và nuôi cấy trên đĩa thạch [59], [66].

Cấy phân trên đĩa thạch là một phương pháp ưu việt cho chẩn đoán giun lươn, có độ nhạy hơn 1,6 - 6 lần so với phương pháp soi phân trực tiếp và cấy trên giấy lọc [31], [59], [66]. Trong nghiên cứu của Sato và cộng sự, để tăng độ nhạy của phương pháp cấy trên đĩa thạch thì cần thực hiện lặp đi lặp lại [97]. Một số nhược điểm khác của phương pháp này là: tốn kém, mất nhiều thời gian, nguy cơ lây nhiễm cho người phân tích mẫu cao.

- **Bệnh phẩm là các loại dịch khác**

+ **Dịch hút từ tá tràng**

Phương pháp này được thực hiện bằng cách tiến hành nội soi thực quản – dạ dày – tá tràng để hút dịch tá tràng và xét nghiệm tìm ấu trùng giun lươn. Phương pháp soi KHV chỉ với một mẫu dịch tá tràng để phát hiện bệnh giun lươn có độ nhạy đến 76% [52]. Tuy nhiên đây là một phương pháp xâm lấn, vì vậy chỉ định của phương pháp này trên lâm sàng cũng bị hạn chế, được khuyến cáo chỉ định cho những bệnh nhân cần loại trừ chắc chắn nhiễm GL mạn tính ở những người có nguy cơ bị bệnh giun lươn nặng.

+ Các loại dịch khác

Trong hội chứng tăng nhiễm GL, ATGL có thể được tìm thấy trong đàm, dịch rửa phế quản, dịch màng phổi, dịch não tủy, mẫu sinh thiết dạ dày, phết cổ tử cung [60], [75], [94]. Kỹ thuật chủ yếu là soi bệnh phẩm bằng KHV và phát hiện ấu trùng GL.

1.3.2.2 Phương pháp miễn dịch

- Phương pháp chẩn đoán miễn dịch phát hiện kháng thể

Một bệnh nhân nhiễm GL sẽ có đáp ứng miễn dịch sản xuất ra các immunoglobulin có trong huyết thanh giúp cơ thể chống lại GL, gồm có immunoglobulin A (IgA), E(IgE), M (IgM) và G (IgG) và các lớp con của IgG: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Tuy nhiên, hiện tại xét nghiệm huyết thanh học để chẩn đoán GL chủ yếu phát hiện kháng thể IgG chống GL và ở mức độ thấp hơn là kháng thể IgG4 chống GL [83].

Những xét nghiệm này có thể khác nhau bởi các kháng nguyên (KN) được sử dụng để phát hiện kháng thể (KT) như KN thô, KN tinh khiết, KN tái tổ hợp. Hạn chế lớn trong việc phát triển các phương pháp phát hiện dựa trên KT để chẩn đoán KN là khó thu được KN thân từ *S. stercoralis* do cần số lượng AT rất nhiều và nguy cơ ô nhiễm trong quá trình xử lý các KN [31]. Một số KN bề mặt hay KN tiết có thể cải thiện được những hạn chế này [47]. KN tái tổ hợp có thể được tinh chế và sản xuất với số lượng lớn, vì vậy việc sử dụng KN tái tổ hợp khắc phục được các hạn chế trong việc chuẩn bị KN thô như tốn thời gian và phụ thuộc vào việc thu thập phân từ người nhiễm bệnh hoặc động vật thí nghiệm [31]. Các phương pháp miễn dịch đang được áp dụng hiện nay: ELISA (miễn dịch enzym), IFAT (miễn dịch huỳnh quang gián tiếp phát hiện kháng thể) và LIPS (miễn dịch kết tủa luciferase). ELISA gián tiếp có thể được sử dụng cho các mẫu sinh học khác nhau bao gồm huyết thanh,

dịch não tủy, sữa và các phân dựa trên phát hiện IgG tổng số [31]. Tác giả Trần Thị Hồng và CS cho thấy, độ nhạy và độ đặc hiệu của test ELISA trong chẩn đoán giun lươn lần lượt là 95,7% và 93,6%; giá trị tiên đoán dương và giá trị tiên đoán âm lần lượt là 95,7 và 93,8% [12]. Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng ghi nhận phản ứng chéo của phương pháp này với các giun tròn khác là phổ biến [31]. Yori và CS đã chỉ ra rằng khi xét nghiệm huyết thanh từ những người nhiễm giun móc thì thấy có đến 77% người có kết quả ELISA dương tính với *S. stercoralis* [118]. Khó khăn ở việc không có tiêu chuẩn vàng đáng tin cậy cho chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis* cũng ảnh hưởng đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp này. Gyorkos và CS khi tiến hành ở Canada trên những người tị nạn châu Á mới đến, cho thấy phương pháp ELISA phát hiện kháng thể có độ nhạy 95% và độ đặc hiệu 29% khi sử dụng xét nghiệm phân làm tiêu chuẩn vàng (tiêu chuẩn vàng này không hoàn hảo do có độ nhạy của xét nghiệm phân thấp) [53].

Miễn dịch huỳnh quang gián tiếp phát hiện kháng thể (IFAT: Indirect Fluorescent antibody test): Phát hiện KT trong huyết thanh của bệnh nhân có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Trong một nghiên cứu gần đây, IFAT đã được tìm thấy là nhạy hơn bốn thử nghiệm huyết thanh khác đã được nghiên cứu [120]. Một ưu điểm của kỹ thuật này có thể cung cấp kết quả định lượng bằng cách xác định hiệu giá kháng thể. Hạn chế chính của phương pháp này là kỹ thuật phức tạp [95] và phản ứng chéo với KST khác [31].

Kỹ thuật miễn dịch kết tủa luciferase phát hiện kháng thể dựa vào kháng nguyên tái tổ hợp (NIE-LIPS: New recombinant protein - Luciferase Immunoprecipitation System): có độ nhạy tới 97% và độ đặc hiệu là 100% không có phản ứng chéo với các giun đường ruột khác [31], [42]. Hơn thế nữa, sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp dễ dàng được sản xuất với số lượng lớn. Gần đây, Bisoffi và CS đã nghiên cứu kết luận rằng NIE-LIPS là thử nghiệm chính xác

nhất trong các xét nghiệm huyết thanh học cho chẩn đoán *S. stercoralis* [120]. Tuy nhiên thử nghiệm này chưa phổ biến trong các phòng xét nghiệm [31].

Nhìn chung ưu điểm của các phương pháp miễn dịch phát hiện kháng thể là có độ nhạy cao, thích hợp với các xét nghiệm sàng lọc, tầm soát nhiễm giun lươn và nó cũng có ý nghĩa trong theo dõi hiệu quả điều trị [48], [95].

- Phương pháp miễn dịch tìm kháng nguyên giun lươn trong phân

Phương pháp này giúp khắc phục một số hạn chế liên quan đến việc chẩn đoán dựa trên việc phát hiện KN của *S. stercoralis*, giảm khả năng nhiễm chéo [31]. Trong nghiên cứu của Sykes và CS cho thấy, các KN của GL không có phản ứng chéo với KN của giun móc, sán máng. Các KN này đạt được độ ổn định đến 270 ngày nếu lưu trữ ở nhiệt độ -20°C, nhưng lại không ổn định khi lưu trữ ở 4°C [107]. Tuy nhiên còn ít các nghiên cứu về lĩnh vực này.

1.3.2.3 Chẩn đoán bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các xét nghiệm phân sử dụng KHV, miễn dịch thường có độ nhạy thấp trong chẩn đoán GL [31] nhu cầu thực tế bức thiết cần có một phương pháp chẩn đoán chính xác có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Vì vậy rất nhiều nghiên cứu sinh học phân tử về GL được tiến hành do các phương pháp này độ nhạy và độ đặc hiệu cao [44], [67], [79]. Các kỹ thuật PCR được ứng dụng là PCR truyền thống [90], real-time – PCR [106], [116], PCR lồng (nested – PCR) [77], [100], real-time PCR đa môi và PCR đa môi. Nhiều xét nghiệm PCR đã được thiết kế để phát hiện *S. stercoralis*, với gen đích là gen ty thể cytochrome c oxidase tiểu đơn vị I (COX1) [71] hoặc gen trong nhân tế bào 18S rRNA [65], [112] hay 28S rRNA [73]. Trong nhiều khảo sát dịch tễ học, qPCR (hay real-time PCR) được đánh giá tăng khả năng chẩn đoán GL lên gấp 2 đến 8 lần so với các kỹ thuật sử dụng KHV [27], [100]. Lượng ADN

đặc hiệu của KST có thể trực tiếp tương quan với cường độ nhiễm và miễn dịch của ký chủ [72]. Nhược điểm của phương pháp PCR truyền thống và real-time PCR là một kỹ thuật khó, cần được thực hiện bởi các chuyên viên, kỹ thuật viên có trình độ chuyên môn cao, được đào tạo bài bản với các trang thiết bị, máy móc hiện đại. Giá thành thực hiện khá cao cũng như không phải trung tâm xét nghiệm nào cũng đủ tiêu chuẩn thực hiện xét nghiệm PCR. Để khắc phục những giới hạn của phương pháp PCR truyền thống và real-time PCR trong chẩn đoán xác định mầm bệnh tại thực địa, các nghiên cứu gần đây có xu hướng chuyển sang các phương pháp khuếch đại ADN đẳng nhiệt. Điển hình là kỹ thuật LAMP với những ưu điểm là khuếch đại đẳng nhiệt nên chỉ cần các thiết bị xét nghiệm đơn giản, nhỏ gọn, thời gian xét nghiệm được rút ngắn chỉ còn 30 - 60 phút, đặc biệt các kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt có khả năng phát triển thành các bộ kit phân tử cho phép ứng dụng được tại thực địa. Trong nghiên cứu so sánh kỹ thuật real-time PCR với LAMP để chẩn đoán GL cho thấy, khi áp dụng để chẩn đoán 396 mẫu phân tại Bangladesh và Australia cho thấy tỉ lệ các mẫu cùng dương tính với real-time PCR và LAMP là 77,3% và tỉ lệ cùng âm tính là 100%. Từ kết quả của nghiên cứu này có thể thấy hệ số Kappa của kỹ thuật LAMP và real-time PCR đạt 0,79, độ tương đồng của 2 kỹ thuật phù hợp khá [74]. Vì vậy kỹ thuật LAMP dùng trong chẩn đoán GL đang trở thành xu hướng được nghiên cứu nhiều để đưa vào sử dụng ở những vùng còn thiếu thốn về cơ sở hạ tầng như các vùng nông thôn.

1.3.3 Điều trị bệnh giun lươn

Giun lươn có chu trình tự nhiễm trong cơ thể người, vì vậy khi điều trị cần đảm bảo bệnh nhân được điều trị cho đến khi giun bị loại trừ hết. Bệnh nhân phải được xét nghiệm tìm GL trước và sau những khoảng thời gian nhất định trong quá trình điều trị. Điều trị cho bệnh GL được khuyến cáo cho tất cả

những người bị nhiễm, dù có triệu chứng hay không, do nguy cơ phát triển hội chứng tăng nhiễm GL và / hoặc nhiễm GL lan tỏa. Hơn nữa, bệnh nhân nên được xét nghiệm chẩn đoán nhiễm GL trước khi bắt đầu điều trị bằng bất kỳ liệu pháp ức chế miễn dịch nào, đặc biệt là corticosteroid [39].

Theo hướng dẫn của Bộ y tế, điều trị bệnh GL với một trong hai phác đồ dùng ivermectin hoặc albendazole [3]:

- Đối với thể bệnh thông thường: liều dùng ivermectin 0,2 mg/kg/ngày, dùng trong 1-2 ngày hoặc liều dùng albendazole 10 mg/ kg/ ngày trong 5 ngày liên tiếp hoặc dùng 400 mg mỗi ngày trong 3 ngày liên tiếp đối với bệnh nhân trên 2 tuổi; trẻ em < 2 tuổi: uống 200mg/ngày trong 3 ngày liên tiếp.
- Đối với thể bệnh nặng: Liều dùng ivermectin 0,2mg/kg/ngày, uống cho đến khi xét nghiệm phân không còn thấy ấu trùng giun lươn (có thể điều trị trong 2 tuần) hoặc liều dùng albendazole 10 mg/kg/ngày x 10 - 15 ngày.

1.4 Tình hình nhiễm giun lươn

1.4.1 Tình hình nhiễm giun lươn trên thế giới

Bệnh giun lươn (Strongyloidiasis) xảy ra nhiều tại các quốc gia vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới. Tương tự như giun móc, chu trình sống của giun lươn có một giai đoạn phát triển ở ngoại cảnh nên cần một số yếu tố khí hậu và địa lý khác nhau vì vậy mức độ nhiễm khác nhau tùy từng vùng. Những vùng bị nhiễm giun móc nặng thường nhiễm GL nhiều. Tổng hợp số liệu từ các nghiên cứu, năm 2013, tác giả Fabian Schar và cộng sự đã tính toán và đưa ra tỉ lệ nhiễm giun lươn của các quốc gia, khu vực trên toàn thế giới [99]. Tại châu Phi, tỉ lệ nhiễm GLĐR ở cộng đồng khảo sát dao động từ 0,1% (tại Cộng hòa Trung Phi) đến 91,8% (tại Gabon). Ở Nam và Trung Mỹ, tỉ lệ nhiễm 1,0% (ở Haiti), tới 97,6% (ở Dominica). Khu vực Đông Nam Á cũng là vùng dịch tễ lưu hành bệnh, một số quốc gia báo cáo tỉ lệ lây nhiễm như sau:

Campuchia, tỉ lệ nhiễm là 17,5%, Thái Lan: 23,7%, Lào: 26,2%. Ở Việt Nam, tỉ lệ 0,02% dường như là thấp hơn so với các nước châu Á khác [99]. Tuy nhiên báo cáo cũng cho thấy kết quả này ghi nhận tại Việt Nam các nghiên cứu còn rất ít so với các nước trên thế giới. Ở các nước phát triển, nhiễm *S. stercoralis* rất hiếm, và ít phổ biến ở thành thị, có cao hơn ở nông thôn, tuy nhiên tồn tại với tỉ lệ tương đối cao ở các khu nhà ổ chuột trong thành phố. Ở châu Âu và Hoa Kỳ, nhiễm GL xảy ra theo từng vùng nhất định và lưu hành chủ yếu ở người làm nông nghiệp hoặc thợ mỏ. Hơn nữa, ở các nước phát triển, GL vẫn còn là một vấn đề đối với những người nhập cư, khách du lịch và quân nhân trở về từ các vùng dịch tễ lưu hành. Ở Canada năm 1982-1983, Gyorkos sử dụng phương pháp huyết thanh chẩn đoán tìm kháng thể GL và kết quả cho thấy tỉ lệ lưu hành 11,8% ở người tị nạn Việt Nam, 76,6% ở người tị nạn Campuchia, 55,6% ở người tị nạn Lào [53]. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, một số nghiên cứu ở Campuchia cho thấy có những khu vực có tỉ lệ hiện nhiễm GL lên đến 41% trong dân số và 32% ở trẻ em [63], [64].

Tại cuộc họp toàn cầu lần thứ ba của các đối tác để kiểm soát KST, đã đề xuất các biện pháp kiểm soát *S. stercoralis* tập trung các vùng dịch tễ lưu hành của bệnh này (WHO, 2005). Mặc dù vậy, chưa có hành động và biện pháp cụ thể nào được thực hiện. Một quan niệm sai lầm phổ biến trong ngành y tế và sức khỏe cộng đồng là, coi đặc tính sinh học của *S. stercoralis* gần giống với giun ký sinh ở đường ruột khác, như giun móc bả sót giai đoạn tự nhiễm, mầm bệnh này không được chẩn đoán và điều trị vẫn tồn tại nhiều năm và phát triển trong ký chủ và có khả năng phát tán và có nguy cơ lây nhiễm trong cộng đồng. Tỉ lệ *S. stercoralis* bị đánh giá quá thấp so với thực nhiễm: Có thể do độ nhạy thấp của các công cụ chẩn đoán hiện có và ít các điều tra chuyên ngành, dẫn đến nhiễm *S. stercoralis* ít khi được phát hiện

và nhiều khu vực chưa có thông tin. Bản đồ phân bố của *S. stercoralis* toàn cầu (tỉ lệ mắc bệnh, tỉ lệ chết) đến nay vẫn chưa được công bố [33], [102]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối liên quan giữa nhiễm *Strongyloides* spp. và nhiễm virus Human T-Cell Lymphotropic Virus-1 (HTLV-1). Các nghiên cứu này đã chỉ ra rằng những người bị nhiễm HTLV-1 có nhiều khả năng bị nhiễm *Strongyloides* spp. và khi đã bị nhiễm bệnh, có nhiều khả năng phát triển các trường hợp nhiễm giun lươn nặng. Đáng chú ý, nhiễm HIV/AIDS không phải là một yếu tố nguy cơ mắc bệnh GL hoặc làm cho tình trạng lâm sàng tồi tệ hơn [39], [94].

1.4.2 Tình hình nhiễm giun lươn tại Việt Nam

Tại Việt Nam, ca bệnh đầu tiên đã được Normand phát hiện vào năm 1876 trên một lính Pháp đóng quân ở miền Nam Việt Nam. Bệnh nhân này bị nhiễm GL kèm theo các triệu chứng rối loạn tiêu hóa, tiêu chảy... nên bệnh GL còn được gọi là bệnh tiêu chảy Nam Bộ. Giun lươn phân bố rộng khắp thế giới nhưng tỉ lệ nhiễm không cao. Theo điều tra của Galliard (1940), tỉ lệ nhiễm GL ở miền Bắc khoảng từ 0,2 đến 2,5% [6]. Những năm gần đây, theo điều tra của Trường Đại học Y Hà Nội và Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng trung ương tỉ lệ nhiễm GL thường xuyên dưới 1% [6]. Tác giả Vũ Thị Lâm Bình và CS, nghiên cứu tại Phú Thọ và Thái Nguyên, tỉ lệ nhiễm GL khi xét nghiệm bằng phương pháp soi tươi trên phân thấp khoảng 1,5 % trong khi tỉ lệ dương tính khi XN bằng ELISA tương đối cao tới > 10% [1], [2]. Nghiên cứu về tình hình nhiễm GL ở miền Bắc Việt Nam của tác giả Nguyễn Văn Đề và CS gần đây cho thấy tỉ lệ bệnh nhân từ các tỉnh đến khám tại bệnh viện Đại học Y Hà Nội có tới 20% có kết quả huyết thanh chẩn đoán tìm kháng thể GL dương tính, kiểm tra lại bằng soi phân thì có 10,5% số người có kết quả ELISA dương tính này có ATGL [82]. Ở các tỉnh phía Nam Việt Nam như

Long An, Bình Dương, Tây Ninh, Đồng Nai, Thành phố Hồ Chí Minh (huyện Củ Chi, Thủ Đức, Hóc Môn) và một số tỉnh khu vực miền Trung - Tây Nguyên, số bệnh nhân nhiễm GL được phát hiện, chẩn đoán và điều trị trong những năm gần đây tương đối nhiều [12], [18]. Một số nghiên cứu tại Miền Nam cho thấy khi nuôi cấy tỉ lệ nhiễm GL có thể lên tới khoảng 10% [23], [24]. Thực tế ghi nhận GL có sự phân bố bất thường và gần như không thành quy luật. Bằng phương pháp nuôi cấy phân tác giả Lê Đức Vinh và CS (2006) điều tra tỉ lệ nhiễm GL tại xã Phú Hòa Đông, huyện Củ Chi cho thấy tỉ lệ nhiễm tới 9,2%, một số điều tra tại các xã khác trong huyện tỉ lệ nhiễm trong cộng đồng chỉ 2-3% [23], [24]. Với việc sử dụng đồng thời hai kỹ thuật xét nghiệm là soi phân và cấy phân Harada Mori cải tiến trong nghiên cứu của tác giả Lê Đức Vinh cho thấy tỉ lệ nhiễm GL tại huyện Đức Hòa năm 2017 – 2018 là 6,64% [25].

Ngoài ra, Việt Nam có một số báo cáo về các ca bệnh GL nặng như: ca bệnh viêm màng não thứ phát do GL ghi nhận tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới TP.HCM [20], ca bệnh nhiễm GL lan tỏa tại Bệnh viện Nhân Dân Gia Định – TP. Hồ Chí Minh [21], ca bệnh tăng nhiễm GL ở Bệnh viện Bạch Mai [14], ca bệnh GL lan tỏa tại Bệnh viện Quân y 103 [4] hay hai ca bệnh có hội chứng tăng nhiễm GL tại Bệnh viện Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh [22].

1.5 Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng LAMP

1.5.1 Lịch sử phát triển LAMP

Như đã nêu ở trên, việc ứng dụng phương pháp PCR truyền thống và real-time PCR trong chẩn đoán xác định mầm bệnh tại thực địa gặp nhiều khó khăn và hạn chế. Xu hướng tiến hành các kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt để có thể ứng dụng được tại thực địa. Đến nay có khoảng hơn 10 phương pháp

khuếch đại đẳng nhiệt được phát triển, trong đó, kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian LAMP được sử dụng nhiều nhất.

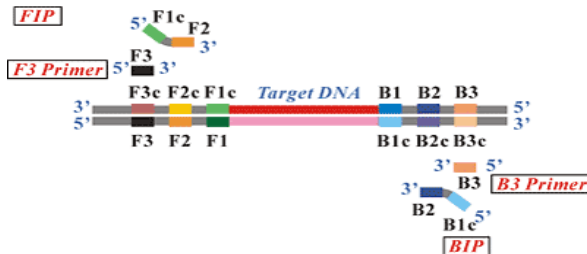
Kỹ thuật LAMP được nghiên cứu và phát triển bởi công ty Eiken Chemical Co. Ltd năm 1998 [109]. Đây một phương pháp nhân bản gen, có thể tổng hợp một đoạn ADN lớn mà không cần chu trình biến nhiệt. Kỹ thuật khuếch đại ADN này tương tự như PCR, nhưng quá trình khuếch đại ADN được hoàn thành trong một bước duy nhất và ở một nhiệt độ ổn định. Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật LAMP nhiều bộ kit chẩn đoán mầm bệnh được phát triển, thương mại hóa trên thị trường.

1.5.2 Nguyên lý của kỹ thuật LAMP

Kỹ thuật LAMP sử dụng 4-6 môi khác nhau được thiết kế đặc biệt để nhận ra 6-8 vùng riêng biệt trên gen đích và phản ứng diễn ra ở một nhiệt độ duy nhất. LAMP chỉ xảy ra khi cả 4 chuỗi môi, bao gồm các môi F3, B3, FIP (F1c+F2), BIP (B1c+B2) bám được vào các vị trí đích của khuôn, tạo ra sản phẩm ADN-vòng. Thành phần phản ứng gồm có ADN khuôn, môi, enzyme Bst DNA polymerase, dung dịch đệm phản ứng. Quá trình tái bản gen đích chỉ diễn ra trong một bước duy nhất thường ở 55°C-65°C, hiệu quả khuếch đại cao khoảng $10^9 - 10^{10}$ bản sao trong thời gian từ 15 - 60 phút. Sản phẩm của phản ứng có thể quan sát bằng mắt thường do sự kết tủa của muối pyrophosphate ($Mg_2P_2O_7$) dưới dạng vẩn đục màu trắng hoặc phát quang khi nhuộm bằng các chất chỉ thị màu (SYBR green). Do vậy, LAMP thường được sử dụng để tạo các bộ kit chẩn đoán nhanh [9], [110].

1.5.2.1 Thành phần cơ bản của phản ứng LAMP:

- Môi: Tối thiểu 4 môi dựa theo 6 đoạn riêng biệt trên đoạn gene quan tâm: đoạn F3c, F2c và F1c ở đầu 3' và đoạn B1, B2 và B3 ở đầu 5'.



Hình 1.6: Các vị trí thiết kế các mồi LAMP [108]

- Enzym: sử dụng phổ biến trong phản ứng LAMP là enzym Bst polymerase được phân lập từ vi khuẩn *Bacillus stearotherophilus* có khả năng xúc tác tổng hợp ADN và tự tách chuỗi cao, hoạt động tối ưu ở 65°C.
- dNTPs và đệm phản ứng: tương tự như kỹ thuật PCR.
- ADN khuôn: Không đòi hỏi mức độ tinh sạch cao, có thể sử dụng các phương pháp tách ADN đơn giản, để rút ngắn thời gian chuẩn bị.
- Chất chỉ thị màu biểu hiện kết quả: Có thể sử dụng nhiều loại chất chỉ thị màu như Syber Green, Hydroxyl Naphthol Blue (HNB), Calcein, xanh malachite...

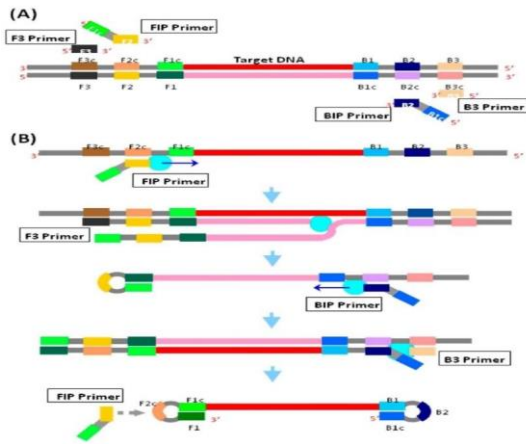
1.5.2.2 Cơ chế phản ứng LAMP

Gồm ba bước chính: tạo vật liệu khởi đầu, tái bản và kéo dài chuỗi, cuối cùng là lặp lại chu kỳ [96].

Bước 1- Tạo vật liệu khởi đầu:

Một trong những mồi LAMP sẽ bám vào trình tự ADN đích, sau đó dưới tác dụng của enzyme Bst polymerase tách sợi và kéo dài sợi mới theo chiều 3'-5' do cấu trúc bổ sung của mồi với các đoạn trình tự đích trong quá trình kéo dài sợi tạo ra sản phẩm ADN đơn có giới hạn bởi 2 mồi là FIP và BIP. Sợi ADN này 2 đầu cuộn lại hình thành cấu trúc gốc vòng (stem-loop) là

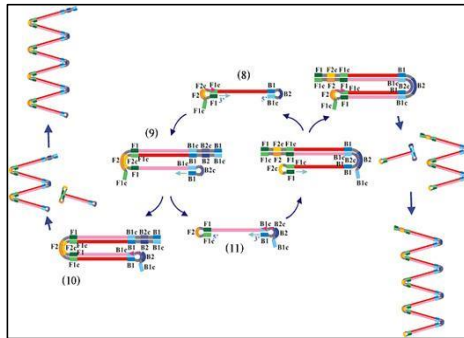
cấu trúc khởi đầu cho quá trình tái bản của phương pháp LAMP (chu kỳ lặp lại LAMP).



Hình 1.7: Sơ đồ phản ứng tạo vật liệu khởi đầu [117]

Bước 2- Chu kỳ tái bản và kéo dài chuỗi:

Mỗi FIP liên kết với vòng trong cấu trúc ADN gốc vòng (stem-loop DNA) ở vùng F2/F2c và tổng hợp sợi ADN thay thế, đồng thời do cấu trúc vòng ở đầu 3' (do trình tự FIP tạo thành) sẽ được kéo dài và hình thành cấu trúc vòng ở vị trí kết thúc của trình tự BIP. Cấu trúc vòng của trình tự BIP lại được kéo dài hình thành nên cấu trúc sợi kép được gấp khúc ở giữa và một sợi đơn có cấu trúc vòng ở hai đầu. Hai sản phẩm này sẽ là ADN khuôn cho mỗi BIP trong các chu kỳ tái bản tiếp theo. Cuối cùng tạo ra hỗn hợp ADN gốc vòng với cấu trúc gấp khúc và độ dài khác nhau của cùng một trình tự.

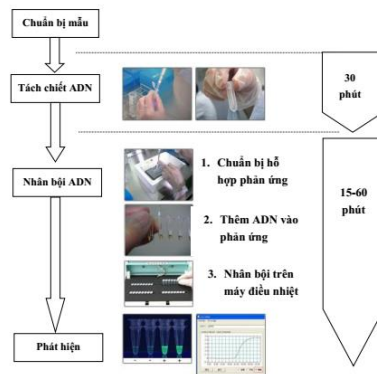


Hình 1.8: Tải bản và kéo dài chuỗi ADN [108]

Bước 3- Lặp lại chu kỳ:

Cứ như vậy, các môi FIP và BIP của cả hai sợi khuôn thay phiên nhau tổng hợp ADN bổ sung và tạo góc vòng ở cuối mỗi sợi. Phản ứng tiếp tục, tạo nên $10^9 - 10^{10}$ bản sao ADN mạch trong vòng 15 phút đến 1 giờ.

- **Các bước tiến hành phản ứng LAMP:** Lấy mẫu, tách ADN/ARN, khuếch đại đẳng nhiệt và phát hiện sản phẩm.



Hình 1.9: Các bước tiến hành kỹ thuật LAMP (nguồn Eiken GENOME SITE có Việt hóa) [108]

1.5.3 Ưu, nhược điểm của kỹ thuật LAMP

1.5.3.1 Ưu điểm của kỹ thuật LAMP

- Không đòi hỏi các thiết bị đắt tiền (bể ổn nhiệt, hoặc thiết bị gia nhiệt có thể giữ nhiệt độ ổn định ở 55°C-65°C)
- Độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương phương pháp phát hiện ADN khác như PCR
- Thời gian xét nghiệm nhanh (15-60 phút)
- ADN làm khuôn không đòi hỏi độ tinh sạch cao
- Phản ứng xảy ra ở điều kiện đẳng nhiệt
- Phát hiện sản phẩm trực tiếp bằng các chất chỉ thị màu

1.5.3.2 Nhược điểm của kỹ thuật LAMP so với phương pháp hình thái học và ELISA

- Đây là kỹ thuật sinh học phân tử vì vậy việc chuẩn bị mẫu vẫn phải bao gồm bước tách chiết ADN nên vẫn cần hóa chất, thiết bị cơ bản như máy ly tâm, micropipette để thực hiện.
- Do có độ nhạy cao, nên dễ tạp nhiễm, gây hiện tượng dương tính giả.
- Giá thành cao hơn so với phương pháp hình thái học và ELISA.

1.5.4 Một số ứng dụng của kỹ thuật LAMP trong chẩn đoán bệnh ở người

LAMP đã được xây dựng để ứng dụng chẩn đoán các loại KST đơn bào, như *Trypanosoma* spp. gây bệnh ở Châu Phi. LAMP đã được sử dụng chẩn đoán *Trypanosoma evansi* trên lợn [119]. Đơn bào gây bệnh người và động vật truyền qua thức ăn, nước uống thuộc giống *Cryptosporidium* [61] và *Giardia* [38] cũng sử dụng LAMP để chẩn đoán. Bên cạnh đó *Entamoeba histolytica* [101] cũng là đối tượng của LAMP. Một trong những ứng dụng có hiệu quả trong sử dụng LAMP đó là phát triển phương pháp chẩn đoán phân

biệt 4 loài *Plasmodium* spp. [54], [55] hoặc đơn lẻ từng như loài *Plasmodium falciparum* [115], *Plasmodium vivax* [41]. Việc thương mại hóa ứng dụng này được cũng đánh giá là rất hiệu quả [70].

Đến nay, đã có một số sản phẩm Kit LAMP được thương mại hóa trên thị trường. Một số sản phẩm của hãng Eiken Chemical Co. Ltd như: Loopamp *Salmonella* Detection Kit; Loopamp Verotoxin producing *Escherichia coli* Detection Kit; Loopamp Verotoxin Typing Kit; Loopamp *Escherichia coli* O157 Detection Kit; Loopamp *Listeria monocytogenes* Detection Kit; Loopamp *Campylobacter* Detection Kit; Loopamp *Legionella* Detection Kit E; Loopamp *Cryptosporidium* Detection Kit; Loopamp *Giardia* Detection Kit

Ở Việt Nam, kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt đã được ứng dụng chẩn đoán một số sinh vật gây bệnh cho vật nuôi và cây trồng như phát triển kỹ thuật LAMP cho việc phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn *Escherichia coli* O157: H7 [10], chẩn đoán bệnh đốm trắng ở tôm, bệnh Phytoplasma gây bệnh chổi rồng trên sắn, chẩn đoán bệnh vàng lá trên cây có múi. Kỹ thuật RT-LAMP chẩn đoán virus gây bệnh rối loạn sinh sản hô hấp trên heo. Trong lĩnh vực y tế một số ứng dụng như RT-LAMP chẩn đoán virus dại, virus viêm não nhật bản, virus Dengue. Một số sản phẩm đã phát triển thành các bộ kit và thương mại hóa trên thị trường như Bộ Kit LAMP chẩn đoán bệnh virus trên tôm - STN15067 của Trung tâm công nghệ sinh học Hồ Chí Minh, kit nhanh RT-LAMP chẩn đoán virus Dengue của Viện công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội...

Đối với chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis*, hiện trên thế giới đã có một số nghiên cứu được tiến hành và công bố trong những năm gần đây như: nghiên cứu của tác giả Matthew và CS với bộ môi dựa trên gen 28S [73], nghiên cứu của tác giả Pedro Fernández-Soto và CS với bộ môi dựa trên gen 18S [86],

[87], nghiên cứu ứng dụng dụng LAMP để chẩn đoán nhiễm các giun tròn trong đó có *S. stercoralis* của Miao-Han Deng và CS [78], hay nghiên cứu so sánh LAMP và real-time PCR trong chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis* của Matthew và CS [74]. Tại Việt Nam hiện chưa có nghiên cứu về ứng dụng LAMP vào chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis* được công bố. Cho đến nay trên thị trường vẫn chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán *S. stercoralis* nào được thương mại hóa và ứng dụng trên lâm sàng.

1.6 Nghiên cứu xây dựng và chuẩn hóa bộ kit LAMP chẩn đoán tác nhân gây bệnh

Các bộ sinh phẩm đã được thương mại hóa trên thị trường có ưu điểm là đã được chuẩn hóa, xác định độ nhạy, độ đặc hiệu, ngưỡng phát hiện đối với các tác nhân gây bệnh, hướng dẫn sử dụng rõ ràng dễ thực hiện nhưng cũng có một số nhược điểm như giá thành cao, thời gian làm thủ tục nhập khẩu lâu nên hạn sử dụng còn lại ngắn, làm cho các phòng thí nghiệm không chủ động được các hoạt động của mình. Do đó nhiều phòng thí nghiệm có xu hướng tự phát triển các bộ sinh phẩm, để có thể chủ động công việc của mình.

Nguyên lý chung khi phát triển các bộ sinh phẩm LAMP để chẩn đoán tác nhân gây bệnh mong muốn cụ thể như sau:

- Thiết kế mồi để xác định tác nhân gây bệnh mong muốn;
- Xây dựng quy trình tiến hành phản ứng LAMP (nhiệt độ bám mồi, nồng độ của các loại hóa chất trong cùng một hỗn hợp phản ứng: Mg^{2+} , chất nhuộm màu, thời gian tiến hành phản ứng);
- Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, ngưỡng phát hiện của phản ứng LAMP;

- Tạo chuẩn dương cho bộ kit;

- So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu, ngưỡng phát hiện của kỹ thuật và bộ sinh phẩm với các phương pháp đang được sử dụng với bộ kit chuẩn đã được thương mại hóa trên thị trường;

- Đóng gói bộ sinh phẩm với thành phần và số lượng phù hợp. Thông thường đóng gói bộ sinh phẩm cho 25, 50 hoặc 100 phản ứng với các thành phần như:

- + Hỗn hợp phản ứng;

- + Môi phản ứng;

- + Chứng cho phản ứng (chứng âm và chứng dương);

- + Chất nhuộm màu;

- Đánh giá độ ổn định của bộ sinh phẩm trên mẫu chuẩn.

1.6.1 Thiết kế môi cho phản ứng LAMP

Môi (Primers) có thể được coi là một trong những thành phần quan trọng nhất của phản ứng LAMP và là một trong những yếu tố được quan tâm đầu tiên khi phát triển một kỹ thuật LAMP mới. Môi là yếu tố quyết định tính đặc hiệu của sản phẩm LAMP, nếu đoạn môi được chọn càng đặc hiệu cho chuỗi ADN đích, thì kết quả xét nghiệm LAMP càng đặc hiệu. Do đó, việc thiết kế môi phải được tiến hành thật chính xác, tránh ảnh hưởng đến hiệu quả và độ đặc hiệu của phản ứng LAMP.

Việc lựa chọn hoặc thiết kế môi cần đảm bảo các yêu cầu cơ bản của phản ứng LAMP: Độ dài đoạn khuếch đại không vượt quá 250 bp, khoảng cách giữa các môi, nhiệt độ nóng chảy (T_m) của từng môi, thành phần GC

trong môi chiếm từ 40-65%, môi cần được thiết kế để tránh hình thành các cấu trúc bậc 2, vị trí gắn môi không có trình tự cắt của enzyme giới hạn.

Môi có thể tự thiết kế môi bằng cách tìm các đoạn trình tự đặc hiệu cho loài hoặc giống dựa trên các đoạn trình tự trên ngân hàng gen bằng cách giống hàng hoặc sử dụng các phần mềm chuyên dụng. Hoặc có thể lựa chọn các cặp môi do các tác giả trước đã sử dụng và kiểm tra xác định lại giá trị sử dụng của cặp môi với các mẫu lâm sàng trong điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm của đơn vị.

1.6.2 Chuẩn hóa các điều kiện của phản ứng LAMP

Dung dịch đệm cho LAMP là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng phản ứng LAMP. Đệm LAMP thường chứa muối Tris HCl 10 mM, KCl 50mM và MgCl₂ 1,5mM. Ngoài ra, đệm PCR còn có thể chứa 0,001% BSA hay Gelatine và tween hay formamide.

Trong các thành phần trên, ảnh hưởng lên phản ứng LAMP nhiều nhất là nồng độ Mg²⁺, vì vậy để có được một thử nghiệm PCR có độ nhạy cao, phản ứng rõ nét, người ta phải tối ưu hóa phản ứng bằng cách thăm dò một nồng độ Mg²⁺ thích hợp nhất.

Ngoài ra các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng LAMP là nồng độ enzyme Bst Polymerase; Nhiệt độ, thời gian thực hiện phản ứng và loại và nồng độ chất nhuộm màu.

1.6.3 Xác định ngưỡng phát hiện, xây dựng chuẩn dương của kỹ thuật

1.6.3.1 Xác định ngưỡng phát hiện

Xác định ngưỡng phát hiện hay độ nhạy của môi: bằng mẫu chuẩn ADN tái tổ hợp của đối tượng nghiên cứu – đã biết trước trước nồng độ: pha

loãng mẫu ADN đã tách chiết theo lũy thừa của 10 thành nhiều nồng độ khác nhau. Tiến hành khảo sát với những điều kiện tối ưu đã được xác định. Nồng độ thấp nhất mà phương pháp luôn cho kết quả rõ ràng và chính xác được xác định là ngưỡng phát hiện của kỹ thuật.

1.6.3.2 Xây dựng chuẩn dương, âm của bộ sinh phẩm

Chuẩn dương trong các bộ sinh phẩm ADN thường được xây dựng bằng phương pháp ADN tái tổ hợp: Tách chiết ADN của mẫu chuẩn, khuếch đại bằng cặp mồi bao phủ chiều dài của đoạn ADN cần khuếch đại (kích thước đoạn ADN lớn hơn đoạn ADN cần khuếch đại). Tái tổ hợp vào vector phù hợp, đo nồng độ và pha thành dãy chuẩn dương theo cấp số nhân; chuẩn dương thấp nhất thường cao hơn ngưỡng phát hiện 01 bậc (gấp 10 lần ngưỡng phát hiện).

Chuẩn âm là nước cất.

Trong một số trường hợp để phát hiện các bệnh ở người, người ta thường thiết kế các bộ mồi có thể phát hiện ADN đặc trưng của người sử dụng làm chứng nội chuẩn, chứng minh hóa chất hoạt động tốt và quá trình tách chiết có thu được ADN từ vật chủ là người.

1.6.4 Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit LAMP

Kết quả của các xét nghiệm cận lâm sàng được coi là các bằng chứng xác định cho việc chẩn đoán bệnh. Thực hành chẩn đoán y học thường dựa trên các bằng chứng trả lời cho những câu hỏi về chẩn đoán lâm sàng và một trong những bằng chứng quan trọng nhất là xét nghiệm cận lâm sàng. Do đó trong các trường hợp một kỹ thuật xét nghiệm hoặc một bộ kit mới được đưa ra, bác sỹ lâm sàng thường quan tâm đến câu hỏi liệu xét nghiệm này có thay thế được cho các xét nghiệm truyền thống đang được sử dụng hay không, ưu

điểm của xét nghiệm này là gì? Một trong những câu hỏi được đặt ra hàng đầu song song với giá thành và thời gian xét nghiệm là độ nhạy, độ đặc hiệu, ngưỡng phát hiện và tính ổn định của xét nghiệm và bộ kit. Để đánh giá một phương pháp xét nghiệm cũng như một bộ kit trước khi áp dụng vào chẩn đoán lâm sàng thì các chỉ số về độ nhạy, độ đặc hiệu, ngưỡng phát hiện và tính ổn định của xét nghiệm và bộ kit được coi là các chỉ số tiên phong, bắt buộc phải có [40].

1.6.4.1 Xác định độ nhạy, độ đặc hiệu của một xét nghiệm chẩn đoán

Theo nghiên cứu Nishikawa và cs (2013) [93] đã nêu rõ các định nghĩa:

Độ nhạy (Se - sensitivity): Của một xét nghiệm chẩn đoán là tỉ lệ người mang bệnh có kết quả xét nghiệm dương tính.

Độ đặc hiệu (Sp - specificity): Của một xét nghiệm chẩn đoán là tỉ lệ người không mang bệnh có kết quả xét nghiệm âm tính.

Để xác định Se, Sp người ta so sánh kết quả chẩn đoán của phương pháp cần xác định với phương pháp chuẩn (được gọi là chuẩn vàng, gold standard) [40].

Phương pháp chuẩn là phương pháp được xem như độ chính xác cao (tuy nhiên không phải hoàn toàn tuyệt đối), do đó việc xác định tiêu chuẩn vàng để đánh giá một xét nghiệm mới là vô cùng quan trọng.

Theo định nghĩa trên để đánh giá được độ nhạy, độ đặc hiệu của một sinh phẩm chẩn đoán ngoài việc xác định được chuẩn vàng, thì mẫu được sử dụng để đánh giá xét nghiệm mang tính quyết định về tính chính xác của bộ kit.

Xác định mẫu dương tính thật (TP - true positive): hay còn gọi là mẫu chuẩn dương – là các mẫu đã được xác định dương tính về mặt hình thái, đối với những nghiên cứu gần đây thì mẫu chuẩn dương phải được thẩm định lại

bằng một kỹ thuật sinh học phân tử đã được công bố trên các tạp chí uy tín của thế giới hoặc lưu giữ trên ngân hàng gen.

Mẫu âm tính thật (TN – true negative) – thường là các nền mẫu giống như mẫu xét nghiệm nhưng không chứa tác nhân gây bệnh, hoặc mẫu chứng trắng (mẫu nước cất, hoặc dung môi phù hợp hoàn toàn không chứa tác nhân gây bệnh); Các mẫu âm tính thật cũng cần được thẩm định xác định hoàn toàn không chứa tác nhân gây bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Sau đó để đánh giá khả năng áp dụng của bộ kit này trên mẫu lâm sàng, yêu cầu phải đánh giá bộ kit trên các mẫu lâm sàng thu từ thực địa. Đối với các mẫu lâm sàng khi xét nghiệm có thêm khái niệm:

Mẫu dương tính giả (FP - false positive): Mẫu âm tính nhưng vì một lý do nào đó khi xét nghiệm cho kết quả dương tính.

Mẫu âm tính giả (FP - false positive): Mẫu dương tính nhưng vì một lý do nào đó khi xét nghiệm cho kết quả âm tính.

Giá trị tiên đoán dương (PPV - positive predictive value): Là tỉ lệ người có kết quả xét nghiệm dương tính thật sự mang bệnh.

Giá trị tiên đoán âm (NPV - negative predictive value): Là tỉ lệ người có kết quả xét nghiệm âm tính thật sự không mang bệnh.

Xét nghiệm có độ nhạy cao sẽ cải thiện giá trị tiên đoán âm (ít kết quả âm tính giả).

Xét nghiệm có độ đặc hiệu cao giúp cải thiện giá trị tiên đoán dương (ít kết quả dương tính giả).

1.6.4.2 So sánh tính tương đồng của bộ kit

So sánh tính tương đồng của bộ kit chẩn đoán mới với chuẩn vàng, Trong trường hợp xác định *S. stercoralis* thì có thể so sánh với phương pháp nuôi cấy soi xác định hình thái hoặc so sánh bộ kit chẩn đoán mới với một kỹ

thuật hoặc một bộ kit có ngưỡng phát hiện tương đương, tùy từng trường hợp nếu đã có những bộ kit có ngưỡng phát hiện tương đương đã được thương mại hóa trên thị trường thì sử dụng bộ kit đã được thương mại hóa.

Tính tương đồng của bộ kit được tính bằng mức độ thống nhất giữa hai bộ kit thể hiện qua hệ số kappa (K).

Trị số K biến động 0 (thống nhất do ngẫu nhiên mà thôi) đến +1 (thống nhất hoàn toàn).

1.6.4.3 Đánh giá tính ổn định của bộ kit

Ngoài độ nhạy, độ đặc hiệu, tính tương đồng thì một đặc tính quan trọng để quyết định khả năng áp dụng của bộ kit là tính ổn định của bộ kit.

Một bộ kit sinh học phân tử, phải có thời hạn sử dụng tối thiểu trong vòng 6 tháng. Để đánh giá tính ổn định của bộ kit cần tiến hành bảo quản bộ kit trong các điều kiện khác nhau, và hàng tháng tiến hành thực hiện xét nghiệm trên các mẫu chuẩn, mà mẫu lâm sàng cố định đã được bảo quản trong các điều kiện tối ưu đảm bảo không thay đổi bản chất của mẫu; đánh giá tối thiểu 6 tháng và càng lâu càng tốt, hoạt động đánh giá được dừng lại khi kết quả đánh giá 2 lần liên tiếp không đảm bảo tính ổn định.

1.6.5 Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit

Sau khi tiến hành quá trình tối ưu hóa thành phần và chu trình phản ứng PCR, xây dựng được chứng dương, chứng âm, chứng nội chuẩn, đánh giá được độ nhạy, độ đặc hiệu, độ ổn định của bộ kit sẽ tiến hành tập hợp các số liệu để công bố tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit.

Các tiêu chuẩn gồm có: Nhận dạng kết quả sản phẩm của bộ kit, độ nhạy, độ đặc hiệu, ngưỡng phát hiện, thời gian xét nghiệm và tính ổn định của bộ kit.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mục tiêu 1: Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở người

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

Ấu trùng *S. stercoralis* được thu thập từ mẫu phân của người nhiễm GLĐR với mục đích sử dụng làm chứng chuẩn và phát triển chứng dương.

2.1.2 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Thời gian: từ tháng 9 năm 2017 đến tháng 5 năm 2019.
- Địa điểm: Phòng thí nghiệm
 - + Khoa SHPT Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương.
 - + Bộ môn Vi sinh – Ký sinh, khoa Y, Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh.

2.1.3 Thiết kế nghiên cứu

Thực nghiệm và mô tả tại phòng thí nghiệm

2.1.3.1 Cơ mẫu

Mẫu chuẩn dương để chuẩn kỹ thuật: tối thiểu 03 mẫu ATGL *S. stercoralis* đã được xác định hình thái qua soi KHV và được thẩm định lại bằng qPCR ở các giai đoạn nghiên cứu trong mục tiêu này, mỗi mẫu tiến hành xét nghiệm lặp lại 3 lần.

2.1.3.2 Phương pháp chọn mẫu

- **Mẫu chuẩn sử dụng cho thiết kế và đánh giá hoạt động của bộ mồi LAMP:**
 - + Mẫu chứng dương: AT của GLĐR thu từ nuôi cấy được định loại hình thái và thẩm định lại bằng kỹ thuật qPCR.

+ Mẫu chứng âm:

- AT hoặc con trưởng thành của một số loài KST đường ruột: giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp.*
- Nước cất khử ion

- **Chứng dương để chế tạo bộ kit:** ADN tái tổ hợp mang đoạn gen được sử dụng để thiết kế môi với nồng độ phù hợp của GLĐR.

2.1.4 Nội dung nghiên cứu

2.1.4.1 Chuẩn bị mẫu, tách chiết ADN

- Mẫu AT *S. stercoralis* được đựng trong các ống 1,5 ml có chứa đệm PBS, bảo quản -35°C cho đến khi được tách chiết ADN.

- Tách chiết ADN của ấu trùng *S. stercoralis* thu được từ mẫu phân bằng bộ kit thương mại QIAmp DNA stool Mini kit của hãng Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.1.4.2 Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* gồm các bước

Bước 1: Thiết kế bộ môi

- Xác định trình tự bộ môi

+ Xác định vùng bảo tồn của GLĐR *S. stercoralis* từ 30 trình tự gen 18S rRNA của *Strongyloides* đã công bố trên ngân hàng gen.

+ Đưa vùng trình tự bảo tồn đã xác định vào phần mềm thiết kế môi LAMP chuyên dụng Primer Explorer v.5 (Eiken, Nhật bản) để lựa chọn bộ môi dựa trên các tiêu chí: Độ dài đoạn khuếch đại không vượt quá 250 bp, khoảng cách giữa các môi (bảng dưới), nhiệt độ nóng chảy (T_m) của từng môi (bảng dưới), thành phần GC trong môi chiếm từ 40-60%, môi cần được thiết kế để

tránh hình thành các cấu trúc bậc 2, vị trí gắn mồi không có trình tự cắt của enzyme giới hạn.

Bảng 2.1 Yêu cầu khoảng cách giữa các mồi [108]

Khoảng cách	Độ dài (bp)
Đầu 5' của F2 đến đầu 5' của B2	120 – 180
Đầu 5' của F2 đến đầu 3' của F1	40 – 60
Đầu 5' của B2 đến đầu 3' của B1	40 – 60
Đầu 3' của F3 đến đầu 5' của F2	0 – 20
Đầu 3' của B3 đến đầu 5' của B2	0 – 20

Bảng 2.2 Yêu cầu nhiệt độ nóng chảy (Tm) của từng mồi

Mồi	Tm (°C)
F1c; B1c	64 – 66
F2; B2; F3; B3	59 – 61
LF; LB	64 - 66

Tính bền vững ở đầu các mồi: Đầu 3' của các mồi F2/B2; F3/B3; LF/LB và đầu 5' của F1c/B1c được thiết kế với năng lượng tự do $\Delta G \leq -4\text{Kcal/mol}$.

+ Lựa chọn 3 bộ mồi cho mỗi đối tượng được thiết kế phù hợp nhất với các tiêu chí đã đặt ra để tiến hành thực nghiệm.

- Khảo sát tính đặc hiệu của mồi

Tính đặc hiệu của bộ mồi được đánh giá thông qua hai tiêu chí:

+ Cặp mồi F3-B3 bắt cặp hoàn toàn với trình tự 18S rRNA của giun lươn đường ruột *S. stercoralis* được công bố trên ngân hàng gen.

+ Đánh giá khả năng bắt chéo của bộ mồi cho GLĐR *S. stercoralis* với ADN của giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp.* bằng phản ứng PCR.

Lựa chọn bộ mồi

Bộ mồi đạt yêu cầu là bộ mồi đáp ứng tốt nhất các tiêu chí ở trên.

Bước 2: Khảo sát tối ưu hóa các điều kiện của phản ứng LAMP sử dụng bộ mồi thiết kế.

- Thành phần phản ứng LAMP:

Bảng 2.3 Thành phần phản ứng LAMP

Số TT	Thành phần
1	Dung dịch đệm chạy LAMP
2	Mg ²⁺
3	dNTPs
4	Bst Taq Polymerase
5	Các cặp mồi FIP/BIP; F3/B3; LF/LB
6	ADN mẫu

- Các điều kiện cần tối ưu hóa:

Bảng 2.4: Các điều kiện cần tối ưu hóa

Điều kiện	Khoảng khảo sát
Nhiệt độ lai gắn mồi (Ta)	60°C – 65°C
Nồng độ Mg ²⁺	4mM – 10mM
Thời gian phản ứng	40 phút và 60 phút
Chất hiện màu	Lựa chọn theo cơ chế thay đổi pH trong đệm phản ứng.

- Tiêu chí đánh giá là nồng độ sản phẩm LAMP thu được, dựa vào các băng điện di: Các điều kiện tối ưu được lựa chọn khi nồng độ sản phẩm LAMP cho kết quả cao nhất và được đánh giá thông qua độ đậm của các băng khi điện di.

Bước 3: Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ môi

- Pha loãng bậc 10 liên tiếp mẫu chuẩn dương đã biết trước nồng độ thành một dãy nồng độ khác nhau (từ 10^{-6} trở xuống) để xác định ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ môi. Thực hiện dò ngưỡng phát hiện với độ tin cậy 95% (LOD95%) bằng cách thực hiện phản ứng LAMP với dãy nồng độ plasmid tái tổ hợp được pha loãng tiệm cận với nồng độ của ngưỡng phát hiện sơ cấp
- Thực hiện phản ứng LAMP với những điều kiện tối ưu đã được khảo sát ở trên với mỗi nồng độ.
- Ngưỡng phát hiện là nồng độ ADN thấp nhất mà bộ môi nhận bản cho kết quả đặc hiệu, chính xác, rõ ràng.

Bước 4: Tạo chứng dương chuẩn cho kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

Thực hiện thực nghiệm quy trình tạo chứng dương cho bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR trên người bằng công nghệ ADN tái tổ hợp theo hướng dẫn NIMPE.HD 03. PP/44 theo các bước sau (phụ lục 1):

- Nhân bản đoạn gen đích chứa trình tự thiết kế môi LAMP bằng phương pháp PCR
- Tinh sạch sản phẩm PCR (thôi gel)
- Chèn đoạn ADN đích vào vector: Sử dụng vector pUC 19 để chèn đoạn ADN đích
- Biến nạp vector vào vi khuẩn *E. coli*.
- Phân tích kết quả biến nạp
- Nuôi cấy tăng sinh dòng tế bào chứa vector tái tổ hợp mang đoạn trình tự đích

- Tinh sạch vector mang trình tự ADN đích
- Xác định nồng độ ADN chứng dương và bảo quản chứng dương đã được tinh sạch ở -20°C

2.1.4.3 Chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột

- Tập hợp, sắp xếp các thành phần kit hóa chất cho phản ứng LAMP, chứng dương, chứng âm đóng gói hộp đựng bộ kit gồm 50 test/01 hộp gồm các thành phần sau:

Bộ kit gồm có tờ hướng dẫn sử dụng của bộ kit và được đóng gói theo đóng gói 50 phản ứng/ bộ gồm 6 ống hóa chất:

- + 1 ống: Hỗn hợp môi của GLĐR
- + 1 ống: Hỗn hợp đệm phản ứng LAMP
- + 1 ống: Enzyme xúc tác phản ứng
- + 1 ống: Chỉ thị màu Xanh malachit
- + 1 ống: Chuẩn dương
- + 1 ống: Nước khử ion không chứa Rnase.
- Chế tạo kit và đóng gói số lượng là 2000 test theo 2 đợt (năm 2018 và 2019), dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ để phục vụ cho hoạt động thử nghiệm và kiểm định.
- Hướng dẫn sử dụng bộ kit: bao gồm: Cấu thành sản phẩm (có những thành phần nào); Hướng dẫn xử lý mẫu trước khi xét nghiệm; Quy trình xét nghiệm; Diễn giải kết quả.

2.1.4.4 Xây dựng bộ tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit

- Tiêu chuẩn cơ sở được xây dựng dựa trên 6 tiêu chí với mục tiêu:

- + Nhận dạng kết quả sản phẩm: dễ quan sát bằng mắt thường kết quả dựa vào sự chuyển màu.
- + Độ nhạy của bộ kit: 95%.
- + Độ đặc hiệu của bộ kit: 95%.
- + Ngưỡng phát hiện của bộ kit: tương đương với các nghiên cứu về ứng dụng sinh học phân tử để chẩn đoán giun lươn.
- + Thời gian xét nghiệm: trong vòng 3 giờ.
- + Tính ổn định của bộ kit: bộ kit hoạt động ổn định ít nhất là 6 tháng.

2.1.5 Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Thu thập và bảo quản mẫu theo thường quy của Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương.
- Xử lý mẫu và tách chiết ADN: sử dụng phối hợp các phương pháp như nghiền cơ học, nhiệt, enzyme phân hủy và thu nhận ADN theo phương pháp tách từ hoặc cột.
- Thiết kế môi sử dụng các phần mềm tin sinh chuyên dụng như Primer Explorer v.5, Primer Blast, Mega 7 để tìm các vùng bảo tồn trên các vùng gene mục tiêu, thiết kế rồi kiểm tra các đặc tính của các oligonucleotide đã thiết kế.
- Kỹ thuật qPCR – Taqman Probe: xác định giun lươn đường ruột *S. stercoralis* theo Yasmin Sultana và cộng sự năm 2013 [116].
- Phương pháp điện di trên gel agarose 2% trong 30 phút cường độ dòng điện 100 mA.
- Phương pháp tạo dòng: Trình tự ADN 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 .
- Kỹ thuật giải trình tự trên máy giải trình tự ABI3500.

2.1.6 Các chỉ số đánh giá

- Bộ môi đặc hiệu cho giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis*: khả năng nhận diện ADN của giun lươn *Strongyloides stercoralis* mà không nhận diện ADN của sinh vật khác như ADN của giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp*, ADN người.
- Các điều kiện phản ứng: Nhiệt độ bất cặp môi, nồng độ Mg^{2+} , thời gian phản ứng, chất chỉ thị màu.
- Ngưỡng phát hiện: Là giới hạn nồng độ ADN của giun lươn *Strongyloides stercoralis* thấp nhất mà kỹ thuật LAMP còn phát hiện được 100%. Yêu cầu ngưỡng phát hiện tương đương với các nghiên cứu khác về LAMP để chẩn đoán giun lươn.
- Đánh giá chất lượng chứng dương: Tính chính xác, độ tinh sạch, nồng độ ADN. Chứng dương tạo ra cần đáp ứng đủ để thực hiện sản xuất test và còn để lưu trữ để sử dụng khi cần.
- Chế tạo bộ kit và đóng gói: chế tạo 2000 test đủ để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu tại phòng thí nghiệm, thực địa và tính ổn định của bộ kit. Quy cách đóng gói 50 test/ hộp, đủ các thành phần cần cho phản ứng LAMP kèm theo hướng dẫn sử dụng.

2.2 Mục tiêu 2: Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa

2.2.1 Đối tượng nghiên cứu

- Bộ kit LAMP sản phẩm của mục tiêu 1
- Mẫu phân thu thập được từ người đã xác định nhiễm, nghi ngờ nhiễm và không nhiễm GLĐR
- Mẫu huyết thanh của người nghi ngờ nhiễm và không nhiễm GLĐR.

2.2.2 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Thời gian: từ tháng 9 năm 2017 đến tháng 8 năm 2020.
- Địa điểm:
 - + Thực địa:
 - * Huyện Đức Hòa, tỉnh Long An
 - * Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch
 - * Khoa Khám bệnh chuyên ngành, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương.
 - + Phòng thí nghiệm:
 - * Khoa SHPT Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương.
 - * Bộ môn Vi sinh – Ký sinh, khoa Y, Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh.

2.2.3 Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm tại phòng thí nghiệm và tại thực địa.

2.2.3.1 Cơ mẫu

- **Mẫu dùng để đánh độ nhạy độ, đặc hiệu của bộ kit trong phòng thí nghiệm:**

Chúng tôi xây dựng một bộ mẫu tại phòng thí nghiệm có tỉ lệ dương tính *S. stercoralis* là 25% để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit nhằm đạt mục tiêu đánh giá với độ tin cậy trên 95%.

Số mẫu cần có để đánh giá độ nhạy được xác định bằng công thức [105]:

$$n_{se} = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P_{se} \times (1 - P_{se})}{W^2 \times P}$$

Trong đó:

n_{se} : Cỡ mẫu tối thiểu cần nghiên cứu để xác định độ nhạy

$Z^2_{1-\alpha/2}$: Hệ số tin cậy, với ngưỡng xác suất $\alpha = 0,05$, thì $Z^2_{1-\alpha/2} = 1,96$

P_{se} : Độ nhạy mong đợi của kit LAMP là: 95%

W: Sai số tương đối cho phép là 10% (0,1)

P: Tỷ lệ trường hợp dương tính trong bộ mẫu thử là: 25%

$$\text{Từ đó, tính được } n_{se} = \frac{Z_{\alpha}^2 \times P_{se} \times (1 - P_{se})}{W^2 \times 0,25} = \frac{1,96^2 \times 0,95 \times 0,05}{0,1^2 \times 0,25} \approx 73$$

Số mẫu cần có để đánh giá độ đặc hiệu được xác định bằng công thức [105]:

$$n_{sp} = \frac{Z_{\alpha}^2 \times P_{sp} \times (1 - P_{sp})}{W^2 \times (1 - P)}$$

Trong đó:

n_{sp} : Cỡ mẫu tối thiểu cần nghiên cứu để xác định độ đặc hiệu

$Z^2_{1-\alpha/2}$, W, P: tương tự như trên.

P_{sp} : Độ đặc hiệu mong đợi của kit LAMP là: 95%

$$\text{Từ đó, tính được } n_{sp} = \frac{1,96^2 \times 0,95 \times 0,05}{0,1^2 \times 0,75} \approx 24,3$$

Như vậy số mẫu cần dùng để đánh giá độ nhạy trong phòng thí nghiệm lớn hơn số mẫu cần dùng để đánh giá độ đặc hiệu trong phòng thí nghiệm. Vì vậy chúng tôi tính cỡ mẫu dựa vào số mẫu cần để đánh giá độ nhạy trong phòng thí nghiệm. Như vậy cỡ mẫu cần có là 73 mẫu, trong đó có 25% số mẫu dương, tương ứng với 19 mẫu.

Trên thực tế, chúng tôi đã tiến hành đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP trên bộ mẫu có 132 mẫu gồm: 100 mẫu phân không nhiễm GLDR và 32 mẫu phân có nhiễm GLDR. Như vậy bộ mẫu đủ điều kiện để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu trong phòng thí nghiệm.

- **Mẫu dùng để đánh giá tính ổn định của bộ kit**

Mẫu sử dụng để đánh giá tính ổn định của bộ kit tổng cộng 07 mẫu bao gồm: 03 mẫu chứng chuẩn dương (trong đó có 1 mẫu chuẩn dương có nồng độ xác định ở ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP), 02 mẫu dương tính thu thập từ người bệnh, 02 mẫu âm tính.

- **Mẫu dùng để đánh giá bộ kit tại thực địa:**

Để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit tại thực địa, chúng tôi tiến hành thu thập mẫu có chủ đích tại tỉnh Long An với số lượng là 300 mẫu. Tuy số lượng mẫu này là một hạn chế nhưng nó phù hợp với khả năng về điều kiện nhân lực, vật lực mà chúng tôi có thể thực hiện được trong thời gian nghiên cứu cũng như là bước đầu thăm dò hiệu quả của bộ kit tại thực địa.

- **Mẫu dùng để so sánh bộ kit với bộ môi khác có cùng mục đích tương tự:**

Sử dụng 50 mẫu gồm 25 mẫu dương tính và 25 mẫu âm tính đã được xác định bằng phương pháp real-time PCR.

- **Mẫu dùng để so sánh bộ kit với 2 phương pháp soi phân trực tiếp và ELISA (thường dùng hiện nay trong chẩn đoán giun lươn)**

Mẫu sử dụng để so sánh bộ kit với 2 phương pháp soi phân trực tiếp và ELISA để chẩn đoán giun lươn tại Khoa Khám bệnh chuyên ngành, Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương: dựa trên các mẫu lưu và mẫu thu tại Khoa Khám bệnh trong thời gian nghiên cứu. Những mẫu này tập trung vào các đối tượng nghi ngờ, có các triệu chứng lâm sàng. Số mẫu thu thập được

trong thời gian nghiên cứu là 141 mẫu.

2.2.3.2 Phương pháp chọn mẫu

- Mẫu phân thu từ người nhiễm GLĐR đã được xét nghiệm chẩn đoán xác định bằng các phương pháp hình thái học (soi KHV) và qPCR. Kỹ thuật qPCR xác định GLĐR theo nghiên cứu của tác giả Yasmin Sultana đã được công bố và đánh giá độ đặc hiệu hơn 99% so với phương pháp cấy phân Harada - Mori [116].
- Mẫu phân thu từ người nghi ngờ nhiễm GLĐR khi bệnh nhân đến khám tại Khoa khám bệnh chuyên ngành – Viện Sốt rét – Ký sinh trùng côn trùng Trung ương có triệu chứng hướng đến bệnh giun lươn hoặc có kết quả ELISA tìm kháng thể giun lươn dương tính. Kỹ thuật ELISA xác định kháng thể trong huyết thanh người: sử dụng bộ kit SciMedx *Strongyloides* serology microwell ELISA (SciMedx Corporation, Denville, NJ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Mẫu phân thu từ người khỏe mạnh bình thường, không có triệu chứng hướng đến nhiễm GLĐR.

2.2.4 Nội dung nghiên cứu

2.2.4.1 Chuẩn bị mẫu

Hoàn thiện quy trình thu thập, bảo quản mẫu gồm:

- Mẫu phân: Thu thập mẫu phân người đựng trong các túi nilon chuyên dụng, loại bỏ không khí, được dán nhãn phù hợp cho từng mẫu và được giữ ở điều kiện lạnh 4°C – 8°C cho đến khi chuyển về phòng thí nghiệm. Một phần phân được sử dụng để làm tiêu bản soi phát hiện AT trong vòng 24 giờ sau khi lấy mẫu. Một phần mẫu phân được bảo quản trong ống 1,5ml có chứa đệm PBS và ở -35°C cho đến khi được tách chiết ADN.

- Mẫu huyết thanh: thu thập mẫu máu tĩnh mạch, ly tâm thu khoảng 200 μ l huyết thanh trong ống 1,5ml, bảo quản ở -35°C cho đến khi thực hiện phản ứng ELISA.

2.2.4.2 Tách chiết ADN tổng số từ mẫu phân

Tách chiết ADN của ấu trùng *S. stercoralis* thu được từ mẫu phân bằng bộ kit thương mại QIAmp DNA stool Mini kit của hãng Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.4.3 Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit tại phòng thí nghiệm

Đánh giá độ nhạy độ đặc hiệu của bộ kit LAMP chẩn đoán GLDR trên 132 mẫu thu nhận từ ĐHYK Phạm Ngọc Thạch và các mẫu thu thập tại thực địa tỉnh Long An năm 2018. Tất cả các mẫu này đều đã được xét nghiệm thẩm định bằng phương pháp soi phân trực tiếp tìm ấu trùng giun lươn và qPCR.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp xét nghiệm qPCR làm phương pháp tham chiếu (chuẩn vàng) vì 2 phương pháp này đều ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán giun lươn. Mặt khác hiện nay chưa có bộ kit thương mại nào sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán giun lươn *Strongyloides stercoralis*. Phương pháp qPCR mà chúng tôi sử dụng dựa theo nghiên cứu của tác giả Yasmin Sultana đã được công bố và đánh giá độ đặc hiệu hơn 99% so với phương pháp cấy phân Harada - Mori [116].

2.2.4.4 Điều kiện bảo quản và tính ổn định của bộ kit

Bộ kit được đóng gói 50 phản ứng/kit và bảo quản trong nhiệt độ -20°C \pm 5°C.

Tính ổn định của bộ kit được tiến hành qua 3 thử nghiệm:

- Thử nghiệm thứ nhất: Mỗi tháng tiến hành thử nghiệm lại bộ kit vào một ngày nhất định với các điều kiện đã được tối ưu. Sau khi mở nắp, bộ kit được bảo quản ở 2-8°C.

- Thử nghiệm thứ hai: 3 tháng tiến hành thử nghiệm lại bộ kit một lần với các điều kiện đã được tối ưu. Sau khi mở nắp và thực nghiệm, bộ kit được bảo quản ở điều kiện - 20°C ± 5°C.

- Thử nghiệm thứ ba: Sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện - 20°C ± 5°C, tiến hành thực hiện thí nghiệm phản ứng LAMP với các điều kiện đã được tối ưu.

Mẫu sử dụng cho các thử nghiệm 7 mẫu với 3 mẫu chuẩn dương trong đó có 1 mẫu có nồng độ ở ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP, 02 mẫu âm tính, 02 mẫu âm tính. Tiến hành theo dõi trong 12 tháng để đánh giá sự ổn định của bộ kit.

2.2.4.5 Đánh giá bộ kit tại thực địa, so sánh bộ kit với các bộ kit khác đã được thương mại hóa trên thị trường hoặc các bộ môi có cùng mục tiêu đã được công bố trên các tạp chí uy tín và so sánh với 2 phương pháp chẩn đoán giun lươn thường dùng

- Đánh giá bộ kit tại thực địa:
- + Tập huấn kỹ thuật LAMP chẩn đoán GLĐR tại Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh.
- + Phối kết hợp với các cán bộ Trung tâm Y tế xã Lộc Giang, Tân Mỹ, Mỹ Hạnh Nam, Mỹ Hạnh Bắc, huyện Đức Hòa, tỉnh Long An tiến hành đánh giá bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR trên 300 mẫu thu thập tại địa phương.

- So sánh bộ kit với các bộ kit khác đã được thương mại hóa trên thị trường hoặc bộ mỗi có cùng mục tiêu đã được công bố trên các tạp chí uy tín:

+ Trên thị trường chưa có bộ kit chẩn đoán GLDR được thương mại hóa, do vậy, chúng tôi sử dụng bộ mỗi của Perdro- Fernandez- Soto và cộng sự (2016) được công bố trên tạp chí Plos Neglected tropical diseases [86] để so sánh với bộ kit LAMP trong nghiên cứu của chúng tôi.

+ Tổng số mẫu được sử dụng cho mục đích này là 50 mẫu: 25 mẫu dương tính và 25 mẫu âm tính. Tất cả các mẫu này đã được thẩm định bằng phương pháp qPCR. Mức độ đồng thuận giữa hai bộ mỗi được đánh giá qua hệ số Kappa.

- So sánh bộ kit LAMP với 2 phương pháp chẩn đoán giun lươn thường dùng hiện nay là soi phân và ELISA:

Đánh giá LAMP với 2 kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán giun lươn thường dùng hiện nay, chúng tôi thực hiện trên 141 mẫu của các bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng hoặc nghi ngờ nhiễm giun lươn đến khám tại Khoa Ký sinh trùng, Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương. Trên mỗi bệnh nhân, chúng tôi tiến hành đồng thời 3 phương pháp chẩn đoán giun lươn bao gồm soi phân, ELISA và LAMP. Mức độ đồng thuận giữa mỗi cặp phương pháp được đánh giá qua hệ số Kappa.

2.2.4.6 Đăng ký kiểm định bộ kit

Bộ tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit được đăng ký kiểm định tại Viện Quốc gia kiểm định vacxin và sinh phẩm y tế.

2.2.5 Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Thu thập và bảo quản mẫu theo thường quy của Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương.

- Xử lý mẫu và tách chiết ADN: sử dụng phối hợp các phương pháp như

nghiền cơ học, nhiệt, enzyme phân hủy và thu nhận ADN theo phương pháp tách từ hoặc cột.

- Kỹ thuật ELISA xác định kháng thể kháng giun lươn.
- Kỹ thuật xét nghiệm phân trực tiếp để soi tìm AT giun lươn
- Kỹ thuật qPCR – Taqman Probe: xác định giun lươn đường ruột *S. stercoralis* theo Yasmin Sultana và cộng sự năm 2013 [116].
- Phương pháp điện di trên gel agarose 2% trong 30 phút cường độ dòng điện 100 mA.

2.2.6 Các chỉ số đánh giá

- Độ nhạy: lấy phương pháp qPCR làm tham chiếu, chỉ tiêu đề ra là độ nhạy phải hơn 95%.
- Độ đặc hiệu: lấy phương pháp qPCR làm tham chiếu, chỉ tiêu đề ra là độ đặc hiệu phải hơn 95%.
- Trị số K khi so sánh bộ kit LAMP với bộ môi tương đương hoặc các phương pháp chẩn đoán giun lươn khác.
- Tính ổn định: bộ kit phải hoạt động ổn định ít nhất sau 6 tháng bảo quản trong điều kiện phù hợp.
- Bộ tiêu chuẩn cơ sở được thẩm định bởi cơ quan uy tín.

2.2.7 Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm MedCalc để tính toán xử lý kết quả thu được

- Tính độ nhạy, độ đặc hiệu, hệ số Kappa trên phần mềm MedCalc để tính toán xử lý kết quả. Tính sai số giữa lô thử nghiệm, lần thử nghiệm bằng độ lệch chuẩn SD.
- Độ nhạy, độ đặc hiệu của test được tính toán theo bảng 2x2 như sau:

Bảng 2.5 Bảng tính độ nhạy, độ đặc hiệu

Phương pháp cần xác định	Phương pháp tham chiếu		Tổng
	Dương	Âm	
Dương	a	b	a + b
Âm	c	d	c + d
Tổng	a + c	b + d	a + b + c + d (n)

+ Độ nhạy hay tỉ lệ dương tính thật của xét nghiệm chẩn đoán LAMP (P_{se}):

$$a/(a+c)$$

+ Độ đặc hiệu hay tỉ lệ âm tính thật của xét nghiệm chẩn đoán LAMP (P_{sp}):

$$d/(b+d)$$

- So sánh tương đồng kết quả giữa các phương pháp xét nghiệm: Sử dụng chỉ số KAPPA để đánh giá mức độ tương đồng của các xét nghiệm dựa vào bộ kit LAMP chế tạo và phương pháp xét nghiệm sử dụng tham chiếu

$$\text{Hệ số Kappa (K)} = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Trong đó:

+ P_o : Tỉ lệ quan sát 2 xét nghiệm đều cho kết quả giống nhau (cả hai cùng âm

hoặc cùng dương) = $\frac{a+d}{n}$

+ P_e : Tỉ lệ phù hợp mong muốn = $P_e (+) + P_e (-)$

$$P_e (+) = \frac{a+b}{n} \times \frac{a+c}{n}$$

$$Pe (-) = \frac{c+d}{n} \times \frac{b+d}{n}$$

Các mức độ đánh giá của chỉ số Kappa:

0 - 0,2: phù hợp rất thấp

0,2 - 0,4: phù hợp thấp

0,4 - 0,6: phù hợp vừa

0,6- 0,8: phù hợp khá

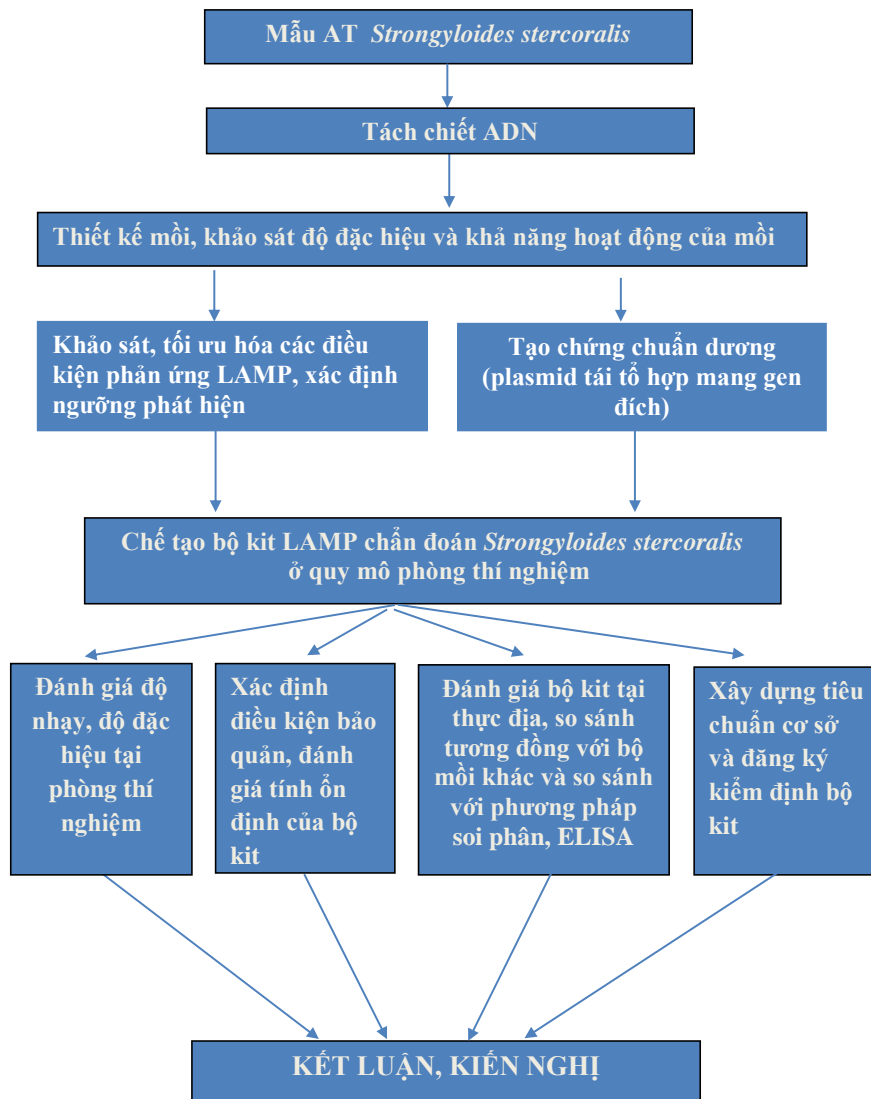
0,8- 1,0: phù hợp cao

2.3 Kiểm soát sai số

- Kiểm soát quá trình thực nghiệm dựa trên các quy trình chuẩn, biên soạn các quy trình trước khi thực hiện, tuân thủ theo tiêu chuẩn phòng thí nghiệm ISO 15189.
- Mã hóa số liệu: lô thử nghiệm, đợt thử nghiệm, ngày thử nghiệm, người thử nghiệm.

2.4 Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ đầy đủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học theo quy định của Bộ Y tế. Đề cương nghiên cứu đã được thông qua hội đồng y đức của Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương.

Sơ đồ nghiên cứu:

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Qua thời gian nghiên cứu từ tháng 9/2017 đến tháng 8/2020 tại phòng thí nghiệm và thực địa, kết quả nghiên cứu được trình bày theo các mục tiêu cụ thể như sau:

3.1 Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở người

3.1.1 Kết quả thiết kế môi

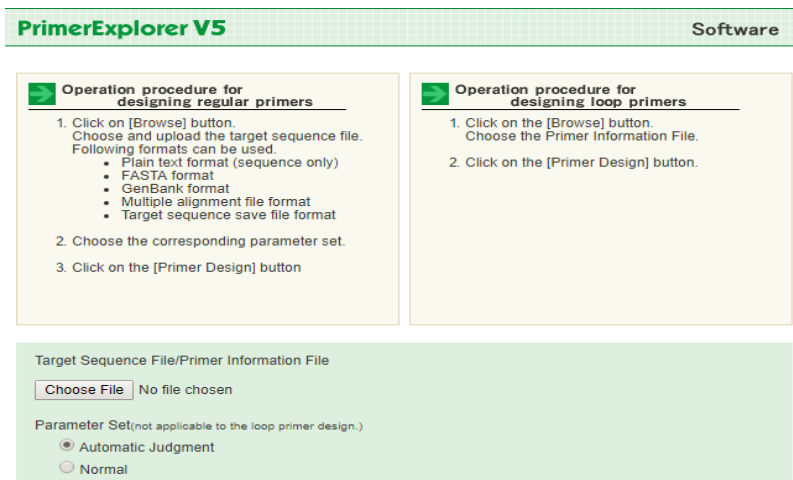
3.1.1.1 Kết quả trình tự của bộ môi

Tiến hành tải 30 trình tự gen 18S rRNA của giống *Strongyloides*, trên ngân hàng dữ liệu NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) và sử dụng phần mềm MEGA 7 với tính năng Clustal W để sắp giống các trình tự của các loài nhằm tìm ra vùng bảo tồn đặc trưng cho *S. stercoralis*

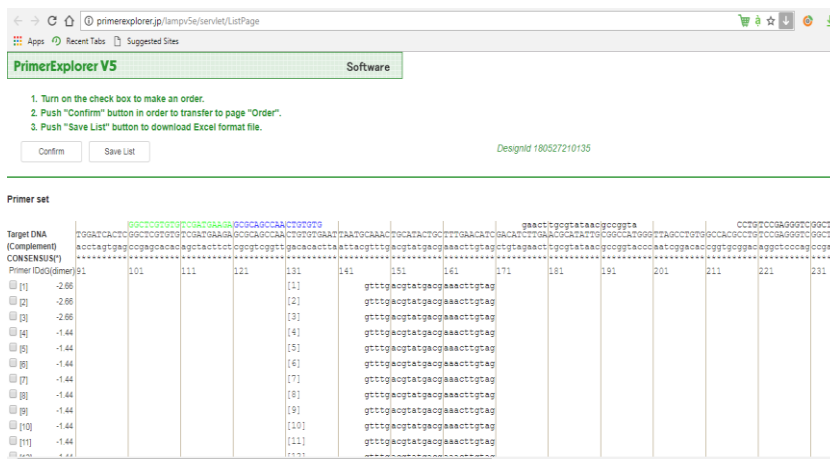


Hình 3.1. Kết quả giống hàng của 30 trình tự giun lươn đường ruột trên phần mềm MEGA 7.

Kết quả thu được đoạn trình tự bảo tồn cho *S. stercoralis* có kích thước 596bp. Sử dụng phần mềm Primer Explorer v.5 (Eiken, Nhật bản) để thiết kế mỗi LAMP đặc hiệu cho giun lươn đường ruột trên vùng trình tự bảo tồn này



Hình 3.2 Phần mềm Primer Explorer V5 để thiết kế mỗi LAMP



Hình 3.3 Bộ mỗi được thiết kế từ phần mềm Primer Explorer V5

Kết quả bộ mỗi thu được có trình tự như sau:

Bảng 3.1 Trình tự mồi LAMP thiết kế để chẩn đoán giun lươn đường ruột

Tên mồi	Trình tự mồi	Độ dài của mồi
F3	AGAGGGTTTAAACCAGACATT	21
B3	CTTCGAACCTCTAACTTTCGTT	22
FIP	GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA- GGTCTAGCATGGAATAAACA	45
BIP	TACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGAC- CTTGATTAATGAAAACATTCTTGGC	50
LF	GGTCTAGCATGGAATAAACA	21
LB	GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA	24

Về mặt kích thước, các mồi F3, B3 thiết kế đều đạt yêu cầu về chiều dài (từ 21 đến 25 nucleotit).

Bảng 3.2 Vị trí của các mồi được thiết kế

Tên mồi	Vị trí đầu 5'	Vị trí đầu 3'	Độ dài (bp)
F3	285	305	21
B3	510	489	22
LF	316	336	21
LB	488	465	24

Sản phẩm khuếch đại sau phản ứng LAMP bằng cặp mồi F3-B3 có kích thước theo lý thuyết là 226 bp < 250 bp.

Bảng 3.3 Khoảng cách giữa các môi được thiết kế

Khoảng cách	Độ dài (bp)	Yêu cầu
Đầu 5' của F2 đến đầu 5' của B2	152	120 – 180
Đầu 5' của F2 đến đầu 3' của F1	45	40 – 60
Đầu 5' của B2 đến đầu 3' của B1	50	40 – 60
Đầu 3' của F3 đến đầu 5' của F2	11	0 – 20
Đầu 3' của B3 đến đầu 5' của B2	1	0 – 20

Khoảng cách giữa các môi đều thỏa mãn yêu cầu của hệ môi.

Bảng 3.4 Nhiệt độ nóng chảy và khả năng tạo bắt cặp dimer môi (dG <- 2,34) của bộ môi xác định giun lươn đường ruột

Tên môi	Nhiệt độ nóng chảy T _m	5'dG	3'dG	Tỷ lệ GC
F3	56,60	-5,53	-4,06	0,38
B3	57,89	-5,04	-4,85	0,41
FIP				
BIP				
LF	56,79	-4,43	-4,55	0,43
LB	63,00	-7,64	-3,15	0,46

- Về thành phần %GC, các môi đều có %GC nằm trong tỉ lệ cho phép (38% - 46%).
- Nhiệt độ nóng chảy của các cặp môi đều thỏa mãn điều kiện của môi LAMP chuẩn.
- Mức năng lượng tự do ở các đầu 3' của các môi F2/B2; F3/B3; LF/LB và đầu 5' của F1c/B1c được thiết kế có ΔG từ -7,64 đến -4,06 < -4Kcal/mol, đây là yêu cầu bắt buộc đối với một bộ môi LAMP.

Như vậy, bộ mồi chúng tôi thiết kế đáp ứng đủ các điều kiện đề ra của một hệ mồi LAMP.

3.1.1.2 Khảo sát tính đặc hiệu của bộ mồi

Tính đặc hiệu của bộ mồi được khảo sát bằng cả lý thuyết và thực nghiệm.

Trên lý thuyết để khẳng định sản phẩm PCR khuếch đại bằng bộ mồi đúng là trình tự của loài *Strongyloides stercoralis*, chúng tôi sử dụng chương trình Primer Blast trên NCBI để kiểm tra tính đặc hiệu của cặp mồi F3-B3. Kết quả thu được cho thấy, mồi bắt cặp hoàn toàn với trình tự 18S rRNA của *Strongyloides stercoralis* được công bố trên NCBI.

PRIMER BLAST RESULTS

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) [Search Summary]
 Other reports

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGGCGGTTAAACCCAGACAT	21	54.71	36.10	10.00	1.00
Reverse primer	CTTGGAACTCTAACTTTGGTT	22	56.42	40.91	6.00	2.00

Products on target templates

>MH1053633.1 Strongyloides stercoralis isolate IQ-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 226
 forward primer 1 AGAGGCGGTTAAACCCAGACAT 21
 Template 329 343
 Reverse primer 1 CTTGGAACTCTAACTTTGGTT 22
 Template 518 527

>MH1053632.1 Strongyloides stercoralis isolate IQ-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 236
 forward primer 1 AGAGGCGGTTAAACCCAGACAT 21
 Template 329 343
 Reverse primer 1 CTTGGAACTCTAACTTTGGTT 22
 Template 548 527

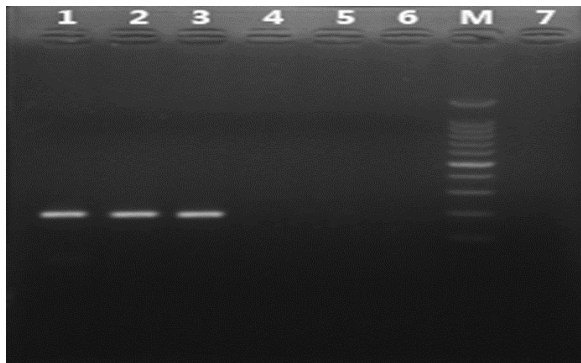
Hình 3.4: Kết quả khảo nghiệm tính đặc hiệu trên ngân hàng gen

- Khảo sát bằng thực nghiệm: *Kiểm tra phản ứng chéo của bộ mồi thiết kế*

Để kiểm tra phản ứng chéo của bộ mồi thiết kế, chúng tôi đã tiến hành các bước sau:

- + Thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi F3/B3 với mẫu ADN của giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp...*
- + Điện di kiểm tra sản phẩm nhân bản trên gel agarose.
- + Kết quả đạt yêu cầu khi không có sản phẩm nhân bản của cặp mồi F3/B3 thiết kế với ADN của giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp...*

Kết quả sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% để kiểm tra sự bắt cặp của mồi trên gen 18S của từng loài.



Hình 3.5: Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi F3-B3 của *Strongyloides stercoralis*

Làn 1-3: *Strongyloides stercoralis*

Làn 4: Giun móc *Ancylostoma duodenale*

Làn 5: Giun mỏ *Necator americanus*

Làn 6: *Gnathostoma sp*

Làn 7: Chứng âm

Bảng 3.5 Kết quả đánh giá tính đặc hiệu của cặp mồi

Commented [BH1]: Em xem lại format tiêu đề của các bảng nhé

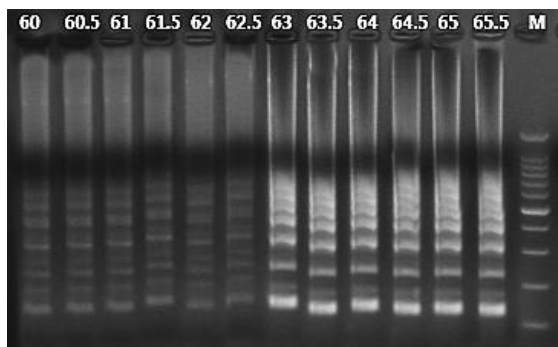
ADN	Mồi F3-B3
Giun lươn đường ruột	+
Giun móc	-
Giun mỏ	-
<i>Gnathostoma sp</i>	-

Từ kết quả điện di trên gel agarose 2% cho thấy chứng dương: có vạch sản phẩm với kích thước như dự kiến (226bp), không xuất hiện băng phụ và nhiệt độ biến tính đúng thiết kế. Chứng âm không có sản phẩm khuếch đại. Như vậy, kết quả này cho thấy không có sự bắt cặp chéo của cặp mồi với các loài khác, chứng tỏ mồi hoạt động tốt, thể hiện tính đặc hiệu của hệ mồi.

3.1.2 Kết quả xác định các điều kiện phản ứng LAMP với bộ mồi tự thiết kế

3.1.2.1 Nhiệt độ của phản ứng LAMP

Một đặc điểm đặc trưng của LAMP là khuếch đại ADN hiệu quả trong điều kiện đẳng nhiệt với nhiệt độ phù hợp cho phản ứng có thể dao động từ 50-68°C. Nhiệt độ môi tính theo lý thuyết là nhiệt độ tham khảo, nhiệt độ bắt cặp thực sự có thể cao hơn 3-12°C so với nhiệt tính toán. Trên cơ sở này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát nhiệt độ trong khoảng từ 60°C đến 65°C, ngoại trừ sự thay đổi về nhiệt độ lai còn các thành phần khác (ADN bản mẫu, mồi, đệm phản ứng...) và các điều kiện khác (điều kiện về thiết bị, thời gian phản ứng,) của phản ứng đều được giữ nguyên và đồng nhất, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy không có sự khác biệt giữa 3 điểm nhiệt độ khảo sát là 63°C, 64°C, 65°C (Hình 3.6).

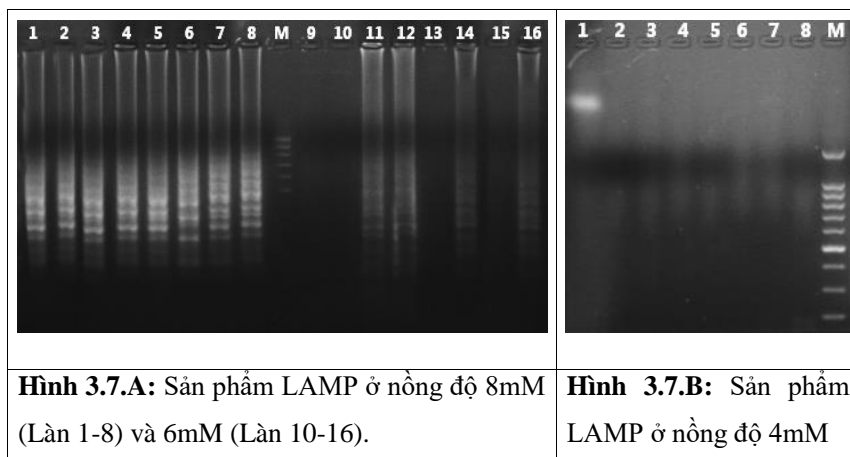


Hình 3.6 Sản phẩm LAMP khảo sát ở dải nhiệt độ 60^oC – 65^oC

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn điểm nhiệt độ trung bình là 63^oC cho phản ứng LAMP. Nhiệt độ 63^oC được đánh giá là tạo điều kiện ủ môi và tăng cường khả năng chịu đựng các chất ức chế thường được tìm thấy trong các mẫu chẩn đoán bệnh; một lợi thế polymerase khác. Đây cũng là nhiệt độ phù hợp nhất cho hoạt tính xúc tác của enzyme trong vi khuẩn so với *Bacillus* tự nhiên. Từ kết quả nghiên cứu này, nhiệt độ 63^oC được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2.2 Nồng độ MgSO₄

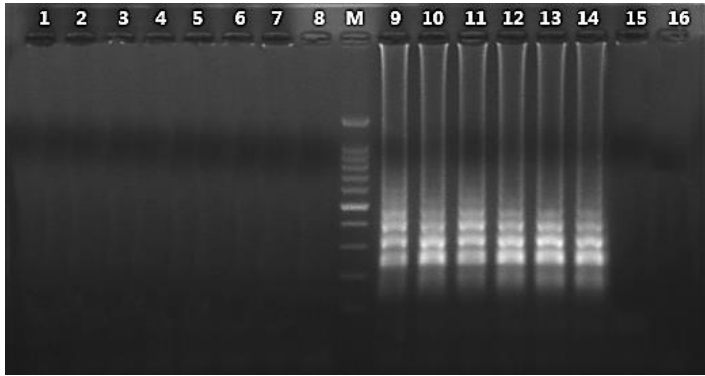
Trong phản ứng LAMP, nồng độ MgSO₄ thích hợp thường nằm trong khoảng 4mM đến 8mM. Khi tiến hành khảo sát nồng độ MgSO₄, chúng tôi tiến hành các phản ứng ở cùng nhiệt độ là 63^oC (nhiệt độ tối ưu từ thử nghiệm ở trên), thành phần các chất tham gia phản ứng là như nhau, chỉ khác biệt về nồng độ MgSO₄: 4mM, 6mM và 8mM, thí nghiệm được lặp lại ba lần. Kết quả được đánh giá thông qua điện di sản phẩm trên gel agarose 2% (hình 3.7A, B)



Sau khảo sát, chúng tôi nhận thấy rằng, $MgSO_4$ ở nồng độ 4mM không có sản phẩm khuếch đại, $MgSO_4$ ở nồng độ 6mM cho sản phẩm không ổn định, hiệu suất không cao, $MgSO_4$ ở nồng độ 8mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định. Do vậy, chúng tôi chọn $MgSO_4$ ở nồng độ 8mM là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP.

3.1.2.3 Thời gian tiến hành phản ứng LAMP

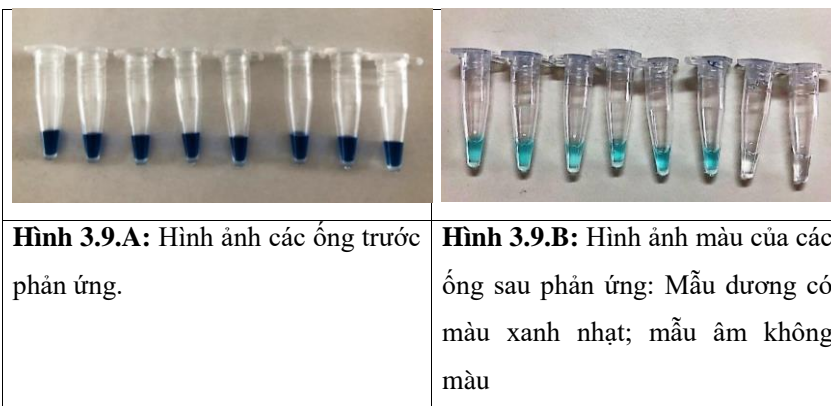
Tiến hành khảo sát thời gian tối thiểu thực hiện phản ứng LAMP ở các mức điều kiện thời gian 40 phút, 60 phút, trừ sự thay đổi về thời gian còn các thành phần (ADN khuôn, môi, đệm phản ứng, nồng độ $MgSO_4$ tối ưu từ thử nghiệm ở trên là 8mM...) và các điều kiện khác (thiết bị...) của phản ứng đều được giữ nguyên và đồng nhất, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để khuếch đại ADN trong phản ứng LAMP của bộ kit là 60 phút (hình 3.8).



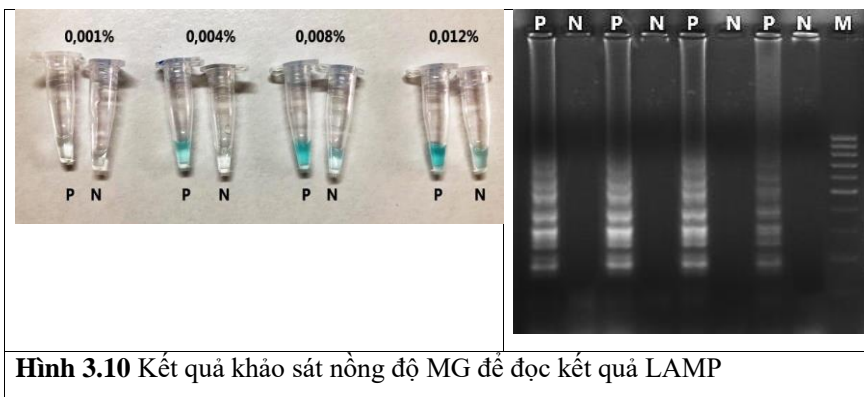
Hình 3.8 Sản phẩm LAMP sau thời gian phản ứng 40 phút (Làn 1-8) và 60 phút (Làn 9-16).

3.1.2.4 Chất chỉ thị màu sử dụng để đọc kết quả LAMP.

Chất chỉ thị màu Xanh malachite (MG), $[[C_6H_5C(C_6H_4N(CH_3)_2)_2]Cl]$ đã được sử dụng thành công như là 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 (pH < 2: vàng, pH = 3 - 9: xanh lam, pH > 10: không màu). Bước sóng hấp thụ cho MG là 621nm. 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.



Các nồng độ MG được khảo sát là 0,0012%, 0,008%, 0,004% và 0,001%. Mỗi một nồng độ được tiến hành lặp lại 3 lần, kết quả được quan sát và ghi nhận bởi 3 người độc lập.



Hình 3.10 Kết quả khảo sát nồng độ MG để đọc kết quả LAMP

Bảng 3.6 Báo cáo quan sát chất chỉ thị màu MG ở các nồng độ khác nhau trong thử nghiệm LAMP.

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%

*: Mỗi nồng độ lặp lại 3 lần, với 4 mẫu và được ghi nhận bởi 3 người quan sát độc lập. Tổng cộng ở mỗi nồng độ có 36 lần đọc.

Kết quả cho thấy có sự tương đồng 100% giữa 3 người quan sát và kết luận nồng độ MG 0,004% là nồng độ tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính. Nồng độ MG cao hơn dẫn đến sự gia tăng dương tính giả, Nồng độ MG thấp sẽ không thể phân biệt được mẫu âm và mẫu dương. Màu xanh lam ở các ống mẫu dương tính sau phản ứng vẫn còn nguyên màu cho đến tối đa 6 tuần, ở điều kiện nhiệt độ phòng. Thời gian sau 6 tuần không được nghiên cứu. Các thí nghiệm sau đó đã được thực hiện bằng cách sử dụng nồng độ cuối cùng là 0,004% MG.

3.1.3 Ngưỡng phát hiện của bộ kit LAMP

Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP xác định giun lươn đường ruột được xác định bằng cách thực hiện phản ứng LAMP với nền mẫu là dây nồng độ ADN pha loãng từ plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen 18S rRNA đặc trưng của *Strongyloides stercoralis*. Thử nghiệm được chia làm hai giai đoạn.

Giai đoạn một: Thực hiện dò điểm giới hạn phát hiện sơ cấp bằng cách thực hiện phản ứng LAMP với dây 6 nồng độ plasmid tái tổ hợp được pha loãng bậc 10 liên tiếp (từ 10^{-6} ng/ μ L đến 10^{-11} ng/ μ L). Nồng độ thấp nhất mà tại đó luôn có sản phẩm khuếch đại sau phản ứng LAMP chính là ngưỡng phát hiện sơ cấp cần tìm.

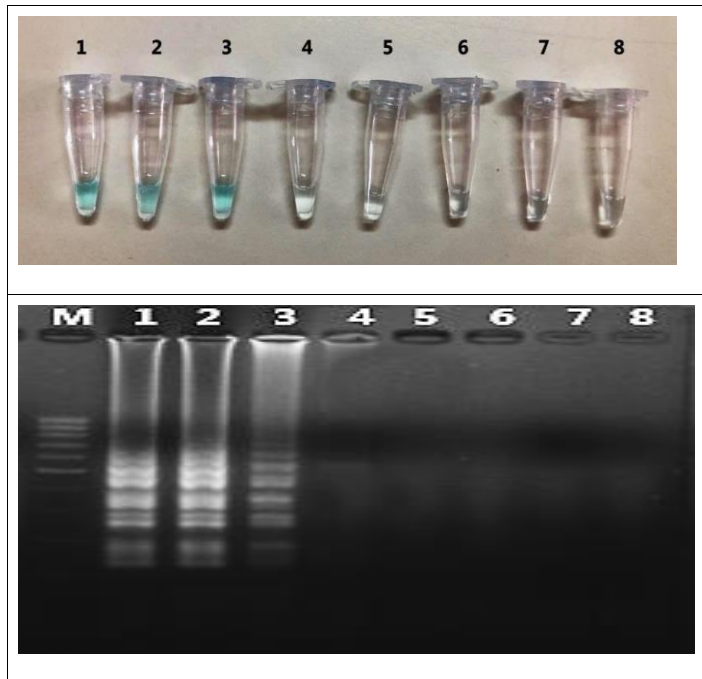
Giai đoạn hai: Thực hiện dò ngưỡng phát hiện với độ tin cậy 95% (LOD95%) bằng cách thực hiện phản ứng LAMP với dây nồng độ plasmid tái tổ hợp được pha loãng tiệm cận với nồng độ của ngưỡng phát hiện sơ cấp của giai đoạn 1.

Bảng 3.7 Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ mồi LAMP

Nồng độ (ng/ μ L)	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 mồi là 10^{-8} ng/ μ L tương ứng với $2,82 \times 10^0$ copies/ μ L.

Kết quả được đánh giá bằng cách quan sát sự thay đổi màu dung dịch trong các ống sau phản ứng LAMP và điện di sản phẩm trên gel agarose 2%.



Hình 3.11. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ mồi LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột.

Ống 1: nồng độ ADN 10^{-6} ng/ μ L.

Ống 5: nồng độ ADN 10^{-10} ng/ μ L.

Ống 2: nồng độ ADN 10^{-7} ng/ μ L.

Ống 6: nồng độ ADN 10^{-11} ng/ μ L

Ống 3: nồng độ ADN 10^{-8} ng/ μ L.

Ống 7: Chứng âm 1

Ống 4: nồng độ ADN 10^{-9} ng/ μ L.

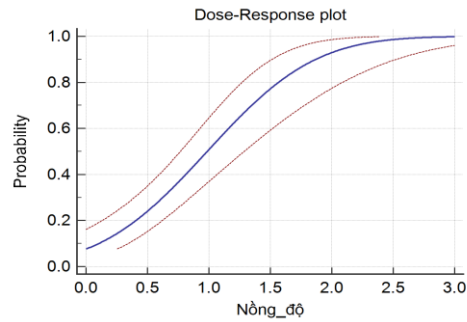
Ống 8: chứng âm 2

Hình ảnh chất chỉ thị màu và chất điện di cũng thể hiện ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ mồi là 10^{-8} ng/ μ L.

Bảng 3.8 Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ kit chẩn đoán giun lươn đường ruột

TT	Nồng độ (ng/ μ l)	Số lượng bản sao (bản sao gen/ μ l)	Số lần lặp lại	Số lần đương tính	Tỉ lệ đương tính (%)
1	1×10^{-6}	$2,82 \times 10^2$	12	12	100,00
2	1×10^{-7}	$2,82 \times 10^1$	12	12	100,00
3	1×10^{-8}	$2,82 \times 10^0$	12	12	100,00
4	$7,5 \times 10^{-9}$	$2,12 \times 10^0$	12	11	91,67
5	5×10^{-9}	$1,41 \times 10^0$	12	8	66,67
6	$2,5 \times 10^{-9}$	$7,05 \times 10^{-1}$	12	6	50,00
7	$1,25 \times 10^{-9}$	$3,53 \times 10^{-1}$	12	4	33,33
8	1×10^{-9}	$2,82 \times 10^{-1}$	12	2	16,67
9	$6,25 \times 10^{-10}$	$1,41 \times 10^{-1}$	12	1	8,33
10	$3,125 \times 10^{-10}$	$7,05 \times 10^{-2}$	12	0	0,00
11	0	0	12	0	0,00

LOD95% của của bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR sau khảo sát là $2,12 \times 10^0$ số bản sao gen/ μ L (95% CI: $1,71 \times 10^0$ bản sao gen/ μ l đến $2,89 \times 10^0$ bản sao gen/ μ l). Đây là ngưỡng phát hiện tốt, cho phép phát hiện tác nhân gây bệnh ở mật độ thấp.

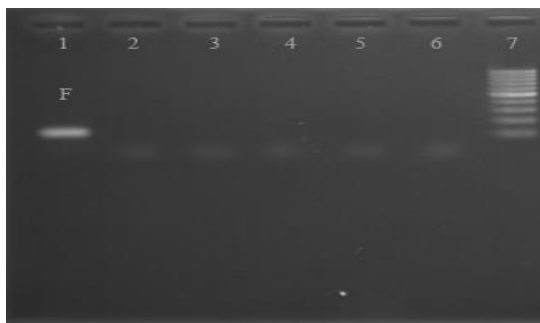


Hình 3.12. Đồ thị biểu diễn LOD 95% của bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR.

3.1.4 Kết quả xây dựng chứng dương

3.1.4.1 Kết quả nhân bản đoạn gen đích chứa trình tự thiết kế mồi LAMP bằng phương pháp PCR

Thực hiện PCR đơn với cặp mồi đặc hiệu nhân bản đoạn trình tự đích bao chọn vùng trình tự thiết kế mồi LAMP sử dụng để xác định GLĐR trên gen 18S rRNA từ mẫu ADN chuẩn. Điện di để kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1%.



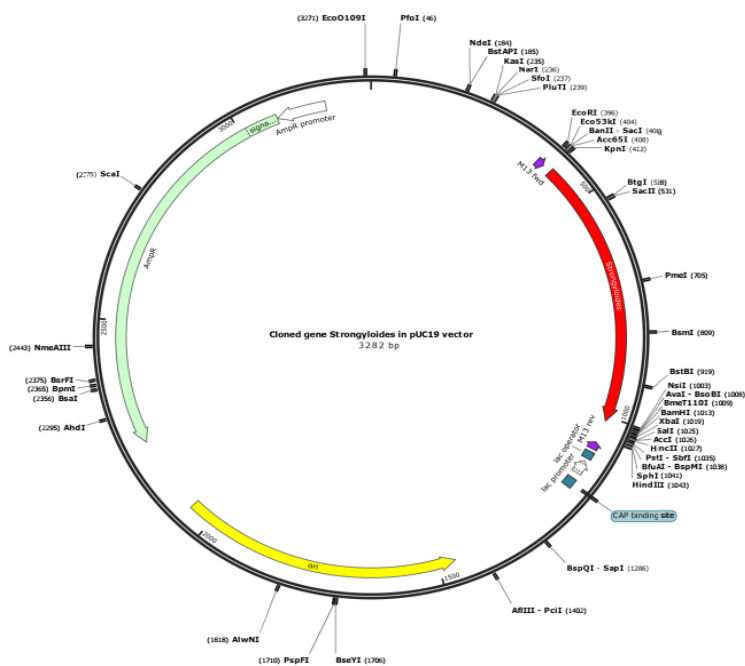
Hình 3.13. Sản phẩm PCR chứa trình tự gen đích *Strongyloides stercoralis*

Kết quả thu được đoạn gen đích có kích thước 226 bp đúng như kích thước thiết kế.

Các băng ADN này được tiến hành tinh sạch và giải trình tự so sánh với gen 18S rRNA của *Strongyloides stercoralis* trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy có sự tương đồng 98% giữa hai trình tự này. Như vậy, sản phẩm PCR này có thể sử dụng để chuyển vào vector tách dòng.

3.1.4.2 Kết quả biến nạp vector

Sản phẩm PCR ở trên được tinh sạch (thôi gel), sau đó được chèn vào vector pUC19, sau đó hóa biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 α TM-T1^R và nuôi cấy chọn lọc trên môi trường LB chứa kanamycin.



Hình 3.14. Plasmid tái tổ hợp mang gen 18S rRNA của giun lươn đường ruột.

Theo dõi khuẩn lạc mọc, lựa chọn khuẩn lạc trắng mọc riêng rẽ trên đĩa để xác định khả năng chứa plasmid tái tổ hợp. Thu nhận các khuẩn lạc mọc được trên đĩa môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin nồng độ cuối cùng là 50 µg/ml để tách DNA plasmid. Nhân kiểm tra plasmid bằng phản ứng PCR với cặp mồi M13 và giải trình tự, so sánh với ngân hàng gen có tỷ lệ tương đồng 98% chứng tỏ đoạn gen đích đã được chèn thành công.

Đoạn trình tự bảo tồn trên gen 18S rRNA của giun lươn đường ruột có kích thước 596 bp được chèn vào vector pUC19 và nhân dòng. Kết quả chúng tôi thu được Plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen 18S rRNA đặc trưng cho giun lươn đường ruột có kích thước 3282bp. Lượng Plasmid thu hồi là 5µg và hòa tan trong 50µL để thu được nồng độ 100ng/µL, tương đương với $2,82 \times 10^{10}$ copies/µL.

3.1.5 Kết quả chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis*

Chúng tôi đã chế tạo kit và đóng gói với số lượng là 2000 test ở quy mô phòng thí nghiệm để phục vụ cho hoạt động thử nghiệm và kiểm định. Bộ kit được đóng gói 50 phản ứng/bộ gồm: Tờ hướng dẫn sử dụng của bộ kit (Phụ lục 2) và 6 ống hóa chất với thành phần và số lượng cụ thể theo bảng sau

Bảng 3.9 Thành phần của bộ kit

Số TT	Thành phần (Dung dịch)	Thể tích (50 phản ứng)	Số lượng (ống)
01	WT – 01	800 μ L	01
02	STE-MM – 02	650 μ L	01
03	STE-PM – 03	130 μ L	01
04	Bst-Taq – 04	52 μ L	01
05	MG – 05	50 μ L	01
06	STE-PC – 06	102 μ L	01

Ngoài hộp của bộ kit có nhãn với đầy đủ thông tin về lô sản xuất, ngày hết hạn, điều kiện bảo quản, nơi sản xuất.



Hình 3.15 Hình ảnh bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột.

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN BỘ KIT LAMP CHẨN ĐOÁN GIUN LƯƠN *Strongyloides stercoralis*.

Nội dung của tờ hướng dẫn gồm những điểm chính sau:

- **Giới thiệu**

+ Nêu nguyên tắc của phương pháp LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột: Bộ Kit này dùng để phát hiện *Strongyloides stercoralis* bằng kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian (LAMP - Loop Isothermal Median Amplification). Bộ Kit bao gồm các thành phần cơ bản của một phản ứng LAMP, sử dụng các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế trên vùng gen 18S rRNA của *S. stercoralis* để phát hiện loài này một cách chính xác với độ nhạy cao.

+ Nền mẫu sử dụng của bộ kit là ADN tách chiết từ mẫu mô, mẫu phân hoặc mẫu nước tiểu.

- **Thành phần và quy cách đóng gói**

Nêu rõ cách đóng gói của bộ kit là 50 phản ứng/hộp và bộ kit gồm 6 hộp hóa chất được trình bày rõ về tên và số lượng tóm tắt trong một bảng

- **Hướng dẫn sử dụng:** Bao gồm 4 tiểu mục nhỏ

+ Chuẩn bị phản ứng LAMP: Nêu rõ các bước tiến hành phản ứng LAMP

+ Điều kiện phản ứng LAMP: Nêu rõ điều kiện nhiệt và thời gian của phản ứng LAMP.

+ Phiên giải kết quả: Nêu rõ cách đọc kết quả của bộ kit.

+ Các tình huống phát sinh và cách xử lý: Nêu rõ các tình huống có thể xảy ra trong quá trình sử dụng bộ kit và cách xử lý.

- **Độ nhạy, độ đặc hiệu:** Nêu rõ độ nhạy, độ đặc hiệu và ngưỡng phát hiện của bộ kit. Số lượng mẫu đã được sử dụng để đánh giá các chỉ số trên.

- **Một số lưu ý:** Nêu rõ một số điểm cần chú ý để đảm bảo sử dụng bộ kit hiệu quả và đảm bảo độ tin cậy kết quả.
- **Điều kiện bảo quản:** Nêu rõ điều kiện bảo quản của bộ kit $-20^{\circ}\text{C} \pm 5$
- **Hạn dùng:** Nêu rõ hạn dùng của bộ kit là 1 năm kể từ ngày sản xuất khi dung dịch chưa mở nắp và 06 tháng sau khi mở nắp.
- **Nơi sản xuất:** Nêu rõ bộ kit là sản phẩm của đề tài cấp nhà nước với mã số KC10.16/16-20 và được sản xuất thử nghiệm tại Viện sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương
- **Tài liệu tham khảo:** Nêu rõ các tài liệu tham khảo chính về nguyên lý của kỹ thuật LAMP dùng để chẩn đoán giun lươn *Strongyloides stercoralis*.

3.2 Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa

3.2.1 Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP tại phòng thí nghiệm

Tiến hành đánh giá độ nhạy độ đặc hiệu trên 132 mẫu phân thu thập tại tỉnh Long An và các mẫu thu từ ĐHYK Phạm Ngọc Thạch năm 2018.

Bảng 3.10 Tóm lược kết quả xét nghiệm mẫu phân chẩn đoán GLĐR bằng các phương pháp soi phân trực tiếp và real-time PCR

Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	
	(+)	(-)
Dương tính	32	0
Âm tính	0	100
Tổng	32	100

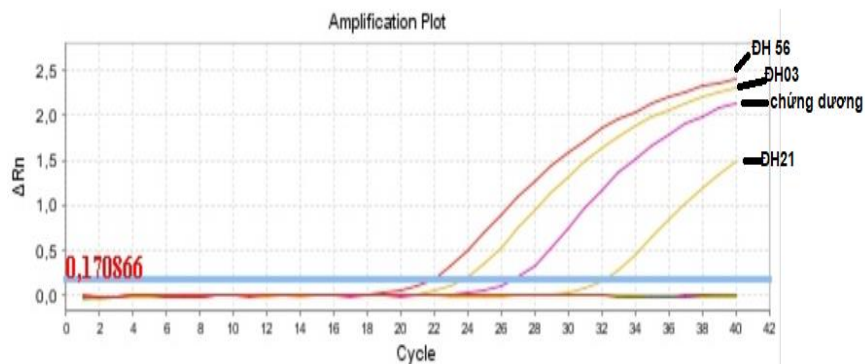
Xét nghiệm 132 mẫu phân thu thập tại tỉnh Long An và thu từ ĐHYK

Phạm Ngọc Thạch năm 2018 bằng các phương pháp soi phân trực tiếp, real-time PCR cho kết quả như nhau gồm 32 mẫu dương tính và 100 mẫu âm tính (bảng 3.10 và phụ lục 3)

Bảng 3.11 Tóm lược kết quả xét nghiệm mẫu phân chẩn đoán GLĐR bằng các phương pháp soi phân trực tiếp và LAMP.

Soi phân trực tiếp	LAMP	
	(+)	(-)
Dương tính	31	1
Âm tính	3	97
Tổng	34	98

Xét nghiệm chẩn đoán GLĐR 132 mẫu phân trên bằng phương pháp LAMP thì có kết quả là có 34 mẫu dương tính và 98 mẫu âm tính (bảng 3.11 và phụ lục 3)



Hình 3.16 Kết quả real-time PCR

Bảng 3.12 Kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột

Kết quả kit LAMP	Mẫu phân xét nghiệm <i>Strongyloides stercoralis</i> đã được xác định bằng qPCR		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	31	3	34
Âm tính	1	97	98
Tổng số	32	100	132
	Độ nhạy Se: 96,88% (95% CI: 83,78% - 99,92%)		
	Độ đặc hiệu Sp: 97,00% (95% CI: 91,48% - 99,38%)		

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tính toán độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP so sánh với phương pháp qPCR làm phương pháp tham chiếu (chuẩn vàng). Kết quả ở bảng 3.12 thể hiện độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR lần lượt là 96,88% và 97%. Như vậy bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, đáp ứng yêu cầu đối với một bộ kit xét nghiệm chẩn đoán.

3.2.2 Điều kiện bảo quản và độ ổn định của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột

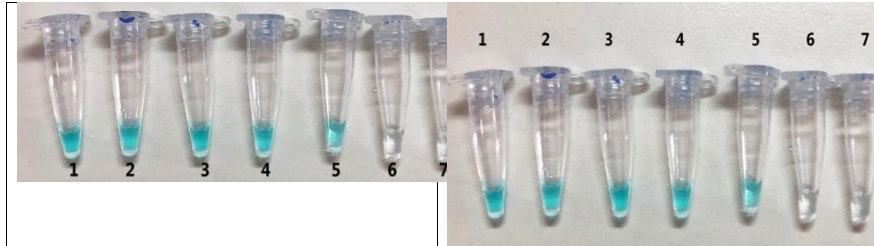
Bộ kit đóng gói vào tháng 1/2019 và được bảo quản ở nhiệt độ $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Các mẫu sử dụng để đánh giá là 3 mẫu chuẩn dương ở nồng độ $10^6\text{ng}/\mu\text{L}$, $10^7\text{ng}/\mu\text{L}$ và $10^8\text{ng}/\mu\text{L}$ (tương ứng với ống 1, 2, 3); 2 mẫu bệnh dương tính (tương ứng với ống 4, 5); 2 mẫu âm tính (tương ứng với ống 6, 7).

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại mỗi tháng 1 lần, 3 tháng một lần và sau 12 tháng ở các điều kiện bảo quản 2-8°C và - 20°C ± 5°C sau khi mở nắp bộ kit.

Bảng 3.13 Kết quả khảo sát độ ổn định của bộ Kit sau 6 tháng bảo quản

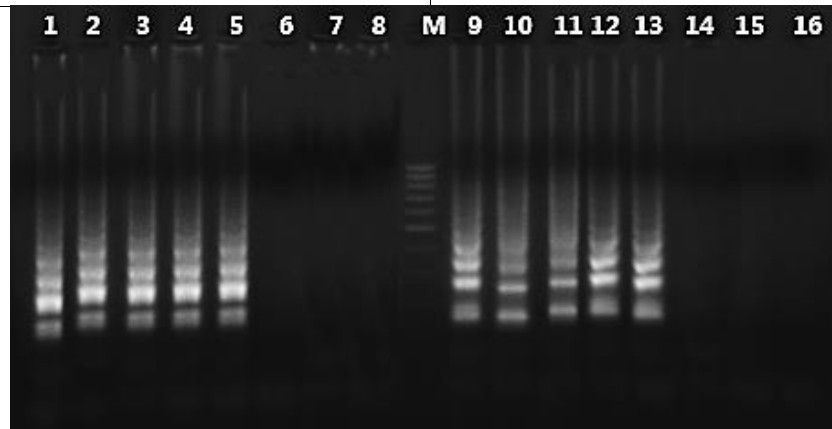
Nồng độ (ng/μL)	Điều kiện bảo quản 2-8°C sau mở nắp					
	1/2019	2/2019	3/2019	4/2019	5/2019	6/2019
10 ⁻⁶	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
10 ⁻⁷	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
10 ⁻⁸	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Mẫu dương 1 (5,1 x 10 ⁻⁶)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Mẫu dương 2 (4,2 x 10 ⁻⁷)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Neg 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Neg 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Như vậy, bộ kit vẫn hoạt động ổn định sau 6 tháng mở nắp sử dụng.



Hình 3.17A. Kết quả khảo sát tính ổn định của bộ kit sau 1 tháng bảo quản quan sát dựa vào chỉ thị màu.

Hình 3.17B. Kết quả khảo sát tính ổn định của bộ kit sau 6 tháng bảo quản quan sát dựa vào chỉ thị màu.



Hình 3.18 Hình ảnh điện di sản phẩm LAMP sau 1 tháng và 6 tháng bảo quản

Làn 1-7: sản phẩm LAMP sau 1 tháng bảo quản.

Làn 9-15: sản phẩm LAMP sau 6 tháng bảo quản.

Hình ảnh của chất chỉ màu và điện di sản phẩm cũng cho thấy bộ kit vẫn hoạt động ổn định sau 6 tháng mở nắp sử dụng

Bảng 3.14 Kết quả khảo sát độ ổn định sau 4 lần làm tan và đông đá.

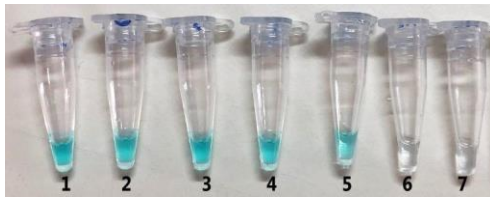
Nồng độ (ng/ μ L)	Điều kiện bảo quản - 20°C \pm 5°C sau khi mở nắp			
	2/2019	5/2019	8/2019	12/2019
10 ⁻⁶	(+)	(+)	(+)	(+)
10 ⁻⁷	(+)	(+)	(+)	(+)
10 ⁻⁸	(+)	(+)	(+)	(-)
Mẫu dương 1	(+)	(+)	(+)	(-)
Mẫu dương 2	(+)	(+)	(+)	(-)
Neg 1	(-)	(-)	(-)	(-)
Neg 2	(-)	(-)	(-)	(-)

Bộ kit không còn ổn định khi tiến hành làm tan và đông đá trở lại ở lần thứ 4.

Bảng 3.15 Kết quả khảo sát độ ổn định của bộ Kit sau 12 tháng bảo quản.

Nồng độ (ng/ μ L)	Điều kiện bảo quản - 20°C \pm 5°C	
	Lần 1: tháng 1/2019	Lần 2: tháng 1/2020
10 ⁻⁶	(+)	(+)
10 ⁻⁷	(+)	(+)
10 ⁻⁸	(+)	(+)
ADN mẫu 1	(+)	(+)
ADN mẫu 2	(+)	(+)
Neg1	(-)	(-)
Neg2	(-)	(-)

Bộ kit vẫn hoạt động ổn định 1 năm kể từ ngày sản xuất khi chưa mở nắp

**Hình 3.19** Kết quả khảo sát tính ổn định của bộ kit sau 12 tháng bảo quản.

Hình ảnh chất chỉ thị màu cũng phản ánh bộ kit vẫn hoạt động ổn định sau 1 năm kể từ ngày sản xuất khi chưa mở nắp.

3.2.3 Đánh giá bộ kit tại thực địa, so sánh bộ kit với bộ môi Pedro và với hai phương pháp chẩn đoán giun lươn thường dùng

3.2.3.1 Kết quả đánh giá bộ kit tại thực địa

Bảng 3.16 Nội dung hoạt động tập huấn và đánh giá kit tại thực địa

Nội dung hoạt động	Thời gian	Địa điểm	Số lượng mẫu thực hiện
Tập huấn kỹ thuật LAMP chẩn đoán GLĐR	6/2019	Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh	50 mẫu
Đánh giá Kit LAMP chẩn đoán GLĐR (Đợt 1)	6/2019	Xã Lộc Giang, Tân Mỹ, Huyện Đức Hòa, tỉnh Long An	150 mẫu
Đánh giá Kit LAMP chẩn đoán GLĐR (Đợt 2)	6/2020	Xã Mỹ Hạnh Nam, Mỹ Hạnh Bắc, Huyện Đức Hòa, tỉnh Long An	150 mẫu

Nội dung và thời gian của các hoạt động phù hợp với mục tiêu nghiên cứu.

Chúng tôi đã tiến hành tập huấn kỹ thuật sử dụng bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR tại Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh và các Trung tâm Y tế xã thuộc huyện Đức Hòa, tỉnh Long An. Đồng thời, bộ kit này cũng đã

được tiến hành triển khai đánh giá khả năng hoạt động tại thực địa tại 4 xã: Lộc Giang, Tân Mỹ, Mỹ Hạnh Nam, Mỹ Hạnh Bắc, huyện Đức Hòa, tỉnh Long An. Tổng số mẫu đánh giá 2 đợt là 300 mẫu. Các mẫu phân được thực hiện theo 3 phương pháp soi phân trực tiếp tìm AT giun lươn, sử dụng bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR và qPCR. Kết quả được trình bày ở bảng sau:

Bảng 3.17 Kết quả tầm soát giun lươn tại thực địa của 3 phương pháp

Phương pháp	Kết quả (+)		Kết quả (-)		Tổng số mẫu
	Số mẫu	Tỉ lệ	Số mẫu	Tỉ lệ	
Soi phân trực tiếp	0	0%	300	100%	300
qPCR	3	1%	297	99%	300
LAMP	3	1%	297	99%	300

Bảng 3.18 Kết quả chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột tại thực địa của qPCR và LAMP

Kết quả của kit LAMP	Kết quả của qPCR		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	3	0	3
Âm tính	0	297	297
Tổng số	3	297	300

Kết quả LAMP cho thấy có 3 mẫu trong 300 mẫu thực địa có kết quả dương tính với *S. stercoralis*. Các mẫu ADN đã được tách chiết cho kỹ thuật LAMP tại thực địa được chuyển về phòng thí nghiệm để thực hiện qPCR với

mục đích là so sánh kiểm chứng. Kết quả qPCR cho thấy, qPCR cũng cho kết quả dương tính với *S. stercoralis* đối với LAMP và âm tính đối với 297 mẫu còn lại. Kết quả cho thấy có sự tương đồng 100% giữa LAMP và qPCR.

3.2.3.2 Kết quả so sánh bộ kit LAMP với bộ môi có cùng mục đích tương tự

Do chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán GLDR được thương mại hóa trên thị trường, chúng tôi tiến hành so sánh bộ kit LAMP trong nghiên cứu của chúng tôi với bộ môi LAMP chẩn đoán GLDR của tác giả Pedro- Fernandez-Soto và cộng sự được công bố trên tạp chí Plos Neglected tropical diseases năm 2016.

Quá trình này được tiến hành thực nghiệm trên 50 mẫu: 25 mẫu dương tính, 25 mẫu âm tính đã được xác định bằng phương pháp real-time PCR. Kết quả được thể hiện qua phụ lục 4 và bảng 3.18.

Bảng 3.19 Kết quả đánh giá độ phù hợp giữa bộ kit LAMP trong nghiên cứu và Bộ môi Pedro

Bộ môi Pedro- Fernandez - Soto (2016)	LAMP trong nghiên cứu này		Tổng
	Số ca (+)	Số ca (-)	
Số ca (+)	18	0	18
Số ca (-)	2	30	32
Tổng	20	30	50

Hệ số Kappa được tính như sau:

Tỉ lệ quan sát 2 xét nghiệm đều cho kết quả giống nhau

$$P_0 = \frac{18+30}{50} = 0,96$$

Tỉ lệ phù hợp mong muốn là:

$$P_e = \frac{18+0}{50} \times \frac{18+2}{50} + \frac{2+30}{50} \times \frac{0+30}{50} \approx 0,53$$

Chỉ số Kappa là: $K = \frac{0,96-0,53}{1-0,53} \approx 0,91$

Với $K = 0,91$ chứng tỏ khả năng chẩn đoán *S. stercoralis* của bộ kit LAMP trong nghiên cứu này phù hợp cao với bộ môi đã công bố của Perdro.

3.2.3.3 So sánh 3 kỹ thuật LAMP, soi phân trực tiếp và ELISA trong chẩn đoán nhiễm giun lươn tại khoa khám bệnh chuyên ngành, Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương

Kết quả xét nghiệm chẩn đoán nhiễm GLĐR của 141 bệnh nhân đến khám tại Khoa khám bệnh chuyên ngành, Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương bằng cách sử dụng ba kỹ thuật LAMP, soi phân trực tiếp và ELISA được trình bày theo phụ lục 5 và bảng sau:

**Bảng 3.20 Tóm lược kết quả chẩn đoán nhiễm giun lươn tại khoa
Khám bệnh chuyên ngành bằng 3 phương pháp**

Soi phân trực tiếp	ELISA		LAMP	
	(+)	(-)	(+)	(-)
(+) : 31 mẫu	20	11	30	1
(-) : 110 mẫu	51	59	43	67
Tổng	71	70	73	68

Độ phù hợp giữa bộ kit LAMP trong nghiên cứu với 2 phương pháp được tính như sau:

Bảng 3.21 Kết quả đánh giá độ phù hợp giữa bộ kit LAMP trong nghiên cứu và soi phân trực tiếp

Soi phân trực tiếp	LAMP trong nghiên cứu này		Tổng
	Số ca (+)	Số ca (-)	
Số ca (+)	30	1	31
Số ca (-)	43	67	110
Tổng	73	68	141

Tỉ lệ quan sát 2 xét nghiệm đều cho kết quả giống nhau

$$P_0 = \frac{30+67}{141} \approx 0,69$$

Tỉ lệ phù hợp mong muốn là:

$$P_e = \frac{30+1}{141} \times \frac{30+43}{141} + \frac{43+67}{141} \times \frac{1+67}{141} \approx 0,49$$

Chỉ số Kappa là: $K = \frac{0,69-0,49}{1-0,49} \approx 0,39$

Với $K = 0,39$ chứng tỏ khả năng chẩn đoán *S. stercoralis* của bộ kit LAMP là phù hợp thấp với phương pháp soi phân trực tiếp.

Bảng 3.22 Kết quả đánh giá độ phù hợp giữa bộ kit LAMP trong nghiên cứu và phương pháp ELISA

ELISA	LAMP trong nghiên cứu này		Tổng
	Số ca (+)	Số ca (-)	
Số ca (+)	63	8	71
Số ca (-)	10	60	70
Tổng	73	68	141

Tỉ lệ quan sát 2 xét nghiệm đều cho kết quả giống nhau

$$P_0 = \frac{63+60}{141} \approx 0,87$$

Tỉ lệ phù hợp mong muốn là:

$$P_e = \frac{63+8}{141} \times \frac{63+10}{141} + \frac{10+60}{141} \times \frac{8+60}{141} \approx 0,5$$

Chỉ số Kappa là: $K = \frac{0,87-0,5}{1-0,5} \approx 0,74$

Với $K = 0,74$ chứng tỏ khả năng chẩn đoán *S. stercoralis* của bộ kit LAMP là phù hợp khá với phương pháp ELISA.

3.2.4 Kiểm định tiêu chuẩn cơ sở bộ kit

Từ các kết quả nghiên cứu, bộ tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột được hoàn thiện và trình bày cụ thể ở bảng 3.23, với các thông số:

Bảng 3.23 Tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis*.

TT	Chỉ tiêu đánh giá	Tiêu chuẩn cơ sở
1	Nhận dạng	Phản ứng LAMP ở 63 ⁰ C trong 60 phút Mẫu dương tính: Dung dịch chuyển từ màu xanh đậm sang màu xanh sáng Mẫu âm tính: Dung dịch chuyển từ màu xanh đậm sang không màu
2	Độ nhạy	> 95%
3	Độ đặc hiệu	> 95%
4	Ngưỡng phát hiện	3 bản sao gen/ μ L
5	Thời gian xét nghiệm	Không quá 3 giờ
6	Độ ổn định	12 tháng trong điều kiện bảo quản -20 ⁰ C \pm 5 ⁰ C; 6 tháng kể từ ngày mở nắp

- Bộ tiêu chuẩn cơ sở này đã được thẩm định bởi Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế là đạt yêu cầu theo đúng công bố (phụ lục 6).

Chương 4 BÀN LUẬN

4.1 Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở người

4.1.1 Kết quả thiết kế môi

4.1.1.1 Kết quả lựa chọn trình tự bộ môi cho phản ứng LAMP

Môi (Primers) được coi là một trong những thành phần quan trọng nhất của phản ứng PCR và là một trong những yếu tố được chú ý trước tiên khi tiến hành một kỹ thuật PCR mới. Nhiều xét nghiệm PCR đã được thiết kế để phát hiện *S. stercoralis*, với gen đích là gen ty thể cytochrome c oxidase tiểu đơn vị I (COX1) [71] hoặc gen trong nhân tế bào 18S rRNA [65], [112] hay 28S rRNA [73]. Trong đó, sự khuếch đại của tiểu đơn vị nhỏ 18S (số gia nhập Genbank AY029262) đã được chứng minh là nhạy hơn cytochrom c oxyase 1 hoặc trình tự lặp lại và được sử dụng trong hầu hết các xét nghiệm qPCR cho chẩn đoán *Strongyloides stercoralis* [31], [43], [56]. Trong nghiên cứu phân tích tổng hợp về vai trò của phương pháp sinh học phân tử trong chẩn đoán nhiễm giun lươn năm 2018 của Dora Buonfrate và cộng sự, các tác giả thống kê đa số các nghiên cứu ứng dụng sinh học phân tử chẩn đoán giun lươn (16/18 nghiên cứu) đều sử dụng gen đích là 18S rRNA [43]. Vùng gen đích này cũng được sử dụng trong các nghiên cứu ứng dụng SHPT để định danh *Strongyloides stercoralis* ở Bắc – Tây Thái Lan hay ở nghiên cứu phân biệt các loài giun lươn ở hai vùng có kiểu khí hậu nhiệt đới, cận nhiệt đới cũng như nghiên cứu ứng dụng LAMP để phát hiện *Strongyloides stercoralis* trong phân và nước tiểu của tác giả Pedro và cs [112], [86], [65]. Ngoài ra trong một số nghiên cứu, các tác giả có thể sử dụng gen đích là gen 18S

rRNA kết hợp với gen ty thể COX1 như nghiên cứu định danh *Strongyloides stercoralis* và *Strongyloides fuelleborni* với phạm vi nhiều nước trên toàn thế giới [57] hay nghiên cứu của Siyu Zhou và cộng sự năm 2019 [104]. Ở Việt Nam, trong các nghiên cứu về giun lươn có liên quan đến ứng dụng sinh học phân tử, cũng có một số nghiên cứu định danh loài giun lươn dựa vào vùng gen đích này như nghiên cứu của tác giả Dương Thị Hồng [11], tác giả Lê Đức Vinh [25]. Thực tế cũng có một số nghiên cứu sử dụng gen đích khác như nghiên cứu ứng dụng LAMP để chẩn đoán giun lươn của tác giả Matthew R. Watts và cộng sự năm 2014 và năm 2019. Trong nghiên cứu của mình, tác giả Matthew R. Watts và cộng sự đã sử dụng gen đích là gen 28S rRNA [73], [74]. Vì vậy chúng tôi đã chọn vùng gen đích trong nghiên cứu của mình là 18S rRNA. Chúng tôi đã tiến hành tải 30 trình tự gen 18s rRNA của loài *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides fuelleborni*, *Strongyloides ransomi* (mỗi loài 10 trình tự) trên ngân hàng dữ liệu NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) và sử dụng phần mềm MEGA 7 với tính năng Clustal W để sắp giống các trình tự của các loài nhằm tìm ra vùng bảo tồn đặc trưng cho *Strongyloides stercoralis*. Sau đó vùng trình tự bảo tồn đã xác định được đưa vào phần mềm thiết kế mồi LAMP chuyên dụng Primer Explorer v.5 (Eiken, Nhật Bản) để lựa chọn bộ mồi và phải thỏa mãn các tiêu chí về độ dài đoạn khuếch đại, khoảng cách giữa các mồi, nhiệt độ nóng chảy (T_m) của từng mồi, tính bền vững ở đầu các mồi, thành phần GC trong mồi, mồi tránh hình thành các cấu trúc bậc 2 và vị trí gắn mồi không có trình tự cắt của enzyme giới hạn (bảng 2.1 và bảng 2.2). Kết quả các bảng 3.1, 3.2, 3.3 và 3.4 cho thấy khi đánh giá chất lượng của mồi so với tiêu chuẩn thì các mồi được lựa chọn đều đạt tiêu chuẩn. Tỷ lệ CG từ 38 đến 46% nằm gần trong khoảng tiêu chuẩn từ 40-60% đối với một mồi chất lượng. Tính bền vững ở đầu các mồi: Đầu 3' của các mồi F2/B2; F3/B3; LF/LB và đầu 5' của F1c/B1c được thiết kế với năng

lượng tự do ΔG đều đạt yêu cầu $\leq -4\text{Kcal/mol}$. Các môi chúng tôi lựa chọn không có tính tương đồng cao giữa các môi trong cùng cặp, do đó đảm bảo không xảy ra hiện tượng kết cặp (dimer) (là hiện tượng môi thay vì gắn vào khuôn sẽ gắn vào môi ngược với nó hoặc với chính nó, tạo ra các sản phẩm PCR có kích thước nhỏ và làm giảm lượng môi bắt cặp với khuôn). Đồng thời môi cũng đáp ứng tiêu chí không có tương đồng chéo (là hiện tượng mà cặp môi sẽ khuếch đại một gen khác có trong ADN khuôn của phản ứng). Bộ môi mà chúng tôi thiết kế cũng có độ dài và kích thước gần tương đương với bộ môi sử dụng trong nghiên cứu về ứng dụng LAMP để chẩn đoán giun lươn của Pedro Fernández-Soto cùng cộng sự năm 2016 và năm 2020 [86], [87]. Như vậy bộ môi mà chúng tôi thiết kế đáp ứng đủ các điều kiện đề ra của một hệ môi LAMP.

4.1.1.2 Khảo sát tính đặc hiệu của bộ môi

Chúng tôi khảo sát tính đặc hiệu của bộ môi thông qua hai tiêu chí là cặp môi F3-B3 có bắt cặp hoàn toàn với trình tự 18S rRNA của giun lươn đường ruột *S. stercoralis* được công bố trên ngân hàng gen và phản ứng chéo của bộ môi cho GLĐR *Strongyloides stercoralis* với ADN của giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp.*

Kết quả cho thấy môi bắt cặp hoàn toàn với trình tự 18S của GLĐR *Strongyloides stercoralis* được công bố trên ngân hàng gen là đáp ứng yêu cầu tính đặc hiệu của bộ môi về mặt lý thuyết. Kết quả ở hình 3.4 cho thấy, khi dùng phần mềm Primer Blast để kiểm tra thì cho thấy đoạn môi F3, B3 bắt cặp 100% trên ngân hàng gen và có sản phẩm khuếch đại cùng với kích thước 226 bp.

Tương tự như vậy, khi thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3 và B3 trong bộ môi LAMP với các nền mẫu ADN tách chiết từ *Strongyloides*

stercoralis, giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp.* Từ kết quả điện di trên gel agarose 2% cho thấy sản phẩm PCR thu được có kích thước 226 bp đối với các mẫu ADN tách chiết từ *Strongyloides stercoralis*, không có sản phẩm khuếch đại ở các mẫu ADN tách chiết từ các loại giun còn lại là đáp ứng yêu cầu tính đặc hiệu của bộ môi về mặt thực nghiệm (hình 3.5). Như vậy bộ môi tự thiết kế đảm bảo đặc hiệu cho *Strongyloides stercoralis*, không có phản ứng chéo với các loài giun khác.

4.1.2 Kết quả xác định các điều kiện phản ứng LAMP với bộ môi tự thiết kế

Đây cũng là một trong những nội dung quan trọng của đề tài với nhiều thử nghiệm để xác định các điều kiện tối ưu cho phản ứng LAMP để có thể chuẩn hóa từng mức nhiệt khác nhau, chuẩn hóa từng loại hóa chất ở các nồng độ khác nhau, thử nghiệm để xác định thời gian phản ứng LAMP cũng như chất chỉ thị màu sử dụng để đọc kết quả và xác định ngưỡng phát hiện của bộ môi. Từ kết quả lựa chọn các cặp môi, chúng tôi đã xác định được các điều kiện cho phản ứng LAMP để khuếch đại ADN của *Strongyloides stercoralis*.

Nhiệt độ gắn môi (T_a) 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, phát triển từ PCR. Đây là một thông số quan trọng khi tối ưu phản ứng PCR. T_a quá cao, môi không thể bắt cặp được vào mạch khuôn, T_a quá thấp sẽ dẫn đến hình thành các sản phẩm không đặc hiệu. Nhiệt độ lai tối ưu dao động xung quanh nhiệt độ biến tính của môi (T_m) 5°C. Theo đó, nhiệt độ của phản ứng LAMP được tiến hành khảo sát từ 60 đến 65°C. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy không có sự khác biệt giữa 3 điểm nhiệt độ khảo sát là 63°C, 64°C, 65°C (hình 3.6). Vì vậy chúng tôi đã chọn điểm nhiệt độ trung bình 63°C vì nhiệt độ 63°C được đánh giá là tạo điều kiện ủ môi và tăng

cường khả năng chịu đựng các chất ức chế thường được tìm thấy trong các mẫu chẩn đoán bệnh. Đây cũng là nhiệt độ phù hợp nhất cho hoạt tính xúc tác của enzyme trong vi khuẩn so với *Bacillus* tự nhiên. Điều kiện về nhiệt độ phản ứng này cũng tương tự với nghiên cứu ứng dụng LAMP để chẩn đoán nhiễm *Strongyloides stercoralis* có trong phân và nước tiểu năm 2016 của tác giả Pedro Fernández-Soto và cộng sự [86] và một nghiên cứu khác cũng của tác giả này vào năm 2020 [87], hay nghiên cứu phát triển kỹ thuật LAMP để phát hiện sán lá lớn ở gan *Fasciola spp.* từ các nền mẫu khác nhau như phân, mô của tác giả Nguyễn Thị Hồng Ngọc và cộng sự năm 2020 [17]. Tuy nhiên trong các nghiên cứu của tác giả Pedro Fernández-Soto và cộng sự, ngoài bước đặt nhiệt độ phản ứng ở 63°C, nhóm nghiên cứu còn có thêm một bước nâng nhiệt độ của hỗn dịch lên 80°C nhằm bất hoạt men để kết thúc phản ứng. Trong khi đó ở nghiên cứu LAMP để chẩn đoán nhiễm *Strongyloides stercoralis* của tác giả Matthew R. Watts và cộng sự vào năm 2014 thì nhiệt độ của phản ứng LAMP được đặt thấp hơn (60°C) do trong quá trình thực hiện phản ứng còn có bước xử lý ở nhiệt độ 95°C trước đó trước khi đưa về nhiệt độ phòng và thêm DNA polymerase [73]. Như vậy so với điều kiện nhiệt độ phản ứng LAMP trong các nghiên cứu của các tác giả Pedro Fernández-Soto và cs, tác giả Matthew R. Watts và cs thì trong nghiên cứu của chúng tôi, điều kiện nhiệt độ có thể tiến hành đơn giản hơn với một nhiệt độ ổn định duy nhất là 63°C.

4.1.2.1 Nồng độ $MgSO_4$

Nồng độ $MgSO_4$ ảnh hưởng đến hiệu quả và tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Trong dung dịch đệm, ion Mg^{2+} đóng vai trò quan trọng nhất, nó làm tăng nhiệt độ nóng chảy (T_m-melting temperature) của ADN mạch đôi, tạo ra phức chất tan với dNTPs để hình thành cơ chất mà enzym polymerase

có thể nhận ra, điều này rất cần thiết cho quá trình liên kết của các dNTPs. Nồng độ $MgSO_4$ trong phản ứng thấp làm giảm hiệu quả nhân bản thậm chí không thể nhân bản được. Ngược lại, ở nồng độ cao, $MgSO_4$ ức chế phản ứng PCR hoặc giảm tính đặc hiệu của mỗi do nó ổn định cấu trúc bắt cặp không đặc hiệu. Khi khảo sát nồng độ $MgSO_4$, chúng tôi tiến hành các phản ứng ở cùng nhiệt độ $63^\circ C$ (đã xác định ở trên), thành phần các chất tham gia phản ứng là như nhau, chỉ khác biệt về nồng độ Mg^{2+} (4, 6 và 8 mM). Kết quả được đánh giá thông qua điện di sản phẩm trên gel agarose 2% (hình 3.7A và hình 3.7B) cho thấy ở nồng độ Mg^{2+} 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định trong khi ở nồng độ 4mM không có sản phẩm khuếch đại, $MgSO_4$ ở nồng độ 6mM cho sản phẩm không ổn định, hiệu suất không cao. Vì vậy chúng tôi chọn $MgSO_4$ ở nồng độ 8mM là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP. Nồng độ này cũng phù hợp với nghiên cứu phát triển kỹ thuật LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) để phát hiện sản lá lớn ở gan *Fasciola spp.* từ các nền mẫu khác nhau như phân, mô của tác giả Nguyễn Thị Hồng Ngọc và cộng sự năm 2020 [17]. Tuy nhiên nồng độ này có khác so với nghiên cứu LAMP để chẩn đoán nhiễm *Strongyloides stercoralis* của tác giả Matthew R. Watts và cộng sự năm 2014 [73] hay của tác giả Pedro Fernández-Soto và cộng sự trong các nghiên cứu năm 2016 và 2020 [86], [87]. Trong các nghiên cứu của mình, các tác giả sử dụng nồng độ $MgSO_4$ 6mM. Điểm khác giữa nghiên cứu của các tác giả này với nghiên cứu của chúng tôi là trong dung dịch phản ứng của những nghiên cứu đó có sử dụng thêm betaine.

4.1.2.2 Thời gian tiến hành phản ứng LAMP

Đối với bước khảo sát thời gian tối thiểu thực hiện phản ứng LAMP, chúng tôi thử nghiệm ở các mức điều kiện thời gian là 40 phút và 60 phút, với

các điều kiện và thành phần phản ứng được giữ nguyên và đồng nhất, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để khuếch đại ADN trong phản ứng LAMP của bộ kit là 60 phút (hình 3.8). Thời gian thực hiện phản ứng LAMP này cũng tương đồng với nghiên cứu phát triển kỹ thuật LAMP để phát hiện sán lá lớn ở gan *Fasciola spp.* từ các nền mẫu khác nhau như phân, mô của tác giả Nguyễn Thị Hồng Ngọc và cộng sự năm 2020 [17]. So với các nghiên cứu ứng dụng LAMP khác trên thế giới như trong các nghiên cứu của Pedro Fernández-Soto và cộng sự đã nêu ở trên thì ngoài thời gian thực hiện phản ứng 60 phút như nghiên cứu của chúng tôi, các nghiên cứu này còn có bước nâng nhiệt độ của hỗn dịch lên 80°C trong 10 phút nhằm bất hoạt men để kết thúc phản ứng [86], [87] hay bước xử lý ở nhiệt độ 95°C trong 3-5 phút trước khi đưa về nhiệt độ phòng [73], [74]. Như vậy, so với các nghiên cứu LAMP để chẩn đoán giun lươn của các tác giả Pedro Fernández-Soto, Matthew thì điều kiện về thời gian cũng như nhiệt độ phản ứng của chúng tôi đơn giản hơn với một mức nhiệt độ và thời gian cố định.

4.1.2.3 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, độ nhanh và cho phép phát hiện sản phẩm khuếch đại trực quan đơn giản bằng cách quan sát độ đục, chất chỉ thị màu huỳnh quang và chất chỉ thị màu chỉ thị pH. Mỗi cách thức lại có những ưu và nhược điểm riêng. Mặc dù độ đục do kết tủa trắng (magie pyrophosphate) được tạo ra sau phản ứng LAMP có thể phát hiện bằng mắt thường, nhưng nó có độ chụm ngắn (khoảng 5 -10 giây) sau khi lấy mẫu ra khỏi máy ủ nhiệt. Do vậy cách phát hiện này có thể cần một máy đo độ đục thời gian thực để có kết luận chính xác hơn. Sử dụng các chất chỉ thị màu huỳnh quang như calcein hoặc SYBR Green I như trong nghiên cứu của tác giả Pedro Fernández-Soto

và cộng sự [86], [87] có giá tiền đắt, cần có một hệ thống đèn UV để đọc kết quả. Hơn nữa, calcein có thể kết hợp với ion Mg^{2+} gây ức chế hoạt động ADN polymerase và làm giảm độ nhạy chung của xét nghiệm. Việc bổ sung SYBR Green I sau phản ứng kết có thể làm tăng khả năng tạp nhiễm ADN, dẫn đến sai lệch kết quả. Chất chỉ thị màu pH Hydroxy Naphthol Blue (HNB) đã được nhiều nghiên cứu sử dụng để phát hiện sản phẩm của LAMP, tuy nhiên sự khác biệt giữa màu ở những mẫu dương tính là màu xanh lam và màu tím tương ứng ở mẫu âm tính là chưa rõ ràng. Gần đây, chất chỉ thị màu Xanh malachite (MG), $[C_6H_5C(C_6H_4N(CH_3)_2)_2]Cl$ đã được sử dụng thành công như là một chất chỉ thị nhạy với pH để phát hiện các sản phẩm LAMP và các nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của nó [81], [96]. Sự thay đổi màu sắc của MG (dạng cation) phụ thuộc vào pH của dung dịch (pH < 2: vàng, pH = 3 - 9: xanh lam, pH > 10: không màu). Bước sóng hấp thụ cho MG là 621nm. 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. 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. Hơn nữa, kỹ thuật này có thể được sử dụng để sàng lọc nhanh số lượng mẫu đáng kể với kết quả có thể lặp lại, nhất quán bằng cách sử dụng các thiết bị đơn giản và rẻ, chẳng hạn như máy ủ nhiệt khô hay bể ủ nhiệt ướt ở một nhiệt độ không đổi. 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. Do vậy trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn MG làm chất chỉ thị màu để đọc kết quả sau phản ứng LAMP. Các nồng độ MG được khảo sát là 0,0012%, 0,008%, 0,004% và 0,001%. Mỗi một nồng độ được tiến hành lặp lại 3 lần, kết quả được quan sát và ghi nhận bởi 3 người độc lập. Kết quả cho thấy, có sự tương đồng 100% giữa 3 người quan sát

(bảng 3.6). Như vậy có thể 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. Nồng độ MG cao hơn dẫn đến sự gia tăng dương tính giả, nồng độ MG thấp sẽ không thể phân biệt được mẫu âm và mẫu dương. Màu xanh lam ở các ống mẫu dương tính sau phản ứng vẫn còn nguyên màu cho đến tối đa 6 tuần, ở điều kiện nhiệt độ phòng. Thời gian sau 6 tuần không được khảo sát ở nghiên cứu này.

4.1.3 Ngưỡng phát hiện của bộ kit

Trong nghiên cứu này, từ kết quả ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ môi, chúng tôi xác định được ngưỡng phát hiện với độ tin cậy 95% (LOD95%) của bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR sau khảo sát là $2,12 \times 10^0$ số bản sao gen/ μL (95% CI: $1,71 \times 10^0$ bản sao gen/ μl đến $2,89 \times 10^0$ bản sao gen/ μl). Kết quả ngưỡng phát hiện này là tương đương so với ngưỡng phát hiện của các nghiên cứu khác về ứng dụng sinh học phân tử để chẩn đoán giun lươn của các tác giả khác. Trong nghiên cứu ứng dụng LAMP để chẩn đoán giun lươn của tác giả Matthew R, Watts và cộng sự năm 2014, cho thấy ngưỡng phát hiện được xác định là <10 bản sao/ 1 phản ứng tương đương nồng độ ấu trùng giun lươn (bị nghiền) là 10^{-2} / 1 phản ứng [73], [78]. Còn trong nghiên cứu ứng dụng real-time PCR để chẩn đoán giun lươn của tác giả Yasmin Sultana và cộng sự năm 2013 cho thấy ngưỡng phát hiện là nồng độ ấu trùng giun lươn bị nghiền cũng là 10^{-2} / 1 phản ứng [116]. Còn trong nghiên cứu so sánh real-time PCR và LAMP để chẩn đoán giun lươn của Matthew R, Watts và cộng sự năm 2019, thì ngưỡng phát hiện của real-time PCR và LAMP có nồng độ ấu trùng giun lươn bị nghiền lần lượt là 10^{-3} / 1 phản ứng và 10^{-2} / 1 phản ứng [74]. Kết quả của ngưỡng phát hiện trong nghiên cứu này cho thấy đây là ngưỡng phát hiện tốt, thấp tương đương với các nghiên cứu trên thế

giới, là cơ sở để phát triển ứng dụng bộ kit LAMP có độ nhạy tốt để chẩn đoán nhiễm GLĐR ở Việt Nam.

4.1.4 Kết quả xây dựng chứng dương

Chứng dương trong các bộ kit LAMP xác định nhiễm *Strongyloides stercoralis* được xây dựng bằng công nghệ ADN tái tổ hợp theo hướng dẫn NIMPE.HD 03. PP/44. Đầu tiên chúng tôi tiến hành nhân bản đoạn gen đích chứa trình tự thiết kế mỗi LAMP bằng phương pháp PCR. Sản phẩm thu được đem điện di để tách và tinh sạch để thu ADN tinh khiết. Tiếp theo, chúng tôi tiến hành chèn đoạn ADN đích vào vector pUC19 và dùng phương pháp hóa biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* trước khi nuôi cấy trên đĩa môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycinin nồng độ cuối cùng là 50 µg/ml xác định hiệu suất chèn đoạn ADN đích vào vector tách dòng. Trên đĩa nuôi cấy, các khuẩn lạc màu trắng được thu nhận, tinh sạch và kiểm tra bằng phản ứng PCR. Sản phẩm của phản ứng PCR được tinh sạch và giải trình tự, so sánh với trình tự gen của GLĐR trên ngân hàng gen với độ tương đồng là 98% để khẳng định đoạn ADN đích đã được chèn thành công vào vector tách dòng và được biến nạp thành công vào chủng vi khuẩn *E. coli*. Cuối cùng chúng tôi thu được Plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen 18S rRNA đặc trưng cho giun lươn đường ruột có kích thước 3282bp. Lượng Plasmid thu hồi là 5µg và hòa tan trong 50µL để thu được nồng độ 100ng/µL, tương đương với $2,82 \times 10^{10}$ copies/µL. Với nồng độ gốc này hoàn toàn đáp ứng lượng chứng chuẩn cho 2000 test thử nghiệm. Ngoài ra chủng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp mang đoạn ADN đích của GLĐR được bảo quản trong điều kiện -70°C để có thể sẵn sàng nhân nuôi và tinh sạch ADN khi cần thiết đảm bảo tách chiết được ADN để làm chứng dương chuẩn.

4.1.5 Kết quả chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis*

Chúng tôi đã chế tạo kit và đóng gói với số lượng là 2000 test ở quy mô phòng thí nghiệm đủ để phục vụ cho hoạt động thử nghiệm và kiểm định. Bộ kit được đóng gói 50 phản ứng/bộ, có các ống và hướng dẫn dễ sử dụng cũng như hướng dẫn bảo quản. Như vậy với quy cách đóng gói gọn nhẹ, thì việc vận chuyển đến nơi sử dụng là hoàn toàn thuận tiện.

4.2 Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa

4.2.1 Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP tại phòng thí nghiệm

Để đánh giá được độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP tại phòng thí nghiệm, chúng tôi đã so sánh kết quả xét nghiệm chẩn đoán nhiễm giun lươn trên 132 mẫu bằng bộ kit LAMP với phương pháp tham chiếu (chuẩn vàng). Chúng tôi chọn phương pháp qPCR làm phương pháp tham chiếu do đây là hai phương pháp SHPT có độ nhạy tương đương trên các nền mẫu khác nhau. Phương pháp qPCR này khuếch đại cũng dựa vào đoạn gen 18S rRNA, đã được xác định là có độ đặc hiệu cao hơn 99% khi so sánh với phương pháp cấy phân Harada – Mori, có độ nhạy 100% đối với những trường hợp nhiễm trung bình và nhiễm nặng [116]. Từ kết quả xét nghiệm chẩn đoán nhiễm giun lươn *S. stercoralis* trên 132 mẫu phân thu thập tại hai tỉnh Long An và các mẫu bệnh phẩm thu từ trường ĐHYK Phạm Ngọc Thạch năm 2018 của phương pháp qPCR và LAMP (bảng 3.10), chúng tôi tính độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP như bảng 3.11. Độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP lần lượt là 96,88% (95% CI: 83,78% - 99,92%) và 97,00% (95% CI: 91,48% - 99,38%). Kết quả này cho thấy, bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR có độ nhạy,

độ đặc hiệu cao, đáp ứng yêu cầu đối với một bộ kit xét nghiệm chẩn đoán. Ngoài ra hệ số Kappa để đánh giá sự phù hợp giữa hai phương pháp qPCR và LAMP trên bộ mẫu này là $K=0,92$. Như vậy bộ kit LAMP trong nghiên cứu này có sự phù hợp cao với phương pháp qPCR. Kết quả này góp phần củng cố thêm dữ liệu về hiệu quả của LAMP trong chẩn đoán nhiễm GL là đạt mức gần tương đương với phương pháp qPCR. Nghiên cứu của tác giả Matthew và cộng sự năm 2019 cũng so sánh giữa LAMP và qPCR khi áp dụng vào chẩn đoán nhiễm GLĐR trên 396 mẫu phân tại Bangladesh và Australia. Trong nghiên cứu này, các tác giả cũng sử dụng phương pháp real-time PCR làm phương pháp tham chiếu thì độ nhạy của LAMP là 77.3% (95% CI: 64.5 - 86.6) và độ đặc hiệu là 100% (95% CI: 98.9 - 100), hệ số Kappa của kỹ thuật LAMP và real-time PCR tính được là 0,79, cho thấy độ tương đồng của 2 kỹ thuật này trong chẩn đoán giun lươn gần như phù hợp khá [74]. So sánh kết quả nghiên cứu của tác giả Matthew R, Watts và cộng sự với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi thì thấy gần tương đồng. Tuy kết quả nghiên cứu của tác giả Matthew và cộng sự có độ nhạy thấp hơn nhưng lại có độ đặc hiệu cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Điểm khác giữa hai nghiên cứu là trong nghiên cứu của tác giả Matthew R, Watts và cộng sự, các tác giả sử dụng đoạn gen đích trong kỹ thuật LAMP là gen 28S rRNA, khác với gen đích 18S rRNA trong nghiên cứu của chúng tôi. Như vậy, khi lấy phương pháp qPCR làm tham chiếu thì kết quả cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR trong nghiên cứu của chúng tôi cao và hoàn toàn đáp ứng yêu cầu đối với một bộ kit xét nghiệm chẩn đoán.

4.2.2 Điều kiện bảo quản và độ ổn định của bộ kit

Tính ổn định của bộ kit được tiến hành qua 3 thử nghiệm:

- Thử nghiệm thứ nhất nhằm đánh giá sự ổn định của bộ kit qua từng tháng sau khi mở nắp và bảo quản ở nhiệt độ 2-8⁰C bằng cách mỗi tháng tiến

hành thử nghiệm lại bộ kit vào một ngày nhất định với các điều kiện đã được tối ưu. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu chuẩn dương, mẫu lâm sàng dương tính và mẫu âm tính đều có kết quả ổn định qua từng tháng, trong thời gian sau 6 tháng thông qua hình ảnh quan sát dựa vào chỉ thị màu và điện di sản phẩm LAMP (hình 3.17 A, B và hình 3.18).

- Thử nghiệm thứ hai nhằm đánh giá sự ổn định của bộ kit sau khi tan đá và đông đá trở lại bằng cách tiến hành thử nghiệm mở nắp bộ kit mỗi 3 tháng một lần với các điều kiện đã được tối ưu, sau đó lại tiếp tục bảo quản bộ kit ở điều kiện $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Kết quả cho thấy, các lần tan đá thứ 1, 2, 3 tương ứng với thời gian sau 1 tháng, 4 tháng và 7 tháng để mở nắp sử dụng và sau đó lại đông đá trở lại thì các mẫu chuẩn dương, mẫu dương tính, mẫu âm tính đều có kết quả ổn định. Tuy nhiên ở lần tan đá thứ 4 ứng với thời gian sau 11 tháng thì kết mẫu chuẩn dương ngay ngưỡng phát hiện cũng như 2 mẫu lâm sàng dương tính thì kết quả đã không còn chính xác và chuyển sang âm tính.

- Thử nghiệm thứ ba nhằm đánh giá tính ổn định của bộ kit sau thời gian 12 tháng bảo quản ở điều kiện $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ bằng cách tiến hành thực hiện thí nghiệm phản ứng LAMP với các điều kiện đã được tối ưu. Kết quả quan sát dựa vào chỉ thị màu cho thấy bộ kit vẫn hoạt động ổn định khi mở nắp sử dụng sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Như vậy nếu được bảo quản ở điều kiện $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ thì bộ kit vẫn hoạt động ổn định sau thời gian 1 năm, còn nếu đã tan đá và bảo quản ở nhiệt độ $2-8^{\circ}\text{C}$ thì bộ kit vẫn hoạt động ổn định sau 6 tháng, thời gian lâu hơn thì không được khảo sát. Từ kết quả nghiên cứu về độ ổn định của bộ kit LAMP theo các điều kiện bảo quản này cho thấy nếu bộ kit được áp dụng thực địa thì hoàn toàn khả thi. Tại các cơ sở y tế lớn, nơi có điều kiện bảo quản với tủ lạnh âm sâu ($-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) thì bộ kit có hạn sử dụng lên đến 1 năm.

Ngược lại, tại những cơ sở y tế địa phương, không có điều kiện bảo quản với tủ lạnh âm sâu thì sau khi rã đông, bộ kit được bảo quản ở ngăn mát của tủ lạnh thông thường với nhiệt độ 2-8°C thì bộ kit vẫn có hạn sử dụng là 6 tháng. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy không tiến hành làm tan và đông đá lại bộ kit quá 3 lần. Như vậy, khi có nhu cầu di chuyển xa thì bộ kit vẫn hoạt động tốt sau đó (dù sau đó được bảo quản ở điều kiện - 20°C ± 5°C hoặc 2-8°C) nhưng cần tránh trường hợp tan đá rồi đông đá lại nhiều lần sẽ làm bộ kit không còn cho kết quả chính xác

4.2.3 Đánh giá bộ kit tại thực địa, so sánh bộ kit với bộ môi Pedro và với hai phương pháp chẩn đoán giun lươn thường dùng

4.2.3.1 Đánh giá bộ kit tại thực địa

Như vậy, với những kết quả thu được cho thấy bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR trong nghiên cứu của chúng tôi có thể triển khai ngoài thực địa cho ra kết quả chính xác. Trong quá trình triển khai tại thực địa, chúng tôi nhận thấy còn một số khó khăn giống như dự đoán như: Kỹ thuật LAMP tuy được đánh giá là một kỹ thuật tương đối đơn giản so với các kỹ thuật SHPT khác, không cần các trang thiết bị phức tạp, đắt tiền nhưng vì nền mẫu thử nghiệm là mẫu phân, vì vậy quá trình xử lý mẫu, tách chiết ADN còn phức tạp và đòi hỏi phải có những trang thiết bị cho quá trình xử lý mẫu ban đầu như máy ly tâm. Đây là một trong những khó khăn khi triển khai kỹ thuật này tại tuyến xã, do các trạm Y tế xã chỉ được trang bị cơ sở vật chất cho việc khám chữa bệnh đơn giản, thông thường. Tuy nhiên, trong tương lai, khi các Trung tâm Y tế tuyến xã được trang bị thêm hệ thống máy ly tâm thì kỹ thuật này hoàn toàn có thể triển khai đơn giản tại thực địa. Ngoài ra khi muốn bảo quản thời gian lâu hơn (như 1 năm) thì bộ kit LAMP cần có điều kiện bảo quản ở -20°C ± 5

và các quá trình thực nghiệm diễn ra ở điều kiện nhiệt độ thấp, do đó khi triển khai tại thực địa còn gặp khó khăn trong khâu vận chuyển và bảo quản.

Bảng 3.17 cho biết kết quả xét nghiệm chẩn đoán nhiễm GLDR bằng ba phương pháp soi phân trực tiếp, sử dụng bộ kit LAMP đang nghiên cứu và phương pháp qPCR. Kết quả cho thấy, với phương pháp soi phân trực tiếp thì không phát hiện trường hợp nhiễm GLDR nào (0%) và phương pháp qPCR và LAMP cùng cho kết quả giống nhau với 3 trường hợp dương tính, chiếm tỉ lệ 1%. Bảng 3.18 cho thấy kết quả của 2 phương pháp qPCR và LAMP là phù hợp 100% với nhau.

Xét về tỉ lệ nhiễm giun lươn trong 300 mẫu thực địa của chúng tôi thì tỉ lệ này thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu tại 5 xã và thị trấn của huyện Đức Hòa của tác giả Lê Đức Vinh năm 2017 - 2018 [25] là 6,64%. Trong nghiên cứu của mình, tác giả Lê Đức Vinh sử dụng cỡ mẫu lớn hơn rất nhiều so với nghiên cứu chúng tôi (79 mẫu dương tính trong 1190 mẫu). So sánh với một số kết quả nghiên cứu những năm trước đây về tỉ lệ nhiễm giun lươn đường ruột tại xã Phú Mỹ Hưng [23] và xã Phú Hòa Đông [24] của huyện Củ Chi của Tp. HCM, có vị trí tiếp giáp phía Đông với huyện Đức Hoà (hình 4.1), gần với địa điểm nghiên cứu, các tác giả đã xác định tỉ lệ nhiễm giun lươn lần lượt là 12,6% ($n = 294$) và 9,2% ($n = 766$). Sự khác biệt về tỉ lệ có thể lý giải bằng những nguyên nhân sau: trong các nghiên cứu ở trên, các tác giả cũng sử dụng đồng thời nhiều kỹ thuật xét nghiệm phân để chẩn đoán nhiễm giun lươn, trong đó có kỹ thuật cấy phân. Trong nghiên cứu của mình, tác giả Lê Đức Vinh sử dụng đồng thời hai kỹ thuật xét nghiệm phân để chẩn đoán nhiễm giun lươn là soi phân và cấy phân Harada Mori cải tiến. Trong khi đó, một đặc điểm đáng lưu ý là ở những người nhiễm giun lươn mạn tính, số lượng AT có trong phân rất ít và xuất hiện từng đợt, không liên tục, nếu chỉ dùng kỹ thuật soi phân thì có độ nhạy rất thấp, chỉ khoảng 30% [91]. Vì vậy,

trong nghiên cứu của chúng tôi với việc chỉ sử dụng duy nhất kỹ thuật soi phân nên khả năng để tìm thấy AT giun lươn trong phân không cao so với các nghiên cứu ở trên. Ngoài ra, các nghiên cứu vừa nêu ở trên của các tác giả cũng tiến hành ở những địa bàn xã, huyện khác, dẫn đến khác nhau về tính chất dịch tễ khu trú cộng với việc khác nhau về thời điểm lấy mẫu so với nghiên cứu của chúng tôi, nên có tỉ lệ nhiễm giun lươn cũng khác nhau. Ví dụ cụ thể như trong nghiên cứu của tác giả Lê Đức Vinh tại huyện Đức Hòa năm 2017 – 2018 cũng cho thấy khác biệt nhiều về tỉ lệ nhiễm giun lươn giữa các xã như: tại xã Đức Lập Thượng tỉ lệ nhiễm lên đến 12,4%, trong khi đó tại thị trấn Đức Hòa thì tỉ lệ nhiễm chỉ là 2,1%. Một sự khác biệt quan trọng nữa là khác biệt về quy mô nghiên cứu, các nghiên cứu trên đều có cỡ mẫu lớn hơn cỡ mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi nên đưa đến sự không tương đồng về tỉ lệ nhiễm giun lươn.

So sánh với một số nghiên cứu khác tại Việt Nam như nghiên cứu của tác giả Vũ Thị Lâm Bình (2014) tại 2 xã Dương Thành, tỉnh Thái Nguyên và Cáo Điền ở tỉnh Phú Thọ cho thấy tỉ lệ nhiễm giun lươn chung trong là 7,6% [2]. Tuy nhiên, tỉ lệ nhiễm giun lươn trong nghiên cứu của tác giả Vũ Thị Lâm Bình là tỉ lệ của những người có kết quả huyết thanh ELISA tìm kháng thể giun lươn dương tính, còn tác giả Vũ Thị Lâm Bình cũng không tìm thấy trường hợp nào nhiễm giun lươn thông qua kỹ thuật xét nghiệm phân trong nghiên cứu của mình. Điều này phù hợp với những điều mà chúng ta đã biết: ưu điểm của các phương pháp miễn dịch phát hiện kháng thể là có độ nhạy cao, thích hợp với các xét nghiệm sàng lọc, tầm soát nhiễm giun lươn và nó cũng có ý nghĩa trong theo dõi hiệu quả điều trị [83], [95] nhưng lại có độ đặc hiệu thấp khi sử dụng xét nghiệm phân làm tiêu chuẩn vàng [53]. Tương tự như vậy, trong nghiên cứu gần đây về nhiễm giun lươn ở miền Bắc Việt Nam của tác giả Nguyễn Văn Đề và cộng sự năm 2019 [82] với cỡ mẫu là 2000

người từ các tỉnh đến khám tại bệnh viện Đại học Y Hà Nội cho thấy có 400 người, tương ứng tỉ lệ 20% có kết quả huyết thanh chẩn đoán tim kháng thể giun lợn dương tính. Tuy nhiên khi soi phân của 400 người có kết quả ELISA dương tính này thì chỉ có 10,5% (42/400) là có kết quả tìm thấy AT giun lợn. Tuy nhiên, một điều đáng lưu ý là 2000 mẫu có trong nghiên cứu này là những mẫu thu từ những bệnh nhân đi khám tại bệnh viện, không phải mẫu thu ngẫu nhiên từ người dân ngoài cộng đồng, vì vậy mẫu trong nghiên cứu này không hoàn toàn đại diện cho mẫu của cộng đồng dân cư.

So sánh với tỉ lệ nhiễm giun lợn của các nước láng giềng với Việt Nam như Lào và Campuchia thì tỉ lệ nhiễm giun lợn trong nghiên cứu này thấp hơn nhiều. Tại Campuchia, các nghiên cứu gần đây cho thấy tỉ lệ nhiễm giun lợn rất cao như ở tỉnh Preah Vihear là 44,7% [36], [64], tỉnh Takeo là 21% [63], vùng nông thôn Campuchia là 31,1% [35]. Các nghiên cứu tại Campuchia đều được thực hiện với cỡ mẫu rất lớn (gần 3000 mẫu) và trong các nghiên cứu này, các tác giả chẩn đoán nhiễm giun lợn bằng cách kết hợp cả phương pháp Kato – Katz, cấy phân trên thạch và phương pháp Baermann. Trong nghiên cứu năm 2017 tại tỉnh Xayaburi, Lào với cỡ mẫu 516 [88] cũng cho thấy tỉ lệ nhiễm giun lợn rất cao là 44,2%, các tác giả sử dụng kỹ thuật cấy trên thạch để chẩn đoán ca nhiễm trong nghiên cứu này. Như vậy, kết quả nghiên cứu của hai nước Lào, Campuchia có chung đường biên giới với Việt Nam thì tỉ lệ cao hơn rất nhiều. Có thể lý giải sự khác biệt về mặt tỉ lệ này do những nguyên nhân sau: thứ nhất là các phương pháp sử dụng trong các nghiên cứu này (gồm có cấy phân, Baermann) có độ nhạy cao và rất phù hợp để sử dụng trong chẩn đoán nhiễm giun lợn, thứ hai là cỡ mẫu sử dụng trong các nghiên cứu này lớn và thứ ba là xét về mặt vị trí địa lý thì những địa phương nghiên cứu này đều ở khá xa vùng biên giới Việt Nam nên có thể dịch tễ của nhiễm GLĐR cũng nhiều khác biệt so với Việt Nam.

So sánh với các nước khác trong khu vực Đông Nam Á cho thấy, nghiên cứu ở Đông Bắc Thái Lan cho thấy tỉ lệ nhiễm giun lươn là 23% với cỡ mẫu là 526 và phương pháp xét nghiệm chẩn đoán nhiễm giun lươn sử dụng trong nghiên cứu cũng là cấy phân trên thạch [89]. Tác giả Myo Pa Pa (2018) nghiên cứu tại Myanmar xác định kết quả tỉ lệ nhiễm chung 5,7%, các tác giả sử dụng kỹ thuật cấy trên thạch trong chẩn đoán ca nhiễm [80]. Nhìn chung các kết quả nghiên cứu tại Thái Lan, Myanmar cũng cho kết quả là tỉ lệ nhiễm GLĐR cao hơn kết quả của nghiên cứu này. Điều này cũng có thể lý giải là sự khác biệt về yếu tố dịch tễ và kỹ thuật xét nghiệm phân chẩn đoán nhiễm GLĐR trong các nghiên cứu trên cũng nhạy hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Từ các kết quả nghiên cứu trên, có thể đi đến kết luận các quốc gia tại khu vực Đông Nam Á là vùng lưu hành nặng của bệnh giun lươn [15], [99].

So sánh với các khu vực khác trên thế giới như nghiên cứu tại huyện Gisagara, thuộc một tỉnh phía nam của Rwanda xác định tỉ lệ nhiễm giun lươn bằng kỹ thuật cấy phân trên thạch và soi phân là 17,4% [30]. Nghiên cứu trên đối tượng trẻ em Ethiopia, xác định tỉ lệ nhiễm giun lươn là 20,7% thông qua ba phương pháp kỹ thuật tập trung AT giun lươn dùng Ether-formaline, Baermann và PCR [34]. Tại khu vực Nam Mỹ, một nghiên cứu được thực hiện tại Bolivia trong năm 2018 với cỡ mẫu là 1.151 xác định tỉ lệ nhiễm giun lươn thông qua áp dụng phối hợp bốn kỹ thuật xét nghiệm phân gồm soi phân trực tiếp, kỹ thuật tập trung AT giun lươn dùng Ether-formaline, Baermann và cấy phân trên thạch là 7,6%, còn bằng phương pháp chẩn đoán huyết thanh ELISA xác định tỉ lệ nhiễm giun lươn là 23% [69]. Các nghiên cứu tại nước Úc cho thấy ở phía Bắc nước Úc tỉ lệ nhiễm GLĐR được chẩn đoán bằng phương pháp soi phân kỹ thuật tập trung AT giun lươn dùng Ether-formaline là 0,4%, còn với kỹ thuật PCR là 6% (cỡ mẫu là 695) [49] và ở đối tượng trẻ

em ở miền Trung nước Úc có tỉ lệ dương tính với phương pháp ELISA phát hiện kháng thể của giun lươn là 16,1% (cỡ mẫu là 186) [32]. Trong khi đó tại châu Âu, một nghiên cứu trên những người ghép thận cho thấy tỉ lệ dương tính với phương pháp ELISA phát hiện kháng thể của giun lươn là 3% (cỡ mẫu là 200). Như vậy, tỉ lệ nhiễm giun lươn cao vượt trội tại các quốc gia Châu Phi, Nam Mỹ, Đông Nam Á đã góp phần cập nhật và xác định chính xác hơn bản đồ phân bố giun lươn trên toàn cầu, tương ứng với nhận định bệnh giun lươn phân bố nhiều ở khu vực Đông Nam Á, châu Phi, Trung và Nam Mỹ [15], [99].

4.2.3.2 So sánh bộ kit với bộ môi có cùng mục đích

Để so sánh bộ kit LAMP của chúng tôi và bộ kit có cùng mục đích, chúng tôi tiến hành tìm hiểu về các bộ kit sẵn có. Tuy nhiên chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR được thương mại hóa trên thị trường. Vì vậy, chúng tôi tiến hành so sánh bộ kit LAMP trong nghiên cứu của chúng tôi với kết quả ứng dụng bộ môi LAMP chẩn đoán GLĐR của tác giả Perdro- Fernandez-Soto và cộng sự được công bố trên tạp chí Plos Neglected tropical diseases năm 2016 [86] thông qua tiến hành thực nghiệm trên 50 mẫu: 25 mẫu dương tính, 25 mẫu âm tính. Kết quả dương tính, âm tính của 50 mẫu này đã được xác định bằng phương pháp real-time PCR. Kết quả được thể hiện qua phụ lục 4 và so sánh sự tương đồng của 2 bộ kit thông qua bảng 3.19. Kết quả cho thấy hệ số Kappa khi so sánh giữa 2 bộ kit là 0,91 chứng tỏ bộ kit LAMP của chúng tôi phù hợp cao với bộ môi đã công bố của Perdro. Điều này chứng tỏ bộ kit của chúng tôi đáp ứng tiêu chuẩn và độ tin cậy để phục vụ nhu cầu sử dụng cho các nghiên cứu đánh giá hoặc áp dụng kỹ thuật LAMP vào chẩn đoán nhiễm GLĐR.

4.2.3.3 So sánh 3 kỹ thuật LAMP, soi phân trực tiếp và ELISA trong chẩn đoán nhiễm giun lươn tại khoa khám bệnh chuyên ngành, Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương

- So sánh kỹ thuật LAMP và soi phân trực tiếp

Phụ lục 5, bảng 3.20 và 3.21 cho thấy kết quả so sánh khi sử dụng đồng thời kỹ thuật LAMP và soi phân trực tiếp để chẩn đoán nhiễm giun lươn trên các bệnh nhân đến khám tại khoa Khám bệnh chuyên ngành, Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương. Kết quả tính được hệ số $K = 0,39$ chứng tỏ khả năng phát hiện chẩn đoán của bộ kit LAMP là phù hợp thấp với phương pháp soi phân trực tiếp. Kỹ thuật mà chúng tôi sử dụng để xét nghiệm phân trong nghiên cứu là quan sát phết phân dưới kính vi để tìm AT giun lươn, mà như chúng ta đã biết các xét nghiệm phân sử dụng KHV thông thường có độ nhạy thấp trong chẩn đoán giun lươn [31], trong khi LAMP được đánh giá là có độ nhạy cao hơn. Thực tế, từ kết quả của hai phương pháp LAMP và soi phân, chúng tôi ghi nhận có 43 trường hợp dương tính với LAMP nhưng soi phân lại không tìm thấy AT giun lươn. Ngược lại, có 1 trường hợp soi phân thấy AT giun lươn nhưng kết quả LAMP lại âm tính. Việc có một mẫu soi phân dương tính nhưng kết quả LAMP lại âm tính có thể giải thích do các nguyên nhân như sau: nguyên nhân thứ nhất là lượng phân dùng để tách chiết ADN khi thực hiện LAMP nhỏ, có thể dẫn đến âm tính giả. Vấn đề này cũng được tác giả Verweij và cộng sự đã nêu lên trong nghiên cứu của mình là các xét nghiệm tìm AT giun lươn bằng kỹ thuật SHPT không có độ nhạy tốt hơn phương pháp Baerman hoặc cấy trên đĩa thạch mà nguyên nhân là do lượng phân tươi được sử dụng đối với xét nghiệm PCR thấp hơn 40 lần so với lượng phân trong phương pháp Baermann hoặc cấy trên đĩa thạch [31], [111]. Nguyên nhân thứ hai có thể là do bộ mồi của bộ kit LAMP có thể không đặc hiệu cho tất cả loài giun lươn có ở Việt Nam. Thực tế, trong nghiên cứu mới đây của

minh, tác giả Lê Đức Vinh đã xác định được có 2 loài giun lươn gây bệnh tại Đức Hòa – Long An là *Strongyloides stercoralis* và *Stroglyoides ratti* [25]. Nguyên nhân thứ ba là một nguyên nhân chủ quan mà chúng tôi cũng như các tác giả của các nghiên cứu khác không loại trừ, đó là sự khó phân biệt giữa AT giun móc và AT giun lươn trong quá trình soi phân có thể dẫn đến sai lầm khi định danh ấu trùng giun của mẫu phân. Điều này làm cho số trường hợp âm tính giả của kỹ thuật LAMP bị tăng lên khi đánh giá kết quả LAMP mà sử dụng soi phân làm phương pháp tham chiếu [37], [98]. Kết quả khác biệt giữa PCR và soi phân cũng gặp trong nhiều nghiên cứu khác như nghiên cứu so sánh giữa phương pháp PCR và chẩn đoán hình thái học của giun lươn của tác giả Silvia A. Repetto và cộng sự (2016) cũng cho thấy với phương pháp PCR phát hiện được 71/237 mẫu có nhiễm giun lươn, nhưng chỉ có 35/237 mẫu phân phát hiện thông qua chẩn đoán hình thái học với bốn lần lấy phân [103] hay một nghiên cứu khác của tác giả Laura Fracisca Campo-Polanc (2018) cho thấy có 32/143 phát hiện nhiễm giun lươn qua phương pháp qPCR nhưng khi soi phân trực tiếp thì không phát hiện mẫu nào có AT giun lươn [68]. Còn trong nghiên cứu phân tích tổng hợp của tác giả Dora Buonfrate và cộng sự (2018) về vai trò của phương pháp sinh học phân tử trong chẩn đoán nhiễm giun lươn cho thấy PCR thích hợp là một xét nghiệm mang tính khẳng định hơn là dùng trong sàng lọc [43]. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu mà tác giả Dora Buonfrate và cộng sự tổng hợp là từ các nghiên cứu mà phương pháp tham chiếu với phương pháp sinh học phân tử là các phương pháp Baermann, cấy phân trên thạch hoặc huyết thanh chẩn đoán, vốn dĩ có độ nhạy cao trong chẩn đoán giun lươn. Như vậy một lần nữa có thể nói so với phương pháp soi phân tìm ấu trùng giun lươn thì các phương pháp sinh tử chẩn đoán giun lươn như PCR truyền thống, qPCR hay LAMP vẫn có độ nhạy cao hơn.

- So sánh kỹ thuật LAMP và ELISA

Phụ lục 5, bảng 3.20 và 3.22 cho thấy kết quả so sánh khi sử dụng đồng thời kỹ thuật LAMP và ELISA để chẩn đoán nhiễm giun lươn trên các bệnh nhân đến khám tại khoa Khám bệnh chuyên ngành, Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương. Tỷ lệ dương tính với giun lươn của 2 phương pháp là gần như nhau (71/141 và 73/141), cao hơn nhiều so với tỷ lệ của phương pháp soi phân (31/141). Như chúng ta đã biết cả hai phương pháp LAMP và ELISA đều có độ nhạy cao có trong chẩn đoán giun lươn. Theo kết quả tính được hệ số $K = 0,74$ chứng tỏ khả năng phát hiện chẩn đoán của bộ kit LAMP là phù hợp khá với phương pháp ELISA. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có 18 trường hợp chỉ dương tính với một trong hai kỹ thuật LAMP và ELISA. Điều này được lý giải do hai phương pháp này sử dụng hai cơ chế khác nhau, phương pháp LAMP giúp phát hiện sự hiện diện của sản phẩm ADN của giun lươn có trong phân, còn ELISA lại phát hiện kháng thể kháng giun lươn trong huyết thanh. Vì vậy trong những trường hợp kháng thể trong huyết thanh và ADN của giun lươn trong phân không xuất hiện song hành cùng nhau thì sẽ có kết quả khác nhau giữa kết quả ELISA và LAMP. Ví dụ như trong giai đoạn mới nhiễm giun lươn thì trong huyết thanh sẽ chưa có hoặc có ít kháng thể giun lươn, dẫn đến ELISA có kết quả âm tính, còn LAMP có kết quả dương tính. Ngược lại, trong trường hợp bệnh nhân đã hết nhiễm giun lươn nhưng kháng thể kháng giun lươn vẫn có thể còn tồn tại nhiều tháng thì trong trường hợp này LAMP có kết quả âm tính nhưng ELISA lại có kết quả dương tính. Đó là lý do mà kết quả là hai phương pháp phù hợp khá với nhau. So sánh kết quả này với kết quả nghiên cứu tương tự của tác giả Fabiana Martins de Paula và cộng sự (2016) [45]. Trong nghiên cứu của tác giả Fabiana Martins de Paula và cs, các tác giả đã so sánh kết quả của phương pháp ELISA và qPCR để chẩn đoán nhiễm giun lươn trên những bệnh nhân suy

giảm miễn dịch. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy phương pháp qPCR nhạy hơn so với LAMP, có khác biệt so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Điều này được giải thích do những nguyên nhân sau: phương pháp dùng để so sánh với ELISA của hai phương pháp cùng là chẩn đoán sinh học phân tử nhưng có khác nhau là LAMP và qPCR, vì vậy độ nhạy vẫn có thể khác nhau. Tuy nhiên yếu tố quan trọng hơn đó là đối tượng trong nghiên cứu của tác giả Fabiana Martins de Paula và cs là bệnh nhân suy giảm miễn dịch, vì vậy khả năng tạo kháng thể kháng giun lươn có thể bị suy giảm và ảnh hưởng đến kết quả ELISA. Như vậy có thể nói, phương pháp LAMP ưu việt hơn phương pháp ELISA vì có thể áp dụng được cho chẩn đoán nhiễm giun lươn ở mọi đối tượng bệnh nhân.

4.2.4 Đăng ký kiểm định tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit

Từ những kết quả nghiên cứu, nhóm nghiên cứu đã hoàn thiện bộ tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột dựa trên các thông số: Nhận dạng sản phẩm, độ nhạy, độ đặc hiệu, ngưỡng phát hiện, thời gian xét nghiệm, độ ổn định (bảng 3.23). Bộ tiêu chuẩn cơ sở này đã được thẩm định bởi Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế là đạt yêu cầu theo đúng công bố (phụ lục 6). Từ những tiêu chuẩn cơ sở này, có thể thấy rằng bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis* trong nghiên cứu của chúng tôi có độ nhạy, độ đặc hiệu tốt trong chẩn đoán nhiễm giun lươn, có ngưỡng phát hiện thấp, thời gian thực hiện nhanh, dễ quan sát, ghi nhận kết quả và có thể bảo quản bộ kit trong thời gian 6 tháng – 1 năm tùy theo điều kiện là có tủ lạnh thông thường hay có tủ lạnh âm sâu. Với những tiêu chuẩn cơ sở này đã đạt yêu cầu những chỉ số đề ra trong nghiên cứu của chúng tôi và đủ điều kiện để có thể hướng đến triển khai rộng rãi hơn ở thực địa.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột (*Strongyloides stercoralis*) ở người 2017-2020, chúng tôi có những kết luận như sau:

5.1. Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở người

5.1.1 Đã xây dựng quy trình chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* gồm có bốn bước:

- Bước 1: Thiết kế bộ mồi đặc hiệu cho giun lươn đường ruột trên vùng gen 18S rRNA gồm 6 mồi cụ thể là:

- + F3 (21 bp) có trình tự AGAGGGTTTAAACCAGACATT
- + B3 (22 bp) có trình tự CTTCGAACCTCTAACTTTCGTT
- + FIP (45 bp) có trình tự GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA-GGTCTAGCATGGAATAACACT
- + BIP (50 bp) có trình tự TACGTTAGAGGTGAAATTCTTGAC-CTTGATTAATGAAAACATTCTTGGC
- + LF (21 bp) có trình tự GGTCTAGCATGGAATAACACT
- + LB (24 bp) có trình tự GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA.

- Bước 2: Các điều kiện phản ứng được tối ưu hóa như sau:

- + Nhiệt độ bắt cặp mồi là 63°C
- + Thời gian phản ứng là 60 phút
- + Nồng độ Mg²⁺ là 8mM
- + Chỉ thị màu sử dụng là xanh malachit 0,004%

- Bước 3: Xác định ngưỡng phát hiện LOD 95% của bộ kit là 2,12x10⁰ bản sao gen/μL

- Bước 4: Chế tạo chứng dương bằng cách tạo plasmid tái tổ hợp mang vùng trình tự bảo tồn trên gen 18S rRNA của giun lươn đường ruột sử dụng vector tách dòng pUC19.

5.1.2 Từ quy trình trên, chúng tôi đã chế tạo thành công bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở quy mô phòng thí nghiệm với số lượng là 2000 test.

5.2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, tính ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm và thực địa

- Bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột trong nghiên cứu của chúng tôi có độ nhạy là 96,88% (CI 95%: 83,78% đến 99,92%) và độ đặc hiệu là 97,00% (CI 95%: 91,48%-99,38%) với phương pháp tham chiếu là qPCR.

- Bộ kit hoạt động ổn định sau 12 tháng nếu bảo quản ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ và 6 tháng sau khi mở nắp trong điều kiện bảo quản $2-8^{\circ}\text{C}$.

- Đánh giá bộ kit tại thực địa (300 mẫu): tương đồng 100% với qPCR.

- So sánh bộ kit với bộ mồi có cùng mục đích (bộ mồi Perdro- Fernandez-Soto và cs) có kết quả hệ số tương đồng $K = 0,91$, chứng tỏ phù hợp cao

- Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế thẩm định và kết luận bộ tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit này đạt yêu cầu theo đúng công bố.

KIẾN NGHỊ

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu, đề tài có một số kiến nghị sau đây:

- Tiếp tục đánh giá bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* trên các mẫu lâm sàng ở phạm vi rộng hơn để khẳng định hiệu quả của bộ kit tại thực địa.
- Nghiên cứu cải tạo cách thức đóng gói bộ kit để phù hợp với yêu cầu của các đơn vị sử dụng.
- Đăng ký sở hữu trí tuệ và công nghệ để có thể sản xuất bộ kit cung cấp cho các bệnh viện tuyến tỉnh, tuyến huyện và các cơ sở nghiên cứu, giảng dạy trong cả nước.

TÍNH KHOA HỌC, TÍNH MỚI, Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Đề tài đã áp dụng các phương pháp nghiên cứu có tính khoa học chuẩn mực hiện đang áp dụng rộng rãi tại Việt Nam và Thế giới
- Hoàn thiện được quy trình và chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở Việt Nam ở quy mô phòng thí nghiệm.
- Đây là nghiên cứu đầu tiên nghiên cứu xây dựng bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở Việt Nam. Trong bối cảnh trên thế giới chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm giun lươn được thương mại hóa, việc chế tạo thành công bộ kit tạo ra được bước đột phá về giải pháp kỹ thuật trong chẩn đoán nhiễm giun lươn, đóng góp vào công tác chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời, đáp ứng yêu cầu thực tiễn phòng chống giun lươn đường ruột tại nước ta.

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO LIÊN QUAN TRỰC TIẾP ĐẾN NỘI
DUNG LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ**

1. Trần Thị Kim Chi, Nguyễn Thị Hương Bình, Trần Xuân Mai và CS (2021),
“Xây dựng quy trình kỹ thuật LAMP để chẩn đoán giun lươn đường ruột
Strongyloides stercoralis ở người”, *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các
bệnh ký sinh trùng*, số 1 /2021.

2. Trần Thị Kim Chi, Nguyễn Thị Hương Bình, Trần Xuân Mai và CS (2021),
“Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ Kit LAMP chẩn đoán nhiễm giun lươn
đường ruột *Strongyloides stercoralis* ở người”, *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt
rét và các bệnh ký sinh trùng*, số 1 /2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

❖ Tài liệu tiếng Việt

1. Vũ Thị Lâm Bình và các cộng sự (2014), “Thực trạng nhiễm giun lươn đường ruột tại xã Dương Thành, huyện Phú Bình, tỉnh Thái Nguyên và hiệu quả điều trị giun lươn bằng Albendazole”, *Tạp chí PC bệnh sốt rét và các bệnh KST*, 3, tr. 5-9.
2. Vũ Thị Lâm Bình và các cộng sự (2014), “Thực trạng nhiễm giun lươn đường ruột tại xã Dương Thành, huyện Phú Bình, tỉnh Thái Nguyên và xã Cáo Điền, huyện Hạ Hòa, tỉnh Phú Thọ”, *Tạp chí PC bệnh sốt rét và các bệnh KST*, 3, tr. 10-14.
3. Bộ y tế (2020), “Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và phòng bệnh giun lươn”, Số: 2139/QĐ-BYT.
4. Nghiêm Thị Minh Châu và các cộng sự (2015), “Thông báo và rút kinh nghiệm về bệnh nhân nhiễm giun lươn thể lan tỏa suy mòn nặng được chẩn đoán và điều trị thành công tại Bệnh viện Quân y 103”, *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, số 6, 161-166.
5. Trần Thị Kim Dung và các cộng sự (2009), “Tìm hiểu các đặc điểm của bệnh nhiễm giun lươn trên các bệnh nhân nhập viện có triệu chứng lâm sàng ở dạ dày tá tràng”, *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 13, Phụ bản của Số 1, tr 38-45.
6. Trần Thanh Dương và các cộng sự (2015), *Giun lươn*. In *Dịch tễ học Ký sinh trùng y học* (pp. tr. 478-481), Nhà xuất bản y học.

7. Trần Thanh Dương và các cộng sự (2016), *Kỹ sinh trùng y học* (trang 288-300); Nhà xuất bản y học.
8. Trần Thanh Dương và các cộng sự (2018), *Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và phòng bệnh giun lươn*. In *Quy trình xét nghiệm chuẩn, Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng* (pp. tr.254-258), Nhà xuất bản Y học.
9. Hoàng Phú Hiệp, Lê Quang Huân (2011), “Kỹ thuật LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) hướng đi mới trong việc tạo Kit phát hiện nhanh bệnh truyền nhiễm”, *Tạp chí khoa học và công nghệ*, 90(02): 43-48.
10. Hoàng Phú Hiệp, Lê Quang Huân (2012), “Phát triển kỹ thuật LAM (Loop-mediated isothermal amplification) cho việc phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn *Escherichia coli* O157:H7”, *Tạp chí sinh học*. 34 (03): 343-346.
11. Dương Thị Hồng, Nguyễn Quang Thiệu, Đặng Thị Thanh, Phạm Ngọc Doanh (2019), “Định danh ấu trùng giun lươn *Strongyloides stercoralis* thu từ bệnh nhân bằng kỹ thuật phân tử dựa trên trình tự gen 18S”, *Kỷ yếu hội nghị kỹ sinh trùng toàn quốc lần thứ 46* (tr. 31-37), NXB Học viện nông nghiệp.
12. Trần Thị Hồng và các cộng sự (2012), “Giá trị của phương pháp elisa trong chẩn đoán nhiễm giun lươn *Strongyloides stercoralis*”, *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 16, Phụ bản của Số 1, tr24-29.
13. Trần Thị Hồng và các cộng sự (2017), *Giun lươn Strongyloides spp.* In *Kỹ sinh trùng y học* (pp. tr. 147-155), Nhà xuất bản Y học.

14. Nguyễn Thu Hương và các cộng sự (2013), “Báo cáo ca bệnh tăng nhiễm giun lươn điều trị khỏi bằng thiabendazole đường uống”, *Tạp chí Y học thực hành*, số 9, tr 75-78.
15. Nguyễn Thu Hương và các cộng sự (2014), “Tổng hợp và cập nhật y văn thế giới về bệnh ký sinh trùng giun lươn ở người: căn bệnh nhiệt đới bị lãng quên”, *Tạp chí PC bệnh sốt rét và các bệnh KST*, tr. 4-13.
16. Trần Xuân Mai, Trần Thị Kim Dung, Lê Thị Xuân, Phan Anh Tuấn (2015), *Ký sinh trùng y học*; Nhà xuất bản y học; TP. Hồ Chí Minh.
17. Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Nguyễn Thị Hương Bình, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Thị Thu Huyền, Trần Văn Hải, Trần Thanh Dương (2020), “Phát triển kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan lớn *Fasciola spp*”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, tr. 23-28.
18. Huỳnh Hồng Quang và các cộng sự (2013), “Lâm sàng, cận lâm sàng và hiệu lực phác đồ albendazole (ALB) trên bệnh nhân nhiễm giun lươn *Strongyloides stercoralis* chưa biến chứng tại 5 tỉnh ven biển miền Trung, Việt Nam”, *Tạp chí y học thực hành Tp.HCM*, tập 17(1), tr. 116-122.
19. Trần Phú Mạnh Siêu và các cộng sự (2006), “Bệnh nhiễm giun lươn đường tiêu hóa nhân một số trường hợp lâm sàng”, *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 10, phụ bản số 1, tr 105-109.
20. Trần Phú Mạnh Siêu và các cộng sự (2007), “Nhân một trường hợp viêm màng não thứ phát do nhiễm *Strongyloides stercoralis* tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới, TP Hồ Chí Minh”, *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, tập 11, phụ bản số 2, tr 58-60.

21. Trần Thị Khánh Tường (2007), “Một trường hợp nhiễm giun lươn lan tỏa trên bệnh nhân sử dụng corticosteroid”, *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 11, phụ bản số 2, tr 54-57.
22. Trần Thị Huệ Vân và các cộng sự, (2018), “Hội chứng tăng nhiễm giun lươn ở bệnh nhân sử dụng Corticosteroid”, *Y Học TP. Hồ Chí Minh*, Phụ Bản Tập 22, Số 2, 155 - 161.
23. Lê Đức Vinh và các cộng sự (2005, tập 9, phụ bản số 4), “Điều tra nhiễm *Strongyloides stercoralis* bằng các phương pháp xét nghiệm phân cải tiến tại xã Phú Mỹ Hưng, huyện Củ Chi, TP.HCM từ tháng 6 /2003 đến tháng 7/2004”, *Tạp chí y học TP.HCM*, tr. 101-105.
24. Lê Đức Vinh, Trần Thị Hồng (2006), “Điều tra nhiễm *Strongyloides stercoralis* bằng phương pháp cấy nghiệm phân cải tiến tại xã Phú Hòa Đông, huyện Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 7/2006 đến tháng 12/2006”, *Y học TP. Hồ Chí Minh*, Phụ bản 11, trang 39-41.
25. Lê Đức Vinh (2020). *Nghiên cứu thực trạng, một số yếu tố liên quan đến nhiễm giun lươn Strongyloides spp và kết quả điều trị bằng Ivermectin tại huyện Đức Hòa, tỉnh Long An (2017 - 2018)*. Hà Nội: Luận án tiến sĩ y học, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.
26. Lê Thị Xuân (2008) *Ký sinh trùng thực hành*; Nhà xuất bản giáo dục; TP. Hồ Chí Minh.

❖ Tài liệu tiếng Anh

27. Ahmad AF, H. F. (2013). Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. *Parasitol Res*, 112: 2811–2816.

28. Alejandro J. Krolewiecki Patrick Lammie, et al (2013), A Public Health Response against *Strongyloides stercoralis* : Time to Look at Soil-Transmitted, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Volume 7 (5), e2165.
29. Alejandro Krolewiecki, T. B. (2019). Strongyloidiasis: a neglected Tropical Disease. *Infect Dis Clin North Am.*, 33(1): 135–151.
30. Aloys Tuyizere, A. N. (2018). Prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection and other soil-transmitted helminths by cross-sectional survey in a rural community in Gisagara District, Southern Province, Rwanda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112: 97–102.
31. Ana Requena-Méndez, et al (2013), The Laboratory Diagnosis and Follow Up of Strongyloidiasis: A Systematic Review, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Volume 7(1), e2002.
32. Angela Wilson, D. F. (2018). Paediatric Strongyloidiasis in Central Australia. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3, 64 .
33. Annette Olsen Lisette van Lieshout, et al (2009), Strongyloidiasis — the most neglected of the neglected tropical diseases, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 103, 967—972.
34. Aranzazu Amor, E. R.-Q. (2016). High prevalence of *Strongyloides stercoralis* in school-aged children in a rural highland of north-western Ethiopia: the role of intensive diagnostic work-up. *Parasites & Vectors*, 9:617.

35. Armelle Forrer, V. K. (2017). *Strongyloides stercoralis* is associated with significant morbidity in rural Cambodia, including stunting in children. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(10): e0005685.
36. Armelle Forrer, V. K. (2018). *Strongyloides stercoralis* and hookworm co-infection: spatial distribution and determinants in Preah Vihear Province, Cambodia. *Parasites & Vectors*, 11:33 .
37. Becker SL, P. N. (2015). Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Cote d'Ivoire: diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection. *ActaTrop*, 150: 210–217.
38. Carmen Gallas-Lindemann, et al (2017), Loop-MediatTed Isothermal Amplification: An Advanced Method for the Detection of Giardia, *IntechOpen*, chapter 7, 109-130.
39. *Centers for Disease Control and Prevention*. (2018, December 31). Retrieved from CDC Web site:
<https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/epi.html>
40. David M. Naeger, M. P. (2013). Correctly using sensitivity, specificity, and predictive values in clinical practice: how to avoid three common pitfalls. *American Journal of Roentgenology*, Volume 200, Number 6 .
41. Dinzouna-Boutamba SD Yang HW, et al (2014), The development of loop-mediated isothermal amplification targeting alpha-tubulin DNA for the rapid detection of *Plasmodium vivax*, *Malaria journal*, p. 13: 248.

42. Dora Buonfrate, F. F. (2015). Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 21: 543–552.
43. Dora Buonfrate, A. R.-M. (2018). Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(2): e0006229.
44. Fabiana Martins de Paula, e. a. (2015). Molecular diagnosis of strongyloidiasis in tropical areas: a comparison of conventional and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 110(2): 272-27.
45. Fabiana Martins de PAULA, e. a. (2016). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in immunocompromised patients by serological and molecular methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 58:63.
46. Faust, E. C. (1955). *Animal Agents and Vectors of Human Disease*. Philadelphia: Lea & Febiger.
47. Feliciano ND, G. H.-P. (2010). Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 67: 153–161.
48. Fernando Salvador, E. S.-M. (2014). Usefulness of *Strongyloides stercoralis* Serology in the Management of Patients with Eosinophilia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 90(5), pp. 830–834 .

49. Gemma J. Robertson, A. V. (2017). Application of PCR-Based Tools to Explore *Strongyloides* Infection in People in Parts of Northern Australia. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2, 62.
50. George Vasquez-Rios, R. P.-R.-R. (2019). *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a deeper understanding of a neglected disease. *Journal of Parasitic Diseases*, 43(2): 167–175.
51. Gilles Eperon, J. T. (2018). Severe Strongyloidiasis in Solid Organ Transplant Recipients: Should We Preventively Treat the Recipient, the Donor, or Both? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 98(4), pp. 941–944.
52. Goka AK, R. D. (1990). Diagnosis of *Strongyloides* and hookworm infections: comparison of faecal and duodenal fluid microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84: 829–831.
53. Gyorkos TW, G. R. (1990). Seroepidemiology of *Strongyloides* infection in the Southeast Asian refugee population in Canada. *American journal of epidemiology*, 132: 257–264.
54. Han ET, W. R. (2007). Detection of Four *Plasmodium* Species by Genus- and Species-Specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8): 2521–2528.
55. Han, E.-T. (2013). Loop-mediated isothermal amplification test for the molecular diagnosis of malaria. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, Volume 13, 2013 - Issue 2, 205-218.
56. Hasegawa H, H. S. (2009). Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp. as markers for species-specific diagnosis. *Parasitol Res*, 104: 869–874.

57. Joel L. N. Barratt, e. a. (2019). A global genotyping survey of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides fuelleborni* using deep amplicon sequencing. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(9): e0007609.
58. Joelma Nascimento De Souza, e. a. (2018). Case Report: *Strongyloides stercoralis* Hyperinfection in a Patient with HTLV-1: An Infection with Filariform and Rhabditiform Larvae, Eggs, and Free-Living Adult Females Output. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 99(6), pp. 1583–1586.
59. Jongwutiwes S, C. M. (1999). Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93: 398–400.
60. Kapila K, P. S.-B. (2005). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in a routine cervical smear. *Diagn Cytopatho*, 33: 31–32.
61. Karanis P, T. O. (2008). Development and Preliminary Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Procedure for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal and Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17): 5660–5662.
62. Kartik Natrajan, M. M. (2018). Strongyloidosis Hyperinfection Syndrome in an HIV-Infected Patient: A Rare Manifestation of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. *Case Reports in Infectious Diseases*, Article ID 6870768, 4 pages.
63. Khieu, V. S. (2014). Prevalence and risk factors of *Strongyloides stercoralis* in Takeo Province, Cambodia. *Parasite Vectors*, 7,221.

64. Khieu, V. S. (2014). High prevalence and spatial distribution of *Strongyloides stercoralis* in rural Cambodia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2854.
65. Kittipat Aupalee, A. W. (2020). Genomic studies on *Strongyloides stercoralis* in northern and western Thailand. *Parasites & Vectors*, 13:250.
66. Koga K, K. S. (1991). A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45: 518–521.
67. Kramme S, N. N. (2011). Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. *Journal of Medical Microbiology* , 60: 454–458.
68. Laura Francisca Campo-Polanco, J. M. (2018). Strongyloidiasis in humans: diagnostic efficacy of four conventional methods and real-time polymerase chain reaction. *Rev Soc Bras Med Trop*, 51(4):493-502.
69. Laurent Ge'tazID, R. C.-E.-V.-R. (2019). Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* infection in Bolivian patTients at high risk of complications. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(1): e0007028.
70. Lucchi NW, G. M. (2016). Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites. *Scientific Reports*, 6:36808.
71. Mandana Fadaei Tehrani, M. S. (2019). Molecular characterization of human isolates of *Strongyloides stercoralis* and *Rhabditis* spp. based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1). *BMC Infectious Diseases*, 19:776.

72. Marra NM, C.-M. F.-P. (2010). Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105: 57–61.
73. Matthew R. Watts, G. J.-A. (2014). A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for *Strongyloides stercoralis* in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 306–311.
74. Matthew R. Watts, R. K. (2019). Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification and real-time PCR Assays for Detection of *Strongyloides* Larvae in Different Specimen Matrices. *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 57 Issue 4 e01173-18 .
75. Mayekar V, R. I. (2013). Serendipitously identified *Strongyloides stercoralis* in a cervicovaginal smear. *Journal of Cytology*, 30(4): 270–271.
76. Mehlhorn, H. (2016). *Strongyloides*. In H. Mehlhorn, *Encyclopedia of Parasitology - fourth edition* (pp. 2567-2577). Berlin, Germany: Springer Nature.
77. Meysam Sharifdini, A. K. (2018). Molecular diagnosis of strongyloidiasis in a population of an endemic area through nested-PCR. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 11(1):68-74.
78. Miao-Han Deng, L.-Y. Z.-Y. (2019). Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: a review of updated technology and future outlook. *Infectious Diseases of Poverty*, 8:20.

79. Moghaddassani H, M. H. (2011). Molecular Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection by PCR Detection of Specific DNA in Human Stool Samples . *Iran J Parasitol*, 6: 23–30.
80. Myo Pa Pa Thet Hnin Htwe Aung, A. H. (2018). Prevalence and associated risk factors of *Strongyloides stercoralis* infection in Lower Myanmar. *Tropical Medicine and Health*, 46:43.
81. Naomi W. Lucchi, D. L.-F. (2016). Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Plasmodium* spp. Parasites. *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.015143.
82. Nguyen Van De, P. N.-C. (2019). Strongyloidiasis in northern Vietnam: epidemiology, clinical characteristics and molecular diagnosis of the causal agent. *Parasites & Vectors*, 12:515.
83. Norsyahida Arifin, K. M. (2019). Serodiagnosis and early detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52, 371e378.
84. Nutman, R. M. (2012). Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Curr Opin Infect Dis*, 25: 458–463.
85. Nutman, T. B. (2017). Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*, 144(3), pp. 263-273.
86. Pedro Fernández-Soto, A. S.-H.-A. (2016). Strong-LAMP: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples.

Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(7): e0004836.

87. Pedro Fernández-Soto, C. T.-G.-F.-C. (2020). Strong-LAMP Assay Based on a *Strongyloides* spp.-Derived Partial Sequence in the 18S rRNA as Potential Biomarker for Strongyloidiasis Diagnosis in Human Urine Samples. *Disease Markers*, Article ID 5265198.
88. Phasouk Senephansiri, P. L. (2017). Status and Risk Factors of *Strongyloides* Infection in Rural Communities of Xayaburi Province, Lao PDR. *Korean J Parasitol*, Vol. 55, 569-573.
89. Pokkamol Laoraksawong, O. S. (2018). Current high prevalences of *Strongyloides stercoralis* and *Opisthorchis viverrini* infections in rural communities in northeast Thailand and associated risk factors. *BMC Public Health*, 18:940 .
90. R. B. Sitta, F. M. (2014). Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*, doi:10.1017/S0031182013002035.
91. Ravi Varatharajalu, K. V. (2016). *Strongyloides stercoralis*: current perspectives. *Dovepress*, Reports in Parasitology 2016:5 23–33.
92. Richelle Guerrero-Wooley, e. a. (2017). Case Report: *Strongyloides stercoralis* Hyperinfection in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 97(5), pp. 1629–1631.
93. Robert M. Nishikawa, P. L. (2013). Estimating Sensitivity and Specificityfor Technology Assessment Basedon Observer Studies. *Academic radiology*, 825-830.

94. Rojelio Mejia, T. B. (2012). Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Curr Opin Infect Dis*, 25(4):458-63.
95. Rutjes AW, R. J. (2007). Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Health Technol Assess*, 11: iii, ix–51.
96. Sarunya Tedlongthong, N. V. (2017). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay combined with malachite green as a rapid screening test for *Candidatus Mycoplasma haemominutum* infection in cats. *Science Asia*, 354-361.
97. Sato Y, K. J. (1995). Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. *Am J Trop Med Hyg*, 53: 248–250.
98. Schar F, O. P. (2013). Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. *Acta Trop*, 126:89-92.
99. Schoar F., T. U. (2013, volume7). *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. *PLOS Neglected Tropical Disease*, e2288.
100. Sharifdini M, M. H. (2015). Comparison of nested polymerase chain reaction and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods for detection of *Strongyloides stercoralis* in human fecal samples. *Am J Trop Med Hyg*, 93: 1285–1291.
101. Shih-Yu Liang, et al. (2009). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 47, No. 6, 1892–1895.

102. Siddiqui AA, B. S. (2001). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis.*, 33(7):1040-7.
103. Silvia A. Repetto, P. R. (2016). Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: A proposed algorithm. *Acta Tropica*, 169–177.
104. Siyu Zhou, D. H. (2019). From the feces to the genome: a guideline for the isolation and preservation of *Strongyloides stercoralis* in the field for genetic and genomic analysis of individual worms. *Parasites & Vectors*, 12: 496 .
105. SR Jones, S Carley, M Harrison (2003). An introduction to power and sample size estimation. *Emergency Medical Journal* 20, 453–458.
106. Stefanie Kramme, N. N. (2011). Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 454–458.
107. Sykes AM, M. J. (2011). A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 5: e955.
108. *The principle of LAMP method.* (2018, 12 31). Retrieved from Eiken Genome site: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>
109. Tsugunori Notomi, H. O. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, No. 12 e63.
110. Tsugunori Notomi, Y. M. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* , Vol. 53, No. 1, pp. 1–5.

111. Verweij JJ, C. M. (2009). Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103: 342–346.
112. Wallop Pakdee, U. T.-n. (2012). Genetic differentiation of *Strongyloides stercoralis* from two different climate zones revealed by 18S ribosomal DNA sequence comparison. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 1333-1338.
113. Wendy Page, J. A. (2018). The Unique Life Cycle of *Strongyloides stercoralis* and Implications for Public Health Action. *Trop. Med. Infect. Dis*, 3, 53; doi:10.3390.
114. Witthaya Anamart, A. P. (2010). Albendazole Stimulates the Excretion of *Strongyloides stercoralis* Larvae in Stool Specimens and Enhances Sensitivity for Diagnosis of Strongyloidiasis. *Journal of clinical microbiology*, 4216–4220.
115. Yamamura M, M. K. (2009). Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. *Japanese journal of infectious diseases*, 62(1):20-5.
116. Yasmin Sultana, N. J. (2013). Real-time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Strongyloides stercoralis* in Stool. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1048–1051.
117. Yasuyoshi Mori, N. T. (2012). Novel Molecular Diagnostic Platform for Tropical Infectious Diseases. In *Current Topics in Tropical Medicine* (pp. 445-456). InTech.

118. Yori PP, K. M. (2006). Seroepidemiology of strongyloidiasis in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, 74: 97–102.
119. Zablon Kithinji Njiru, A. S. (2008). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Volume 2 | Issue 2 | e147.
120. Zeno Bisoffi, D. B.-M. (2014). Diagnostic Accuracy of Five Serologic Tests for *Strongyloides stercoralis* Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Volume 8 | Issue 1 | e2640.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1.

Quy trình tạo chứng dương cho bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR trên người bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

1. Nhân bản đoạn gen đích chứa trình tự thiết kế mồi LAMP bằng phương pháp PCR:

Thực hiện PCR đơn với cặp mồi đặc hiệu nhân bản đoạn trình tự đích bao trọn vùng trình tự thiết kế mồi LAMP sử dụng để xác định GLĐR trên gen 18S rRNA từ mẫu ADN chuẩn với các thành phần cơ bản sau:

Thành phần	Lượng
Đệm PCR master mix 2X	12,5 μ L
Mồi xuôi (25 μ M)	0,4 μ L
Mồi ngược (25 μ M)	0,4 μ L
Nước	11,5 μ L
ADN mẫu	2 μ L
Tổng thể tích	25μL

2. Tinh sạch sản phẩm PCR (thời gel)

Thu băng đặc hiệu trên gel, tinh sạch ADN bằng bộ kit PureLink® Quick Gel Extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất theo trình tự các bước sau:

- + Cắt 400mg gel chứa ADN đích vào ống 1,5ml.
- + Thêm 1,2 mL đệm L3 vào ống mẫu.

- + Ủ ống mẫu trên máy ủ lactic nhiệt khô ở 50°C trong thời gian tối thiểu 10 phút với tốc độ lắc 200 vòng/phút.
- + Ủ thêm 5 phút sau khi quan sát thấy gel bắt đầu tan.
- + Chuyển toàn bộ dung dịch gel đã tan lên cột tách gel đựng trong ống rửa.
- + Ly tâm cột ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.
- + Chuyển cột tách gel sang ống rửa mới.
- + Thêm 500 µL đệm W1 (đã bổ sung 64 mL ethanol 99%) vào cột tách gel
- + Ly tâm cột ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.
- + Chuyển cột tách gel sang ống rửa mới.
- + Ly tâm cột tách gel ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 2 phút.
- + Chuyển cột tách gel sang ống thu hồi.
- + Thêm 50µL đệm E5 vào giữa cột tách gel.
- + Ủ cột ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.
- + Ly tâm cột tách gel ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.
- + Loại bỏ cột tách gel.
- + Đóng nắp ống thu hồi chứa dung dịch ADN tinh khiết.
- + Bảo quản ống đựng ADN ở -20°C.
- + Điện di trên gel agarose 0,8 % trong TBE 1 X để kiểm tra sản phẩm.

3. Chèn đoạn ADN đích vào vector

Sử dụng vector pUC 19 để chèn đoạn ADN đích theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm gắn sẽ được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli*.

4. Biến nạp vector vào vi khuẩn *E. coli*

Hóa biến nạp vector mang đoạn trình tự đích vào vi khuẩn *E.coli* chủng DH5α™-T1^R sử dụng bộ kit One shot competent cell và nuôi cấy chọn lọc trên môi trường LB chứa kanamycin theo các bước sau:

- +Đặt máy ủ nhiệt khô ở 42°C.

- +Làm ấm môi trường S.O.C đến nhiệt độ phòng.
- +Làm ấm môi trường LB ở 37°C trong 30 phút.
- +Trải lớp mỏng 40 μ L DFM vào mỗi đĩa môi trường LB và ủ ở 37°C đến khi sử dụng.
- +Lấy 1 ống One shot cell ra để tan đá.
- +Lấy 2 μ L hỗn hợp phản ứng ở bước chèn vector vào ống One Shot® cell. Trộn nhẹ nhàng, không sử dụng micropipet để trộn.
- +Ủ ống phản ứng trên đá 15 phút.
- +Đặt ống phản ứng vào máy ủ nhiệt ở 42°C trong 30 giây.
- +Đặt ngay ống phản ứng lên trên đá.
- +Thêm 250 μ L môi trường S.O.C vào ống phản ứng.
- +Đậy chặt nắp ống và ủ ống phản ứng ở 37°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 1 giờ.
- +Cấy trải hỗn dịch phản ứng vào 2 đĩa LB có chứa kanamycin đã được làm ấm, một đĩa với thể tích 10 μ L và 1 đĩa 50 μ L.
- +Thêm vào mỗi đĩa LB 20 μ L môi trường S.O.C. để đảm bảo thu được khuẩn lạc.
- +Ủ đĩa nuôi cấy qua đêm ở 37°C.

5. Phân tích kết quả biến nạp

Theo dõi khuẩn lạc mọc, lựa chọn khuẩn lạc trắng mọc riêng rẽ trên đĩa để xác định khả năng chứa plasmid tái tổ hợp. Quá trình biến nạp vector tái tổ hợp mang đoạn trình tự đích được đánh giá là thành công khi trình tự sản phẩm nhân bản PCR từ mẫu tách khuẩn lạc lựa chọn có độ tương đồng với vector tách dòng và trình tự đích $\geq 95\%$.

6. Nuôi cấy tăng sinh dòng tế bào chứa vector tái tổ hợp mang đoạn trình tự đích

Các thể biến nạp từ một khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB-kanamycin ở 37°C trong 16 giờ.

7. Tinh sạch vector mang trình tự ADN đích

Tinh sạch vector mang ADN đích bằng bộ kit tinh sạch plasmid Purelink Quick Plasmid miniprep Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

+ Chuẩn bị các dung dịch tinh sạch:

Thêm RNase A vào lọ dung dịch R3 theo hướng dẫn trên nhãn, đánh dấu và ghi ngày tháng pha lên nắp và thành ống. Dung dịch sau khi pha được bảo quản ở 4°C.

Thêm ethanol 99% vào dung dịch W9 và W10 theo hướng dẫn trên nhãn, đánh dấu và ghi ngày tháng pha lên nắp và thành ống. Dung dịch sau khi pha được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

+ Lấy 2 mL môi trường LB có chứa các khuẩn lạc vào ống 2 mL.

+ Ly tâm ống mẫu ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.

+ Hút bỏ dịch nổi.

+ Thêm 250 µl dung dịch R3 đã có RNase, trộn nhẹ ống mẫu bằng cách đảo ngược 2-3 lần

+ Thêm 250 µl dung dịch L7.

+ Trộn nhẹ các ống mẫu bằng cách đảo ngược cho đến khi hỗn hợp đồng nhất.

+ Ủ các ống mẫu ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

+ Thêm 350 µl dung dịch N4 vào ống mẫu.

+ Trộn ống mẫu bằng cách đảo ngược ống 2-3 lần

- + Ly tâm các ống mẫu ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút.
- + Chuyển toàn bộ dịch nổi vào cột ly tâm đặt trong ống rửa 2mL.
- + Ly tâm cột ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 1 phút.
- + Nhấc cột ly tâm ra khỏi ống rửa và đổ bỏ dung dịch thải trong ống rửa.
- + Chuyển cột ly tâm trở lại ống rửa.
- + Cho 500 μ l dung dịch rửa W10 (đã bổ sung ethanol) vào cột ly tâm.
- + Ủ cột trong 1 phút ở nhiệt độ phòng.
- + Ly tâm cột ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 1 phút.
- + Nhấc cột ly tâm ra khỏi ống rửa và đổ bỏ dung dịch thải trong ống rửa.
- + Chuyển cột ly tâm trở lại ống rửa.
- + Cho 700 μ l dung dịch rửa W9 (đã bổ sung ethanol) vào cột ly tâm.
- + Ly tâm cột ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 1 phút.
- + Chuyển cột ly tâm sang ống rửa mới.
- + Ly tâm cột ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 1 phút.
- + Chuyển cột ly tâm sang ống thu hồi 1,5 mL
- + Cho 75 μ l dung dịch TE vào giữa cột ly tâm.
- + Ủ cột ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.
- + Ly tâm cột ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 2 phút.
- + Loại bỏ cột ly tâm.
- + Đóng nắp ống 1,5mL chứa dung dịch ADN plasmid tinh khiết.
- + Bảo quản các ống chứa ADN plasmid ở -20°C cho tới khi sử dụng.

8. Xác định nồng độ ADN chứng dương và bảo quản chứng dương đã được tinh sạch ở -20°C

Đo nồng độ ADN trên máy Qubit 3.0

Phụ lục 2.

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN BỘ KÍT LAMP CHẤN

ĐOÁN GIUN LƯƠN

Strongyloides stercoralis

Đọc kỹ hướng dẫn sử dụng trước khi dùng

1. Giới thiệu

Bộ Kít này dùng để phát hiện *Strongyloides stercoralis* bằng kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian (LAMP - Loop Isothermal Median Amplification). Bộ Kít bao gồm các thành phần cơ bản của một phản ứng LAMP, sử dụng các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế trên vùng gen 18S rRNA của *S. stercoralis* để phát hiện loài này một cách chính xác với độ nhạy cao.

ADN sử dụng cho bộ Kít này là ADN tách chiết từ mẫu mô, mẫu phân, mẫu nước tiểu.

2. Thành phần và quy cách đóng gói

Thành phần bộ kít được mô tả trong bảng 1

Bảng 1. Thành phần của bộ kít

Số TT	Thành phần (Dung dịch)	Thể tích (50 phản ứng)	Số lượng (ống)
01	WT - 01	800 µl	01
02	STE-MM - 02	650 µl	01
03	STE-PM - 03	130 µl	01

04	Bst-Taq - 04	52 µl	01
05	MG - 05	50 µl	01
06	STE-PC - 06	102 µl	01

Bộ kit LAMP được đóng gói 50 phản ứng/1 hộp

3. Hướng dẫn sử dụng

3.1. Chuẩn bị phản ứng LAMP

- Làm tan đá các ống hóa chất, trộn đều và ly tâm nhanh. Giữ toàn bộ các ống hóa chất trong khay đá bào hoặc khay lạnh.
- Lấy số ống mẫu PCR tương ứng với số mẫu cần phân tích cộng thêm 1 mẫu chứng âm, 1 mẫu chứng dương và ghi ký hiệu mẫu để phân biệt.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng LAMP theo thứ tự trong bảng 2:

Bảng 2. Thành phần phản ứng LAMP

TT	Thành phần phản ứng	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
01	WT - 01	3,9
02	STE-MM - 02	12,5
03	STE-PM - 03	2,5
04	Bst-Taq - 04	1
05	MG - 05	0,1
	Tổng	20

- Thêm 5 μ L ADN tách chiết từ mẫu, Chứng dương (STE-PC-06), chứng âm (WT - 01) vào các ống chứa hỗn hợp phản ứng đã ghi ký hiệu tương ứng.

3.2. Điều kiện phản ứng LAMP

Phản ứng LAMP được thực hiện theo điều kiện nhiệt được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Điều kiện phản ứng

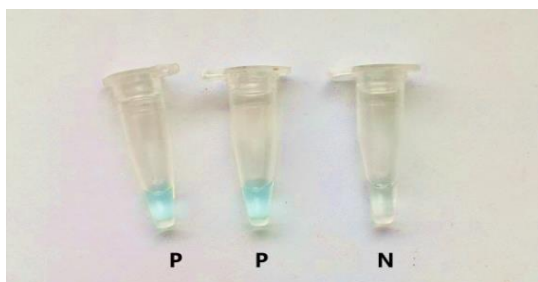
Pha	Mô tả	Số chu kỳ	Nhiệt độ	Thời gian
1	Hoạt hóa Bst-Taq polymerase và khuếch đại ADN	1	63 ⁰ C	60 phút
2	Bất hoạt, dừng phản ứng	1	80 ⁰ C	5 phút

3.3. Phiên giải kết quả

Tiến hành đọc kết quả sau 10 phút để các ống phản ứng ổn định ở nhiệt độ phòng.

- Kết quả được ghi nhận khi:
 - + Dung dịch trong ống chứng dương chuyển từ màu xanh đậm sang màu xanh sáng.
 - + Dung dịch trong ống chứng âm chuyển từ màu xanh đậm sang không màu.
- Đọc kết quả:
 - + Mẫu dương tính: Dung dịch trong ống thử nghiệm chuyển từ màu xanh đậm sang màu xanh sáng.

+ Mẫu âm tính: Dung dịch trong ống thử nghiệm chuyển từ màu xanh đậm sang không màu.



3.4. Các tình huống phát sinh và cách xử lý

Tình huống	Nguyên nhân	Cách xử lý
Dung dịch ở ống chứng dương không có màu xanh sáng.	Chương trình nhiệt cài đặt sai	Kiểm tra, cài đặt lại chương trình nhiệt
	Điều kiện bảo quản không đúng	- Kiểm tra lại điều kiện bảo quản, lưu giữ và hạn sử dụng của bộ kit. - Lặp lại thí nghiệm
	Có chất ức chế phản ứng PCR	Tinh sạch lại ADN để loại bỏ chất ức chế và thực hiện lại phản ứng LAMP.
Dung dịch ở ống chứng âm có màu xanh sáng.	Tạp nhiễm ở mẫu hoặc hóa chất	Thực hiện lại thí nghiệm và kiểm tra từng bước một để xác định nguồn gốc tạp nhiễm

4. Độ nhạy, độ đặc hiệu

Bộ kit đã được đánh giá trên 132 mẫu lâm sàng cho kết quả như sau:

- Độ nhạy: 96,87%.
- Độ đặc hiệu: 97%.
- Ngưỡng phát hiện: $2,12 \times 10^0$ số bản sao/ μ l

5. Một số lưu ý

- Các quá trình thu thập, vận chuyển, bảo quản mẫu và tách chiết ADN phải tuân theo quy trình chuẩn để đảm bảo độ tin cậy của kết quả.
- Tách chiết và lưu giữ các mẫu dương tính (mẫu, chứng dương, sản phẩm nhân bản) riêng rẽ với các thành phần khác, nên nạp mẫu vào hỗn hợp phản ứng ở một khu riêng biệt.
- Để tan đá các ống hóa chất ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành thử nghiệm. Các ống hóa chất sau khi tan đá cần được trộn đều và ly tâm nhanh.

6. Điều kiện bảo quản

- Bộ kit được bảo quản, ở -25°C đến -15°C , tránh ánh sáng.
- Không làm tan đá và đông đá quá 3 lần.
- Nếu bộ kit được sử dụng liên tục thì giữ lạnh các chất ở dạng dung dịch ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C tối đa 3 tháng.

7. Hạn dùng

- Một năm kể từ ngày sản xuất đối với dung dịch chưa sử dụng.
- 06 tháng sau khi mở nắp các dung dịch.

8. Nơi sản xuất.

- Bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn *Strongyloides stercoralis* là sản phẩm của đề tài cấp nhà nước, mã số KC.10.16/16-20.

- Bộ kit được nghiên cứu và sản xuất tại Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

9. Tài liệu tham khảo

1. EiKen Chemical Co., Ltd. A Guide to LAMP primer designing (Primer Explorer V4).
2. Pedro Fernández-Soto, Alicia Sánchez-Hernández, Javier Gandasegui (2016), Strong-LAMP: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model, *PLoS Negl Trop Dis* 10(7): e0004836. doi:10.1371/journal.pntd.000483

Phụ lục 3.

Kết quả xét nghiệm mẫu phân chẩn đoán giun lươn đường ruột bằng các phương pháp soi phân trực tiếp , real-time PCR, LAMP.

Số TT	Code mẫu	Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	LAMP
1	BVPNT01	(+)	(+)	(+)
2	BVPNT02	(+)	(+)	(+)
3	BVPNT03	(+)	(+)	(+)
4	BVPNT04	(+)	(+)	(-)
5	BVPNT05	(+)	(+)	(+)
6	BVPNT06	(+)	(+)	(+)
7	BVPNT07	(+)	(+)	(+)
8	BVPNT08	(+)	(+)	(+)
9	TP001	(-)	(-)	(-)
10	TP002	(-)	(-)	(-)
11	TP003	(-)	(-)	(-)
12	TP004	(-)	(-)	(-)
13	TP005	(-)	(-)	(-)
14	TP006	(-)	(-)	(-)
15	TP007	(-)	(-)	(-)
16	TP008	(-)	(-)	(-)
17	TP009	(-)	(-)	(-)
18	TP010	(-)	(-)	(-)
19	TP011	(-)	(-)	(-)

Số TT	Code mẫu	Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	LAMP
20	TP012	(-)	(-)	(-)
21	TP013	(-)	(-)	(-)
22	TP014	(-)	(-)	(-)
23	TP015	(-)	(-)	(-)
24	TP016	(-)	(-)	(+)
25	TP050	(-)	(-)	(-)
26	TP051	(-)	(-)	(-)
27	TP052	(-)	(-)	(-)
28	TP053	(-)	(-)	(-)
29	TP054	(-)	(-)	(-)
30	TP055	(-)	(-)	(-)
31	TP056	(-)	(-)	(-)
32	TP057	(-)	(-)	(-)
33	TP058	(-)	(-)	(-)
34	TP059	(-)	(-)	(-)
35	TP060	(-)	(-)	(-)
36	TP061	(-)	(-)	(-)
37	TP062	(-)	(-)	(-)
38	TP063	(-)	(-)	(-)
39	TP064	(-)	(-)	(-)
40	TP065	(-)	(-)	(-)

Số TT	Code mẫu	Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	LAMP
41	BVPNT09	(+)	(+)	(+)
42	BVPNT10	(+)	(+)	(+)
43	BVPNT11	(+)	(+)	(+)
44	BVPNT12	(+)	(+)	(+)
45	BVPNT13	(+)	(+)	(+)
46	BVPNT14	(+)	(+)	(+)
47	BVPNT15	(+)	(+)	(+)
48	BVPNT16	(+)	(+)	(+)
49	HKT050	(-)	(-)	(-)
50	HKT051	(-)	(-)	(-)
51	HKT052	(-)	(-)	(-)
52	HKT053	(-)	(-)	(-)
53	HKT054	(-)	(-)	(-)
54	HKT055	(-)	(-)	(-)
55	HKT056	(-)	(-)	(-)
56	HKT057	(-)	(-)	(-)
57	BVPNT17	(+)	(+)	(+)
58	BVPNT18	(+)	(+)	(+)
59	BVPNT19	(+)	(+)	(+)
60	BVPNT20	(+)	(+)	(+)
61	BVPNT21	(+)	(+)	(+)

Số TT	Code mẫu	Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	LAMP
62	BVPNT22	(+)	(+)	(+)
63	BVPNT23	(+)	(+)	(+)
64	BVPNT24	(+)	(+)	(+)
65	HKT058	(-)	(-)	(-)
66	HKT059	(-)	(-)	(-)
67	HKT060	(-)	(-)	(-)
68	HKT061	(-)	(-)	(-)
69	HKT062	(-)	(-)	(-)
70	HKT063	(-)	(-)	(-)
71	HKT064	(-)	(-)	(-)
72	HKT065	(-)	(-)	(-)
73	HKT090	(-)	(-)	(-)
74	HKT091	(-)	(-)	(-)
75	HKT092	(-)	(-)	(-)
76	HKT093	(-)	(-)	(-)
77	HKT094	(-)	(-)	(-)
78	HKT095	(-)	(-)	(-)
79	HKT096	(-)	(-)	(-)
80	HKT097	(-)	(-)	(-)
81	HKT98	(-)	(-)	(-)
82	HKT99	(-)	(-)	(-)

Số TT	Code mẫu	Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	LAMP
83	HKT100	(-)	(-)	(-)
84	HKT101	(-)	(-)	(-)
85	BVPNT25	(+)	(+)	(+)
86	BVPNT26	(+)	(+)	(+)
87	BVPNT27	(+)	(+)	(+)
88	BVPNT28	(+)	(+)	(+)
89	HKT102	(-)	(-)	(+)
90	HKT103	(-)	(-)	(-)
91	HKT104	(-)	(-)	(-)
92	HKT105	(-)	(-)	(-)
93	HKT106	(-)	(-)	(-)
94	BVPNT29	(+)	(+)	(+)
95	BVPNT30	(+)	(+)	(+)
96	BVPNT31	(+)	(+)	(+)
97	BVPNT32	(+)	(+)	(+)
98	TP066	(-)	(-)	(-)
99	TP067	(-)	(-)	(-)
100	TP068	(-)	(-)	(-)
101	TP069	(-)	(-)	(-)
102	TP070	(-)	(-)	(-)
103	TP071	(-)	(-)	(-)

Số TT	Code mẫu	Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	LAMP
104	TP072	(-)	(-)	(-)
105	TP073	(-)	(-)	(-)
106	TP074	(-)	(-)	(-)
107	TP075	(-)	(-)	(-)
108	TP076	(-)	(-)	(-)
109	TP077	(-)	(-)	(-)
110	TP078	(-)	(-)	(-)
111	TP079	(-)	(-)	(-)
112	TP080	(-)	(-)	(-)
113	TP081	(-)	(-)	(-)
114	TP082	(-)	(-)	(-)
115	TP083	(-)	(-)	(-)
116	TP084	(-)	(-)	(-)
117	TP085	(-)	(-)	(-)
118	TP086	(-)	(-)	(-)
119	TP087	(-)	(-)	(-)
120	TP088	(-)	(-)	(-)
121	HKT107	(-)	(-)	(-)
122	HKT108	(-)	(-)	(-)
123	HKT109	(-)	(-)	(-)
124	HKT110	(-)	(-)	(-)

Số TT	Code mẫu	Soi phân trực tiếp	Real-time PCR	LAMP
125	HKT111	(-)	(-)	(-)
126	HKT112	(-)	(-)	(-)
127	HKT113	(-)	(-)	(-)
128	HKT114	(-)	(-)	(-)
129	HKT115	(-)	(-)	(-)
130	HKT116	(-)	(-)	(+)
131	HKT117	(-)	(-)	(-)
132	HKT118	(-)	(-)	(-)
Tổng		32 dương; 100 âm	32 dương; 100 âm	34 dương; 98 âm

Phụ lục 4.

Kết quả xét nghiệm chẩn đoán giun lươn đường ruột bằng kỹ thuật LAMP sử dụng bộ kit trong nghiên cứu và bộ môi của Perdro- Fernandez- Soto (2016)

Số TT	Code mẫu	LAMP trong nghiên cứu này	Bộ môi Perdro- Fernandez- Soto (2016)
1	BVPNT01	(+)	(+)
2	BVPNT02	(+)	(+)
3	BVPNT03	(+)	(+)
4	BVPNT04	(+)	(-)
5	BVPNT05	(+)	(+)
6	BVPNT06	(+)	(+)
7	BVPNT07	(+)	(+)
8	BVPNT08	(+)	(+)
9	TP001	(-)	(-)
10	TP002	(-)	(-)
11	TP003	(-)	(-)
12	TP004	(-)	(-)
13	TP005	(-)	(-)
14	TP006	(-)	(-)
15	TP007	(-)	(-)
16	TP008	(-)	(-)
17	TP009	(-)	(-)
18	TP010	(-)	(-)

Số TT	Code mẫu	LAMP trong nghiên cứu này	Bộ môi Perdro- Fernandez- Soto (2016)
19	TP011	(-)	(-)
20	TP012	(-)	(-)
21	TP013	(-)	(-)
22	TP014	(-)	(-)
23	TP015	(-)	(-)
24	TP016	(-)	(-)
25	TP050	(-)	(-)
26	TP051	(-)	(-)
27	TP052	(-)	(-)
28	TP053	(-)	(-)
29	TP054	(-)	(-)
30	TP055	(-)	(-)
31	TP056	(-)	(-)
32	TP057	(-)	(-)
33	TP058	(-)	(-)
34	TP059	(-)	(-)
35	TP060	(-)	(-)
36	TP061	(-)	(-)
37	TP062	(-)	(-)
38	TP063	(-)	(-)
39	BVPNT09	(+)	(+)
40	BVPNT10	(+)	(-)

Số TT	Code mẫu	LAMP trong nghiên cứu này	Bộ môi Perdro- Fernandez- Soto (2016)
41	BVPNT11	(+)	(+)
42	BVPNT12	(+)	(+)
43	BVPNT13	(+)	(+)
44	BVPNT14	(+)	(+)
45	BVPNT15	(+)	(+)
46	BVPNT16	(+)	(+)
47	BVPNT17	(+)	(+)
48	BVPNT18	(+)	(+)
49	BVPNT19	(+)	(+)
50	BVPNT20	(+)	(+)

Phụ lục 5.

Kết quả chẩn đoán nhiễm giun lươn Khoa KST, Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-
Côn trùng Trung ương của 3 phương pháp

0	Giới tính (1 nam, 2 nữ)	Phương pháp xét nghiệm		
		Phân	Elisa	LAMP
1	1	(-)	(+)	(+)
2	1	(-)	(-)	(-)
3	2	(-)	(-)	(-)
4	2	(-)	(-)	(-)
5	2	(-)	(+)	(+)
6	1	(+)	(+)	(+)
7	1	(-)	(-)	(-)
8	2	(-)	(+)	(+)
9	1	(-)	(+)	(+)
10	1	(-)	(+)	(+)
11	2	(-)	(-)	(-)
12	2	(-)	(+)	(-)
13	1	(+)	(+)	(+)
14	2	(-)	(-)	(-)
15	1	(+)	(-)	(+)
16	1	(-)	(-)	(-)
17	1	(-)	(-)	(-)
18	1	(-)	(+)	(-)

0	Giới tính (1 nam, 2 nữ)	Phương pháp xét nghiệm		
		Phân	Elisa	LAMP
19	1	(-)	(+)	(+)
20	1	(+)	(-)	(+)
21	2	(-)	(-)	(-)
22	1	(+)	(-)	(+)
23	1	(-)	(+)	(+)
24	1	(-)	(-)	(-)
25	2	(-)	(-)	(-)
26	1	(-)	(+)	(+)
27	1	(-)	(+)	(-)
28	1	(-)	(+)	(+)
29	1	(-)	(-)	(-)
30	2	(-)	(-)	(-)
31	1	(+)	(+)	(+)
32	1	(-)	(-)	(-)
33	1	(-)	(-)	(-)
34	1	(-)	(-)	(-)
35	2	(-)	(-)	(-)
36	1	(+)	(-)	(+)
37	2	(-)	(+)	(+)
38	2	(-)	(-)	(-)
39	1	(-)	(-)	(-)

0	Giới tính (1 nam, 2 nữ)	Phương pháp xét nghiệm		
		Phân	Elisa	LAMP
40	2	(-)	(+)	(-)
41	1	(-)	(+)	(+)
42	2	(-)	(+)	(+)
43	2	(-)	(+)	(+)
44	2	(-)	(-)	(-)
45	1	(-)	(-)	(-)
46	2	(-)	(+)	(+)
47	1	(-)	(-)	(-)
48	1	(-)	(+)	(+)
49	2	(-)	(-)	(-)
50	2	(+)	(+)	(+)
51	1	(-)	(+)	(+)
52	2	(-)	(+)	(+)
53	2	(-)	(-)	(-)
54	1	(-)	(-)	(-)
55	1	(+)	(-)	(+)
56	1	(-)	(-)	(-)
57	2	(-)	(-)	(-)
58	1	(-)	(-)	(-)
59	1	(-)	(+)	(+)
60	2	(+)	(+)	(+)

0	Giới tính (1 nam, 2 nữ)	Phương pháp xét nghiệm		
		Phân	Elisa	LAMP
61	2	(-)	(-)	(-)
62	2	(-)	(+)	(+)
63	2	(-)	(+)	(+)
64	1	(-)	(+)	(+)
65	2	(-)	(+)	(+)
66	1	(-)	(+)	(-)
67	1	(-)	(-)	(-)
68	2	(-)	(+)	(+)
69	1	(+)	(+)	(+)
70	1	(-)	(-)	(-)
71	2	(-)	(+)	(+)
72	1	(-)	(+)	(+)
73	2	(-)	(-)	(-)
74	1	(-)	(+)	(+)
75	2	(-)	(+)	(+)
76	2	(-)	(+)	(+)
77	1	(-)	(-)	(-)
78	2	(-)	(-)	(-)
79	1	(-)	(+)	(+)
80	2	(-)	(-)	(-)
81	1	(-)	(-)	(-)

0	Giới tính (1 nam, 2 nữ)	Phương pháp xét nghiệm		
		Phân	Elisa	LAMP
82	1	(-)	(+)	(+)
83	1	(-)	(+)	(+)
84	2	(-)	(-)	(-)
85	1	(-)	(+)	(-)
86	1	(+)	(+)	(+)
87	1	(-)	(-)	(-)
88	2	(+)	(-)	(+)
89	1	(+)	(+)	(+)
90	1	(+)	(-)	(+)
91	2	(-)	(-)	(-)
92	1	(-)	(-)	(-)
93	1	(+)	(+)	(+)
94	1	(+)	(+)	(+)
95	2	(-)	(-)	(-)
96	1	(-)	(+)	(+)
97	2	(-)	(+)	(+)
98	1	(-)	(-)	(-)
99	2	(-)	(+)	(+)
100	1	(-)	(-)	(-)
101	1	(-)	(+)	(+)
102	1	(+)	(+)	(+)

0	Giới tính (1 nam, 2 nữ)	Phương pháp xét nghiệm		
		Phân	Elisa	LAMP
103	2	(-)	(-)	(-)
104	1	(-)	(+)	(+)
105	1	(+)	(-)	(-)
106	1	(-)	(-)	(-)
107	2	(-)	(-)	(-)
108	1	(-)	(+)	(-)
109	1	(-)	(+)	(+)
110	1	(-)	(-)	(-)
111	2	(+)	(+)	(+)
112	2	(+)	(+)	(+)
113	1	(-)	(+)	(+)
114	2	(-)	(-)	(-)
115	1	(-)	(-)	(-)
116	2	(-)	(+)	(+)
117	2	(+)	(+)	(+)
118	2	(-)	(-)	(-)
119	1	(+)	(-)	(+)
120	1	(+)	(+)	(+)
121	1	(-)	(-)	(-)
122	1	(-)	(-)	(-)
123	2	(-)	(-)	(-)

0	Giới tính (1 nam, 2 nữ)	Phương pháp xét nghiệm		
		Phân	Elisa	LAMP
124	2	(-)	(-)	(-)
125	2	(+)	(+)	(+)
126	2	(+)	-	(+)
127	1	(-)	(-)	(-)
128	2	(-)	(-)	(-)
129	2	(-)	(+)	(+)
130	1	(-)	(+)	(+)
131	1	(+)	(+)	(+)
132	1	(-)	(-)	(-)
133	1	(+)	(+)	(+)
134	2	(-)	(+)	(+)
135	1	(-)	(-)	(-)
136	2	(+)	-	(+)
137	1	(+)	(+)	(+)
138	1	(-)	(-)	(-)
139	1	(+)	(+)	(+)
140	1	(-)	(+)	(+)
141	2	(-)	(+)	(-)

Phụ lục 6: Giấy chứng nhận của Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế



VIỆN KIỂM ĐỊNH QUỐC GIA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ, BỘ Y TẾ, VIỆT NAM
NATIONAL INSTITUTE FOR CONTROL OF VACCINE AND BIOLOGICALS, MOH, VIET NAM
Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội, Việt Nam
Tel: (84.4) 38553148 - (84.4) 35595238 * Fax: (84.4) 38554816 * Email: contact@nicvb.org.vn * Website: http://nicvb.org.vn

GIẤY CHỨNG NHẬN CHẤT LƯỢNG VẮC XIN, SINH PHẨM
Số: 01620/TTBYT - NC
(Chứng nhận này chỉ có giá trị nghiên cứu)

Tên thương mại: Bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn <i>Strongyloides stercoralis</i>	
Tên chung: Sinh phẩm phát hiện giun lươn <i>Strongyloides stercoralis</i>	Mã NICVB: 03120/NICVB-NC
Số lô trên test: STE012020	Số lô trên hộp: STE012020
Dạng đóng gói: 50 tests/hộp	Hạn dùng: 15/01/2021
Nhà sản xuất: Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương	Đơn vị gửi mẫu: Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương

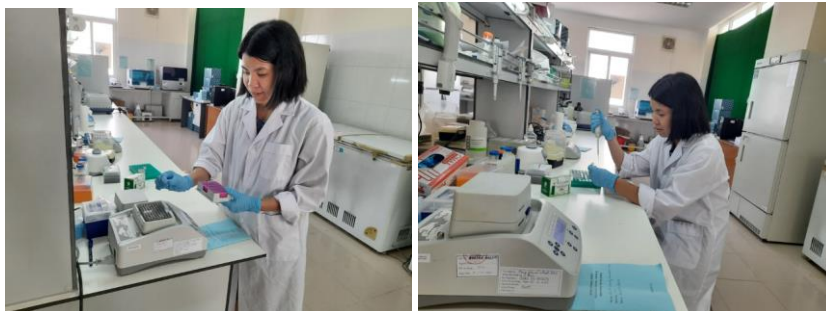
Kết luận: Trang thiết bị y tế chẩn đoán in vitro lô số STE012020, hạn dùng 15/01/2021 do Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương sản xuất đạt độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 100%, giới hạn phát hiện $2,013 \times 10^0$ bản sao gen/ μ l trên bộ mẫu chuẩn của Nhà sản xuất.

Hà Nội, ngày 25 tháng 08 năm 2020

VIỆN TRƯỞNG

Đoàn Hữu Thiện

Phụ lục 7: Một số hình ảnh trong nghiên cứu



Hình ảnh nghiên cứu tại phòng thí nghiệm



Hình ảnh khi triển khai thu mẫu tại thực địa