

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

BỘ Y TẾ

TRẦN VĂN HẢI

**THỰC TRẠNG NHIỄM SÁN LÁ GAN LỚN TRÊN
NGƯỜI TẠI 4 XÃ THUỘC 2 TỈNH THANH HÓA,
NGHỆ AN VÀ CHẾ TẠO BỘ KIT LOOP MEDIATED
ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) PHÁT
HIỆN TÁC NHÂN GÂY BỆNH**

Chuyên ngành : Dịch tễ học
Mã số : 972 01 17

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Hà Nội - 2025

**CÔNG TRÌNH HOÀN THÀNH TẠI
VIỆN SỐT RẾT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG
TRUNG ƯƠNG**

Người hướng dẫn khoa học:

Hướng dẫn 1: GS. TS. TRẦN THANH DƯƠNG

Hướng dẫn 2: TS. NGUYỄN THỊ HỒNG NGỌC

Phản biện 1: PGS. TS. ĐOÀN HUY HẬU

Phản biện 2: PGS. TS. NGUYỄN MẠNH HÙNG

Phản biện 3: GS. TS. TRẦN QUỐC KHAM

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện
hợp tại Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2025

Có thể tìm đọc luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Tran Van Hai, Nguyen Thi Hong Ngoc, Tran Thanh Duong, Nguyen Thi Huong Binh, and Nguyen Thu Huong (2020), Development of A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Human Fasciola in Vietnam. *Microbiol Infect Dis*; 4(5): 1-7.
2. Trần Văn Hải, Trần Thanh Dương, Nguyễn Thị Hồng Ngọc (2024), Thực trạng nhiễm sán lá gan lớn ở người tại hai tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An giai đoạn 2020-2022. *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Tập 66, tháng 12/2024(số đặc biệt 1), tr: 88-92.
3. Trần Văn Hải, Trần Thanh Dương, Nguyễn Thị Hồng Ngọc (2024), Một số yếu tố liên quan đến nhiễm sán lá gan lớn ở người tại hai tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An giai đoạn 2020-2022. *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Tập 66, tháng 12/2024(số đặc biệt 1), tr: 99-104.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sán lá gan lớn (SLGL) ở người do *Fasciola* spp. gây nên. Năm 2012, con số ước tính là 2,6 triệu trường hợp được chẩn đoán ở 81 quốc gia trên toàn thế giới. Tỷ lệ lưu hành thay đổi theo các vùng, nhưng cao nhất ở vùng Andes của Mỹ Latinh [2]. Trong suốt ba thập kỷ qua, bệnh SLGL ở người là mối lo ngại về sức khỏe cộng đồng, khiến Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) lo ngại và tuyên bố là một bệnh nhiệt đới thuộc nhóm bệnh ký sinh trùng tái nổi, mới nổi [3]. Hai tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An là điểm nóng về bệnh SLGL tại Việt Nam. Điều này xuất phát từ đặc điểm địa lý, khí hậu, cũng như thói quen sinh hoạt của người dân trong khu vực. Các nghiên cứu và báo cáo thực hiện trước năm 2020 đã chỉ ra tỷ lệ nhiễm sán lá gan lớn tại Thanh Hóa và Nghệ An ở mức đáng chú ý. Theo thống kê năm 2019, phát hiện mắc SLGL tại Trung tâm Kiểm soát bệnh tật (CDC) tỉnh Nghệ An là 1.863 ca và tại Trung tâm Kiểm soát bệnh tật (CDC) tỉnh Thanh Hóa là 131 ca [5]. Theo báo cáo kết quả bệnh nhân có triệu chứng đến khám tại Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Nghệ An (giai đoạn 2018 – 2022), tỷ lệ phát hiện nhiễm SLGL là 18,33% [5].

Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP) là một phương pháp có thể tổng hợp một đoạn ADN lớn mà không cần chu trình biến nhiệt. Thời gian xét nghiệm nhanh, xét nghiệm đồng thời được nhiều mẫu, tăng cường chất lượng xét nghiệm, đáp ứng nhanh và hiệu quả cao hơn trong chẩn đoán mầm bệnh, đề tài: **Thực trạng nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An và chế tạo bộ kit Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) phát hiện tác nhân gây bệnh**, với mục tiêu:

1. Mô tả thực trạng nhiễm và xác định một số yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022.
2. Chế tạo bộ kit Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) phát hiện nhiễm sán lá gan lớn tại thực địa.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI VÀ Ý NGHĨA KHOA HỌC, Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN

1. Mô tả, đánh giá thực trạng và yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã Phú Lâm, xã Tân Trường thuộc thị xã Nghi Sơn - tỉnh Thanh Hóa và Nghĩa Thuận, Nghĩa Mỹ thị xã Thái Hòa - tỉnh Nghệ An.
2. Đây là nghiên cứu đầu tiên áp dụng kỹ thuật LAMP trong chẩn đoán nhiễm sán lá gan lớn *Fasciola* spp. trên người tại Việt Nam, đóng góp vào công tác chẩn đoán, điều trị nhiễm SLGL trên người và động vật.

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án dày 130 trang gồm: Đặt vấn đề 2 trang; Tổng quan tài liệu 31 trang; Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 27 trang; Kết quả nghiên cứu 40 trang; Bàn luận 26 trang; Kết luận 2 trang; Kiến nghị 1 trang; Những đóng góp mới 1 trang. Luận án có 22 hình, 34 bảng số liệu, trong đó có 29 bảng số liệu kết quả nghiên cứu. Có 123 tài liệu tham khảo, có 24 tài liệu tham khảo trong 5 năm trở lại đây.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Khái niệm về bệnh sán lá gan lớn

Bệnh sán lá gan lớn là bệnh ký sinh trùng do một số loài sán lá gan thuộc họ

Fasciolidae gây nên những tổn thương, những ổ áp xe tại gan hoặc một số cơ quan khác khi ký sinh lạc chỗ [6].

1.1.1. Đặc điểm lâm sàng

Lâm sàng của bệnh SLGL không đặc hiệu, tùy thuộc vào giai đoạn phát triển của bệnh và vị trí sản ký sinh: Giai đoạn cấp tính là giai đoạn xâm nhập vào nhu mô gan, thường có sốt, đau hạ sườn phải và đau bụng. Giai đoạn mạn tính là giai đoạn xâm nhập đường mật, thường các triệu chứng không còn điển hình nên dễ nhầm với bệnh khác. Các dấu hiệu cổ điển như đau hạ sườn phải hoặc thượng vị, viêm mật, viêm túi mật, sỏi túi mật. Gan luôn luôn to, có thể không đau khi sờ.

Có 3 thể bệnh: thể nhẹ, thể trung bình, thể nặng.

1.1.2. Cận lâm sàng

- Công thức máu: bạch cầu ái toan thường tăng rõ rệt (trên 500/mm³), hoặc tỷ lệ BCAT lớn hơn 8% tổng số BC [56]. Sinh hoá máu: có thể tăng men gan, tăng Bilirubin toàn phần, bilirubin trực tiếp [56].

- Xét nghiệm phân hay dịch tá tràng tìm trứng SLGL là chuẩn “vàng” nhưng ở Việt Nam ít khi tìm thấy trứng SLGL.

- Xét nghiệm ELISA: Phát hiện kháng thể rất có giá trị.

- SLGL giai đoạn mạn tính, có nhiều phương pháp phát hiện trứng sản trong phân như: Xét nghiệm phân trực tiếp, lắng cận, Kato [56]. Xét nghiệm sinh học phân tử để chẩn đoán SLGL.

- Siêu âm ổ bụng, CT/MRI ổ bụng thấy hình ảnh tổn thương gan mật là vùng giảm âm ở gan phải, có thể thấy tụ dịch dưới bao gan.

1.1.3. Chẩn đoán

Chẩn đoán bệnh SLGL theo hướng dẫn của Bộ Y tế Ban hành kèm theo Quyết định số 1203/QĐ-BYT ban hành ngày 16/05/2022 [10].

Trường hợp bệnh nghi ngờ: Người bệnh sống trong vùng lưu hành SLGL; Có tiền sử ăn sống các loại rau thủy sinh và uống nước chưa hợp vệ sinh; Bệnh nhân có dấu hiệu lâm sàng hướng tới bệnh SLGL.

Trường hợp bệnh xác định: Là trường hợp bệnh nghi ngờ và xét nghiệm phân hoặc dịch mật tìm thấy trứng SLGL; ELISA phát hiện có kháng thể kháng SLGL trong huyết thanh; Có hình ảnh tổn thương của SLGL trên siêu âm/CT/MRI; Bạch cầu ái toan tăng cao.

1.2. Đặc điểm dịch tễ học nhiễm sản lá gan lớn

1.2.1. Tác nhân gây bệnh

Tác nhân gây bệnh: Bệnh SLGL (Fascioliasis) do *Fasciola hepatica* hoặc *Fasciola gigantica* gây nên. SLGL chủ yếu ký sinh ở động vật ăn cỏ như trâu, bò... và gây bệnh trên người [6], [7], [8], [9].

Hệ thống phân loại sản lá gan lớn *Fasciola*: Giới (Kingdom): *Animalia*; Ngành (Phylum): *Platyhelminthe*; Lớp (Class): *Trematoda*; Bộ (Order): *Echinostomid*; Dưới bộ (Suborder): *Echinostomata*; Họ (Family): *Fasciolidae* Giống (Genus): *Fasciola*; Loài (Species): *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*); *Fasciola gigantica* (*F. gigantica*).

1.2.2. Vật chủ

SLGL có vật chủ chính và vật chủ phụ: Vật chủ chính là các loài động vật nhai lại nuôi hoặc hoang dã, chủ yếu là trâu, bò, cừu, dê ngoài ra còn có lạc đà, hươu. Con người là vật chủ tình cờ, vật chủ lạc chủ của sản lá gan lớn [7]. Vật chủ phụ (vật chủ

trung gian) là ốc thuộc họ Lymnaea, đặc biệt là các loài trong chi *Lymaea*, *Galba*, *Fossaria* và *Pseudosuccinea* [7].

1.2.3. Đường lây và cơ chế lây truyền bệnh

Bệnh lây truyền qua đường tiêu hóa. Con người ăn các loài thực vật thủy sinh chưa nấu chín có nhiễm nang ấu trùng SLGL là phương thức chủ yếu gây nhiễm SLGL. Ngoài ra, việc sử dụng nguồn nước ăn uống chứa nang ấu trùng SLGL không đun sôi cũng là yếu tố góp phần quan trọng gây bệnh cho con người [14].

Ở người, khi vào tới đường tiêu hóa, ấu trùng thoát vỏ rồi chui qua thành ruột để vào khoang phúc mạc rồi ký sinh tại đó để phát triển thành sản trưởng thành sau thời gian khoảng 3 tháng. Sản trưởng thành sau đó di chuyển qua nhu mô gan rồi đến ký sinh ở đường mật. Ngoài ra, SLGL có thể ký sinh ở nhiều bộ phận như cơ, khớp, khoang bụng, mắt, phổi... [15].

Thời gian từ khi nhiễm nang ấu trùng đến khi xuất hiện trứng trong phân tùy thuộc vật chủ, ở cừu và trâu bò trung bình là 2 tháng (6 - 13 tuần), ở người tới 3 - 4 tháng. Tuy nhiên, tỷ lệ sản lá gan lớn hoàn thiện chu kỳ phát triển trong cơ thể người và sản sinh trứng là rất thấp thường < 5%. Hạn định đời sống SLGL ở người dao động từ 9 - 13 năm.

1.2.4. Một số yếu tố liên quan đến nhiễm sản lá gan lớn ở người

Các yếu tố liên quan đến nhiễm SLGL chủ yếu liên quan đến thói quen ăn uống, sinh hoạt và sử dụng nguồn nước có ấu trùng SLGL, ngoài ra còn có các yếu tố về kiến thức, thái độ, thực hành phòng bệnh của người dân về bệnh SLGL, cụ thể như sau:

+ *Ăn rau thủy sinh:* Ở người nhiễm SLGL khi ăn phải rau thủy sinh nhiễm nang ấu trùng (metacercariae) của SLGL như: Cải xoong, rau ngổ, rau cần, rau muống nước và một số trường hợp rau cần tưới nước có ô nhiễm ấu trùng SLGL [26].

+ *Nguồn nước ăn và sinh hoạt:* Ở những vùng SLGL lưu hành nang ấu trùng (metacercaria) có thể tồn tại trong môi trường nước với tỷ lệ dưới 10%. Quá trình nhiễm bệnh còn có thể gặp khi tắm, uống nước lã hoặc từ các nang ấu trùng dính vào da, thớt và vật dụng trong nhà bếp. Tại các vùng dịch tễ bệnh SLGL thì nguồn nước cũng là yếu tố quan trọng liên quan đến nhiễm SLGL [26].

+ *Ăn tái ăn sống:* Ở những vùng người dân không có tập quán ăn sống, ăn tái, uống nước lã thì tỷ lệ mắc bệnh rất thấp mặc dù trong môi trường vẫn có tồn tại các động vật, thực vật thủy sinh thuận lợi cho tồn tại ấu trùng SLGL [28].

1.2.5. Các biện pháp phòng chống

Nhiễm SLGL liên quan đến thói quen và tập quán ăn uống của người dân. Các biện pháp bao gồm: Không ăn các loại rau thủy sinh và các loại thực phẩm chế biến từ rau thủy sinh chưa nấu chín. Không uống nước lã. Sử dụng hố xí hợp vệ sinh, không phóng uế bừa bãi. Định kỳ tẩy sản cho trâu, bò, cừu...

1.2.6. Tình hình nhiễm sản lá gan lớn ở người trên thế giới và Việt Nam

1.2.6.1. Trên thế giới

Hiện có hơn 80 quốc gia trên toàn cầu đã báo cáo các trường hợp mắc bệnh SLGL [2]. Bệnh SLGL là một bệnh rất khó kiểm soát do đặc điểm dịch tễ học khá phức tạp. Hai loài sản lá gan là *F. hepatica* và *F. gigantica* là nguyên nhân gây ra bệnh ký

sinh trùng này. *F. hepatica* được tìm thấy trên khắp thế giới nhưng *F. gigantica* chỉ mới thấy ở Châu Phi và Châu Á [26]. Bệnh SLGL phổ biến ở Châu Đại Dương, châu Á, châu Phi, Trung Đông, châu Âu, vùng Caribe và một phần của châu Mỹ Latinh nhưng không đồng đều.

1.2.6.2. Tại Việt Nam

Các nghiên cứu và báo cáo thực hiện trước năm 2020 đã chỉ ra rằng bệnh SLGL tại Thanh Hóa và Nghệ An đạt tỷ lệ nhiễm đáng chú ý. Trong một cuộc điều tra tiến hành năm 2020, Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật tỉnh Thanh Hóa đã thu thập 90 mẫu phân và 90 mẫu máu từ 20 xã; kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm SLGL là 0,8% [50]. Tại Nghệ An, giai đoạn 2018-2022, báo cáo từ Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật tỉnh Nghệ An ghi nhận tỷ lệ phát hiện bệnh SLGL qua XN và lâm sàng là 18,33% [49]. Một điều tra khác được thực hiện tại một số huyện thuộc Nghệ An (2020-2021) ghi nhận tỷ lệ nhiễm giun sán đường ruột, bao gồm SLGL, dao động từ 15-20% [48].

1.3. Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) và ứng dụng trong chẩn đoán sán lá gan lớn ở người

Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian LAMP được nghiên cứu công bố bởi Notomi năm 2000 [70]. Đây một phương pháp nhân bản gen mới, có thể tổng hợp một đoạn ADN lớn mà không cần chu trình biến nhiệt. Thành phần phản ứng gồm có ADN khuôn, môi, enzyme ADN polymerase, hỗn hợp phản ứng được ủ ở 65°C. Phương pháp này có hiệu quả khuếch đại cao $10^9 - 10^{10}$ bản sao trong 15 - 60 phút [70].

LAMP là phản ứng nhân bản ADN đặc hiệu, chỉ xảy ra khi có điều kiện cần và đủ cho phản ứng, đó là chỉ khi cả 4 chuỗi môi, bao gồm các môi đơn F3, B3, các môi FIP (F1c+F2), BIP (B1c+B2) bám được vào 6 chuỗi đích của khuôn, thì sản phẩm ADN-vòng mới được tạo ra. Chỉ một hay vài môi không hoạt động, hoặc không bám đặc hiệu, sản phẩm ADN-vòng sẽ không được tạo ra. Đặc biệt, sản phẩm của phản ứng có thể quan sát bằng mắt thường do sự kết tủa của phản ứng tạo muối pyrophosphate ($Mg_2P_2O_7$) hoặc phát quang khi nhuộm bằng thuốc nhuộm SYBR green.

Các thành phần cơ bản của phản ứng LAMP gồm có:

- + Môi: Thiết kế 4 loại primers 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'.
- + Enzym: sử dụng phổ biến trong phản ứng LAMP là ADN polymerase được phân lập từ vi khuẩn *Bacillus stearothermophilus* có khả năng xúc tác tổng hợp ADN và tự tách chuỗi cao, hoạt động tối ưu ở 66°C.
- + dNTPs và đệm phản ứng: tương tự như kỹ thuật PCR.
- + ADN khuôn: ADN khuôn sử dụng cho kỹ thuật LAMP 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.
- + Thuốc nhuộm biểu hiện kết quả.

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 [70]: Bước 1- Tạo vật liệu khởi đầu; Bước 2- Chu kỳ tái bản và kéo dài chuỗi; 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 gốc vòng ở

cuối mỗi sợi. Phản ứng cứ vậy tiếp tục và có thể tạo nên $10^9 - 10^{10}$ bản sao ADN mạch trong vòng khoảng 15 phút đến 1 giờ.

1.4. Nguyên lý phát triển bộ kit LAMP

Nguyên lý chế tạo bộ kit LAMP, dựa trên khả năng khuếch đại ADN hoặc ARN mục tiêu dưới điều kiện đẳng nhiệt, loại bỏ nhu cầu sử dụng chu kỳ nhiệt như trong PCR [71], [74], [75]. Phản ứng LAMP sử dụng một bộ môi đặc hiệu gồm 4-6 môi, nhắm vào các vùng trình tự đặc trưng của tác nhân gây bệnh [71],[73]. Sự kết hợp của enzyme polymerase có hiệu lực cao (như Bst polymerase) và quá trình hình thành cấu trúc vòng lặp giúp tăng tốc độ và hiệu quả khuếch đại [76]. Để chế tạo kit LAMP, cần tối ưu hóa các yếu tố như thiết kế môi, nồng độ hóa chất, và điều kiện phản ứng. Một kit LAMP hoàn chỉnh thường bao gồm hỗn hợp phản ứng sẵn, môi đặc hiệu, và chứng dương/âm, đảm bảo tính tiện dụng và độ chính xác trong chẩn đoán [72], [79]. Do khả năng phát hiện nhanh, đơn giản và chi phí thấp, kit LAMP đang ngày càng được sử dụng phổ biến trong các phòng thí nghiệm lâm sàng và thực địa [75], [80].

Nguyên lý chế tạo một bộ sinh phẩm xét nghiệm bằng kỹ thuật LAMP gồm các bước như sau:

- Xác định mục tiêu khuếch đại: Lựa chọn trình tự ADN hoặc ARN đặc hiệu của tác nhân gây bệnh. Đối với SLGL, trình tự ADN thường được lựa chọn là ITS-1, ITS-2.. [73], [79].
- Thiết kế môi đặc hiệu;
- Chuẩn hóa điều kiện phản ứng;
- Xác định ngưỡng phát hiện, chuẩn âm, chuẩn dương;
- Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu;
- Đóng gói kit;
- Kiểm tra tính ổn định;
- Công bố tiêu chuẩn cơ sở, các thông số kỹ thuật như độ nhạy, độ đặc hiệu và tính ổn định;
- Sản xuất và phân phối.

1.5. Thông tin chung về địa điểm nghiên cứu

Thanh Hoá và Nghệ An nằm trong khu vực Bắc Trung bộ, thuộc vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, lượng mưa lớn, nhiệt độ cao, ánh sáng dồi dào là điều kiện thuận lợi cho phát triển sản xuất nông, lâm, ngư nghiệp. Tuy nhiên, điều kiện khí hậu này, kinh tế chưa phát triển và tập quán sinh hoạt không đảm bảo vệ sinh đã tạo ra môi trường thuận lợi cho sự phát triển và lây nhiễm của các bệnh ký sinh trùng. Trình độ chuyên môn, trang bị kỹ thuật phục vụ phòng chống bệnh KST còn nhiều hạn chế.

Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu 1: Mô tả thực trạng nhiễm và xác định một số yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

2.1.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

2.1.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Người dân đang sinh sống tại xã Phú Lâm, xã Tân Trường thuộc thị xã Nghi Sơn - tỉnh Thanh Hóa và xã Nghĩa Thuận, xã Nghĩa Mỹ thuộc thị xã Thái Hòa - tỉnh Nghệ An.

- **Tiêu chuẩn lựa chọn:** Người dân từ 18 tuổi trở lên, sống tại địa bàn nghiên cứu từ 12 tháng trở lên. Có khả năng nghe hiểu và trả lời phỏng vấn. Đối tượng đồng ý tham gia nghiên cứu.

- **Tiêu chuẩn loại trừ:** Người bị bệnh tâm thần. Người đã điều trị sán lá gan lớn trong 06 tháng trước khi đề tài triển khai.

2.1.1.2. Vật liệu nghiên cứu:

- Bộ sinh phẩm "Fasciola Antibody Detection Test Kit" của hãng Scimedx sử dụng kỹ thuật ELISA để phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu với SLGL trong huyết thanh.

2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- **Thời gian nghiên cứu:** Từ tháng 12/2020 đến tháng 12/2022.

- **Tại thực địa:** Xã Phú Lâm, xã Tân Trường, thị xã Nghi Sơn - tỉnh Thanh Hóa và xã Nghĩa Thuận, xã Nghĩa Mỹ, thị xã Thái Hòa - Nghệ An.

- **Tại phòng thí nghiệm:** Khoa Ký sinh trùng, Khoa Sinh học phân tử Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

2.1.3. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế nghiên cứu:** mô tả cắt ngang có phân tích.

- **Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu:** cỡ mẫu cho nghiên cứu mô tả để xác định một tỷ lệ [86]:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

Trong đó: n: cỡ mẫu tối thiểu cần nghiên cứu ở 4 xã; $Z_{1-\alpha/2}$: Hệ số tin cậy, được tính dựa trên mức ý nghĩa thống kê với độ tin cậy là 95% tương ứng $\alpha = 0,05$, thì $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$; p: tỷ lệ nhiễm SLGL bằng xét nghiệm ELISA, ước đoán $p = 0,03$; d: sai số tuyệt đối cho phép, chọn $d = 0,008$.

Với các giá trị đã chọn, tính toán được cỡ mẫu tối thiểu là 1747 người. Thêm 15% dự phòng khi thu thập mẫu ngẫu nhiên không gặp đối tượng đã được lựa chọn, tổng số mẫu cần điều tra dự kiến 2010 người. Trên thực tế chúng tôi đã điều tra được tổng là 2014 người, trong đó: tại tỉnh Thanh Hóa, xã Phú Lâm là 503, xã Tân Trường là 501; tại tỉnh Nghệ An, xã Nghĩa Thuận là 498 và xã Nghĩa Mỹ là 512.

- **Phương pháp chọn mẫu:** Chọn chủ đích 4 xã Phú Lâm, Tân Trường (thị xã Nghi Sơn - Tỉnh Thanh Hóa) và Nghĩa Thuận, Nghĩa Mỹ (thị xã Thái Hòa - tỉnh Nghệ An). Chọn đối tượng tại mỗi xã theo phương pháp chọn mẫu ngẫu nhiên đơn.

2.1.4. Nội dung nghiên cứu

Xác định tỷ lệ nhiễm SLGL trên mẫu phân của đối tượng nghiên cứu qua xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cận và kỹ thuật ELISA với bộ sinh phẩm Fasciola Antibody Detection Test Kit. Các yếu tố liên quan đến nhiễm SLGL được điều tra bằng bộ câu hỏi (Phụ lục 1).

2.1.5. Biến số và chỉ số trong nghiên cứu

- **Các biến số trong nghiên cứu:** Nhiễm sán lá gan lớn bằng kỹ thuật xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cận hoặc kết quả xét nghiệm Ab-ELISA huyết

thanh (+). Các biến số về tuổi, giới, nghề nghiệp, trình độ học vấn. Các biến số về sử dụng nhà vệ sinh. Các biến số về yếu tố liên quan của bệnh sán lá gan lớn ở đối tượng nghiên cứu.

- **Các chỉ số nghiên cứu:** Tỷ lệ người dân nhiễm SLGL theo 2 phương pháp xét nghiệm và các yếu tố

- Trong nghiên cứu chúng tôi sử dụng tỷ suất chênh OR, và $OR \neq 1$, $OR = ad/bc$, để phân tích mối liên quan giữa các yếu tố nguy cơ và nhiễm SLGL.

2.1.6. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Kỹ thuật phỏng vấn, điều tra bằng bộ câu hỏi (Phụ lục 1).

- Thu thập và bảo quản mẫu theo SOP NIMPE.HD 03.PP/25; Kỹ thuật ELISA phát hiện kháng thể kháng sán lá gan lớn Fasciola bằng bộ sinh phẩm "Fasciola Antibody Detection Test Kit" của hãng Scimedx - Mỹ: theo SOP NIMPE.HD 07.PP/34.

- Xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cận để phát hiện trứng SLGL trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học: theo SOP NIMPE.HD 07.PP/36 [88].

2.2. Mục tiêu 2: Chế tạo bộ kit Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) phát hiện nhiễm sán lá gan lớn tại thực địa

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các mẫu *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*.

- Bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm sán lá gan lớn.

2.2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Giai đoạn chế tạo bộ kit LAMP: từ tháng 1/2018 đến tháng 12/2020. Giai đoạn ứng dụng bộ kit LAMP chẩn đoán tại cộng đồng tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An: từ tháng 01/2021 đến tháng 12/2022.

- Địa điểm nghiên cứu: Tại Phòng thí nghiệm/Khoa Sinh học phân tử và Bệnh viện Đặng Văn Ngữ - Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương. Thực địa: xã Phú Lâm, xã Tân Trường (Thanh Hóa), xã Nghĩa Mỹ, xã Nghĩa Thuận (Nghệ An).

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.2.3.1. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm:

+ Thiết kế bộ môi LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn *Fasciola* spp., kiểm nghiệm độ chính xác, khả năng hoạt động của bộ môi.

+ Tạo mẫu chứng chuẩn dương cho bộ kit (Plasmid mang đoạn trình tự ADN đặc trưng của SLGL).

+ Xây dựng quy trình phản ứng LAMP và tối ưu hóa điều kiện phản ứng.

+ Đánh giá độ nhạy, đặc hiệu, ngưỡng phát hiện phản ứng LAMP.

+ Hoàn thiện bộ kit LAMP.

- Sản xuất bộ kit LAMP theo tiêu chuẩn chế tạo.

- Xét nghiệm bằng bộ kit LAMP.

2.2.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

- Mẫu chuẩn dương để chuẩn kỹ thuật: Tối thiểu 03 mẫu ở các giai đoạn, mỗi mẫu tiến hành xét nghiệm lặp lại 3 lần.

- Mẫu dùng so sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm: Mẫu thu thập có chủ đích và được thực hiện với quy mô nhỏ trong phòng thí nghiệm dựa vào lượng mẫu dương tính lưu trong phòng thí nghiệm, mẫu thu thập tại Bệnh viện Đặng Văn

Ngũ và thu thập bổ sung từ thực địa để tạo tập hợp mẫu lâm sàng thử nghiệm với giả định tỷ lệ nhiễm (p) là 25%. Cỡ mẫu tính toán được là 25 mẫu (+) thật và 75 mẫu (-). Trên thực tế, chúng tôi thực hiện ở 130 mẫu, trong đó có 30 mẫu phân có nhiễm SLGL, 100 mẫu phân không nhiễm SLGL.

- Cỡ mẫu sử dụng để đánh giá tính ổn định của bộ kit: 03 mẫu chứng chuẩn dương, trong đó có 1 mẫu chuẩn dương ở nồng độ được sử dụng làm ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP, 02 mẫu dương tính thu thập từ người bệnh. Tổng cộng là 05 mẫu.

- Cỡ mẫu sử dụng để đánh giá tỷ lệ nhiễm SLGL trên người tại hai tỉnh Nghệ An và Thanh Hóa là 2014 mẫu thu thập tại thực địa.

2.2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Thu thập và bảo quản mẫu theo SOP NIMPE.HD 03.PP/25 “Quy trình thu thập, bảo quản, vận chuyển mẫu phân, mẫu huyết thanh để phát hiện nhiễm sán lá gan lớn ở người tại thực địa”.

- Xử lý mẫu và tách chiết ADN: bằng phương pháp tủa cồn theo SOP NIMPE.HD 03.PP/51.

- Thiết kế môi sử dụng các phần mềm tin sinh chuyên dụng như Primer Explorer v.5, Primer Blast, Mega7 ... 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, theo SOP NIMPE.HD 03.PP/31 “Quy trình thiết kế, đánh giá và lựa chọn bộ mồi sử dụng cho kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn” (Phụ lục 2).

- Kỹ thuật xét nghiệm phân để phát hiện SLGL: Kỹ thuật lắng cặn [90]. Kỹ thuật qPCR xác định SLGL (Samer Alasaad và cs, 2011) [91]; Kỹ thuật giải trình tự trên máy giải trình tự tự động 3500.

2.3. Phương pháp kiểm soát nhiễu và sai số trong nghiên cứu

Tuân theo đúng tất cả các quy trình hướng dẫn sử dụng cho nghiên cứu. Các số liệu, kết quả đều phải được ghi nhận tại biểu mẫu gốc. Sử dụng các mẫu chứng chuẩn (-) và (+) để đảm bảo sự thống nhất về kết quả.

2.4. Quản lý và phân tích số liệu

Nhập và phân tích trên phần mềm Excel và STATA 12.0. Các biến định tính mô tả bằng các tỷ lệ %. Đánh giá liên quan giữa tình trạng nhiễm SLGL với các yếu tố qua tính toán tỷ suất chênh OR (95%CI).

Phân tích số liệu bằng các phần mềm tin sinh: AB7500 version 2.06, Primer Explorer v.5, Primer Blast, Mega 7. Tính độ nhạy, độ đặc hiệu, hệ số Kappa, trên phần mềm Medcalc.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này tuân theo quy định của các quy chế về xét duyệt đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương theo Quyết định số 182/QĐ-VSR ngày 24/2/2020 và được sự đồng ý của chính quyền địa phương. Chỉ nghiên cứu ở người tự nguyện tham gia nghiên cứu.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Mục tiêu 1: Mô tả thực trạng nhiễm và xác định một số yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

2014 người dân tham gia vào nghiên cứu. Nhóm tuổi từ 41 – 60 tuổi và từ 21 –

40 tuổi chiếm phần lớn, với tỷ lệ lần lượt là 40,42% và 39,18%, tiếp đến là nhóm trên 60 tuổi (16,53%) và thấp nhất là nhóm từ 18-20 tuổi (gần 3,87%). Nữ giới chiếm tỷ lệ cao hơn nam giới, lần lượt là 53,67% và 46,33%. Nông dân là nghề nghiệp chiếm tỷ lệ cao nhất (61,82%), tiếp đến là nhóm nghề khác (21,35%). Ở mỗi xã, nông dân cũng là nghề nghiệp chủ yếu của đối tượng nghiên cứu, dao động từ khoảng 50-70%. Trình độ học vấn của đối tượng nghiên cứu chủ yếu là THCS (55,31%), tiếp đến là THPT (22,44%). Trình độ mù chữ và trên THPT đều chiếm tỷ lệ thấp, lần lượt là 3,33% và 5,51%. Tỷ lệ người dân có biết đến bệnh SLGL 35,30%. Tỷ lệ các đối tượng nghiên cứu đã có hồ sơ/nhà tiêu là 94,14%, trong đó: có hồ sơ/nhà tiêu hợp vệ sinh (83,71%). Tỷ lệ người ăn sống rau thủy sinh 87,39%.

3.1.1. Thực trạng nhiễm SLGL tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An

Bảng 3.1. Tỷ lệ nhiễm sán lá gan lớn ở đối tượng nghiên cứu qua xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cặn (n=2014)

Nhiễm Sán lá gan lớn	Thanh Hóa (1004)				Nghệ An (1010)				Tổng (n=2014)	
	Phú Lâm (503)		Tân Trường (501)		Nghĩa Thuận (498)		Nghĩa Mỹ (512)			
	SL	(%)	SL	(%)	SL	(%)	SL	(%)	SL	(%)
Có	1	0,20	0	0,00	2	0,40	1	0,20	4	0,2
Không	502	99,8	501	100	496	99,6	511	99,8	2010	99,8

Có 4/2014 (0,2%) đối tượng nghiên cứu nhiễm SLGL qua xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cặn.

Bảng 3.2. Kết quả xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh sán lá gan lớn ở đối tượng nghiên cứu theo nhóm tuổi (n=2014)

Nhóm tuổi	Thanh Hóa (1004)			Nghệ An (1010)			Tổng (2014)		
	Số XN	Số (+)	(%)	Số XN	Số (+)	(%)	Số XN	Số (+)	(%)
18-20	42	0	0	36	1	6,67	78	1	1,28
21-40	387	6	1,55	402	11	2,74	789	17	2,15
41-60	417	5	1,20	397	9	2,27	814	14	1,72
> 60	158	1	0,63	175	2	1,14	333	3	0,90
Tổng	1004	12	1,20	1010	23	2,28	2014	35	1,74

Tỷ lệ nhiễm chung qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh là 1,74%. Tỷ lệ nhiễm cao nhất là lứa tuổi từ 21 đến 40, chiếm 2,15%; lứa tuổi từ 41 đến 60 chiếm tỷ lệ 1,72%.

Bảng 3.3. Kết quả xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh sán lá gan lớn ở đối tượng nghiên cứu theo giới tính (n=2014)

Giới tính	Thanh Hóa (1004)			Nghệ An (1010)			Tổng (2014)		
	Số XN	Số (+)	(%)	Số XN	Số (+)	(%)	Số XN	Số (+)	(%)
Nam	485	4	0,82	448	9	2,01	933	13	1,39
Nữ	519	8	1,54	562	14	2,49	1081	22	2,04

Tổng	1004	12	1,20	1010	23	2,28	2014	35	1,74
------	------	----	------	------	----	------	------	----	------

Tỷ lệ (+) SLGL chung ở cả 2 tỉnh qua xét nghiệm huyết thanh Ab-ELISA là 1,74%, trong đó: tỷ lệ dương tính ở nam là 1,39%, ở nữ 2,04%.

Bảng 3.4. Kết quả xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh sán lá gan lớn theo nghề nghiệp, trình độ học vấn và hiểu biết về sán lá gan lớn (n=2014)

Yếu tố		Tình trạng nhiễm SLGL		
		Số XN	Số (+)	Tỷ lệ (%)
Nghề nghiệp	Nông dân	1245	21	1,69
	Công nhân	231	3	1,30
	CB, hưu trí	108	2	1,85
	Khác (đi học, nghề tự do...)	430	9	2,09
Trình độ học vấn	Mù chữ	67	2	2,99
	Tiểu học	270	6	2,22
	THCS	1114	21	1,89
	THPT	452	6	1,33
	TC, CĐ, ĐH	111	0	0,00
Hiểu biết về bệnh SLGL	Có biết về bệnh SLGL	711	3	0,42
	Chưa biết về bệnh SLGL	1303	32	2,46
Tổng		2014	35	1,74

Tỷ lệ dương tính với SLGL cao nhất là ở nhóm nghề khác (2,09%), tiếp đến là nhóm cán bộ, hưu trí (1,85%). Nhóm người mù chữ có tỷ lệ (+) với SLGL cao nhất 2,99%, tiếp đến là nhóm tiểu học 2,22%.

3.1.2. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng nhiễm SLGL ở người

Chúng tôi chưa tìm thấy mối liên quan giữa nhóm tuổi, giới tính, nghề nghiệp, trình độ học vấn với tình trạng nhiễm SLGL.

Bảng 3.5. Liên quan giữa hiểu biết về bệnh sán lá gan lớn và nhiễm sán lá gan lớn qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh (n= 2014)

Yếu tố	Kết quả Ab-ELISA huyết thanh SLGL			OR 95% CI	p-value
	Số XN	Số (+)	Số (-)		
Chưa biết	1303	32	1271	5,94 (1,81–19,47)	0,01
Có biết	711	3	708		

Đối tượng chưa biết về bệnh SLGL có nguy cơ nhiễm SLGL cao hơn đối tượng đã từng biết về bệnh 5,94 lần (95%CI: 1,81 – 19,47). Mối liên quan có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Bảng 3.6. Liên quan giữa tình trạng hồ xí/nhà tiêu và nhiễm sán lá gan lớn qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh (n=2014)

Yếu tố	Kết quả Ab-ELISA huyết thanh			OR, 95% CI	p-value
	Số XN	Số (+)	Số (-)		

Nhà không có hồ xí/Hồ xí không hợp vệ sinh	328	16	312	4,5, (2,29 – 8,85)	< 0,01
Hồ xí hợp vệ sinh	1686	19	1667		

Đối tượng sống ở gia đình không có hồ xí hoặc hồ xí không hợp vệ sinh có nguy cơ nhiễm SLGL cao gấp 4,5 lần (95%CI: 2,29 – 8,85) so với đối tượng sống ở gia đình có hồ xí hợp vệ sinh.

Bảng 3.7. Liên quan giữa thói quen ăn uống và nhiễm sán lá gan lớn qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh (n=2014)

Thói quen ăn sống rau thủy sinh	Kết quả Ab-ELISA			OR 95% CI	p-value
	Số XN	Số (+)	Số (-)		
Thường xuyên	531	25	506	7,28 (3,47 – 15,26)	< 0,01
Thỉnh thoảng/Hầu như không	1483	10	1473		

Đối tượng thường xuyên ăn sống rau thủy sinh có nguy cơ nhiễm SLGL cao hơn nhóm không ăn 7,28 lần (95%CI: 3,47 – 15,26).

3.2. Mục tiêu 2: Chế tạo bộ kit Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) phát hiện nhiễm sán lá gan lớn tại thực địa

3.2.1. Thiết kế bộ môi LAMP

Các trình tự gen ITS2 của 2 loài *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica* trên ngân hàng dữ liệu NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) được tải về và sử dụng phần mềm MEGA 7 với tính năng chức năng Clustal W để sắp giống các trình tự của 2 loài nhằm tìm ra vùng bảo tồn đặc trưng cho giống *Fasciola*.

Bảng 3.8. Trình tự môi LAMP thiết kế để chẩn đoán sán lá gan lớn

Tên môi	Vị trí 5'	Vị trí 3'	Chiều dài môi (nu)	Nhiệt độ nóng chảy Tm (°C)	5'dG	3'dG	Tỷ lệ GC	Trình tự môi
F3	43	61	19	56,50	-5,61	-5,84	0,53	GGTTGGACTGATAACCTGG
B3	243	260	18	57,43	-3,27	-5,23	0,50	CTTTTGGGCGTCGTGAT
FIP			40					TGCGCTCTTCATCGACACAC-TTGACCATACGTACAACCTCT
BIP			43					ACTGCTTTGAACATCGACATCTTGA-TTTATAAGCCGACCCTCG
F2	65	84	20	55,39	-5,02	-4,24	0,40	TTGACCATACGTACAACCTCT
F1c	106	125	20	62,41	-7,32	-5,21	0,55	TGCGCTCTTCATCGACACAC
B2	223	240	18	55,25	-1,98	-6,47	0,50	TTTATAAGCCGACCCTCG
B1c	156	180	25	62,96	-5,63	-4,27	0,40	ACTGCTTTGAACATCGACATCTTGA
LF	88	104	17	60,28	-6,77	-6,78	0,65	AGCCGAGTGATCCACCG
LB	201	217	17	61,63	-4,93	-7,18	0,65	TTAGCCTGTGGCCACGC

- Về mặt kích thước: các môi thiết kế đều có chiều dài từ 17 đến 25 nucleotit, %GC nằm trong tỉ lệ tốt nhất (40% - 65%).

- Nhiệt độ nóng chảy của các cặp mồi đều thỏa mãn điều kiện của mồi LAMP chuẩn. Mức năng lượng tự do ở các đầu 3' của các mồi F2/B2; F3/B3; LF/LB và đầu 5' của F1c/B1c được thiết kế có ΔG từ -7,32 đến -5,02 < -4Kcal/mol, đây là yêu cầu bắt buộc đối với một bộ mồi LAMP.

- Sản phẩm khuếch đại sau phản ứng LAMP bằng cặp mồi F3-B3 có kích thước theo lý thuyết là 218 bp < 280 bp.

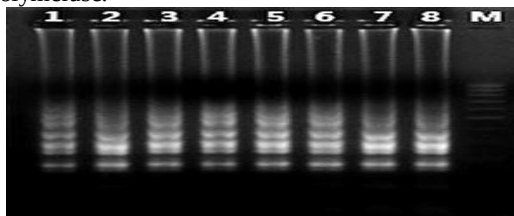
3.2.2. Tính đặc hiệu và khả năng hoạt động của bộ mồi LAMP

3.2.2.1. Tính đặc hiệu của bộ mồi LAMP

Trên lý thuyết để khẳng định sản phẩm PCR khuếch đại bằng bộ mồi đúng là trình tự của giông *Fasciola* spp., 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 ITS2 của SLGL được công bố trên NCBI.

3.2.2.2. Khảo sát khả năng hoạt động của bộ mồi LAMP

Để đánh giá khả năng hoạt động của bộ mồi thiết kế, chúng tôi tiến hành thực nghiệm phản ứng LAMP sử dụng bộ mồi tự thiết kế trên nền mẫu ADN của sản lá gan lớn, theo các điều kiện theo khuyến cáo của hãng New England Biolabs đối với bộ sinh phẩm Bst Taq polymerase.



Hình 3.1. Sản phẩm LAMP sử dụng bộ mồi tự thiết kế đặc hiệu cho sản lá gan lớn

Từ kết quả điện di trên gel agarose 2% cho thấy, sản phẩm sau phản ứng có dạng dải băng dài như thang chuẩn ADN, đây là hình ảnh đặc trưng của sản phẩm LAMP, bộ mồi chúng tôi thiết kế có khả năng hoạt động tốt.

3.2.3. Kết quả tạo chứng dương cho bộ kit

Các bước tạo chứng dương được thực hiện theo quy trình SOP NIMPE.HD 03.PP/36: “Quy trình tạo chứng dương cho bộ kit LAMP chẩn đoán sản lá gan lớn trên người bằng công nghệ ADN tái tổ hợp”, có sửa đổi. Đoạn trình tự bảo tồn trên gen ITS2 của SLGL có kích thước 461 bp được chèn vào vector pUC19 và nhân dòng. Kết quả chúng tôi thu được Plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen ITS2 đặc trưng cho SLGL có kích thước 3147bp. Lượng Plasmid thu hồi là 5µg và hòa tan trong 50µl để thu được nồng độ 100ng/µl.

3.2.4. Khảo sát, tối ưu hóa các điều kiện phản ứng LAMP

3.2.4.1. Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn mồi tối ưu

Tiêu chí đánh giá lựa chọn nhiệt độ gắn mồi dựa vào việc quan sát sản phẩm LAMP điện di trên gel agarose 2%. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy ở nhiệt độ 63°C, sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất.

3.2.4.2. Kết quả khảo sát nồng độ $MgSO_4$

Khi tiến hành khảo sát nồng độ $MgSO_4$, chúng tôi tiến hành các phản ứng ở cùng nhiệt độ lại 63°C, thành phần các chất tham gia phản ứng là như nhau, chỉ khác biệt về

nồng độ $MgSO_4$: 4mM, 6mM và 8mM. Kết quả được đánh giá thông qua điện di sản phẩm trên gel agarose 2%, $MgSO_4$ 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định.

3.2.4.3. Kết quả khảo sát thời gian thực hiện phản ứng LAMP

Khảo sát thời gian tối thiểu thực hiện phản ứng LAMP từ 40 đến 60 phút, các thành phần phản ứng: ADN khuôn, mồi, đệm phản ứng, nồng độ Mg^{2+} 8 mM... và các điều kiện khác giữ nguyên và đồng nhất, chỉ thay đổi thời gian thực hiện phản ứng. Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để khuếch đại ADN trong phản ứng LAMP là 60 phút.

3.2.4.4. Kết quả khảo sát chất chỉ thị màu cho phản ứng LAMP

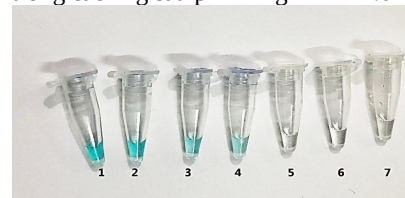
Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn xanh malachite là chất chỉ thị màu cho phản ứng LAMP. Các nồng độ MG được khảo sát là 0,0012%, 0,008%, 0,004% và 0,001%. Kết quả được ghi nhận qua việc quan sát sự thay đổi màu của dung dịch trong các ống sau phản ứng LAMP và điện di sản phẩm trên gel agarose 2%. Nồng độ MG 0,004% là nồng độ tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính.

3.2.5. Khảo sát ngưỡng phát hiện bộ kit LAMP chẩn đoán sản lá gan lớn

Thử nghiệm được chia làm hai giai đoạn.

Giai đoạn một: Thực hiện dò điểm giới hạn phát hiện sơ cấp

Giai đoạn hai: Thực hiện dò ngưỡng phát hiện với độ tin cậy 95% (LOD95%). 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%.



Ống 1: nồng độ ADN 10^{-6} ng/µl.
 Ống 2: nồng độ ADN 10^{-7} ng/µl.
 Ống 3: nồng độ ADN 10^{-8} ng/µl.
 Ống 4: nồng độ ADN 10^{-9} ng/µl.
 Ống 5: nồng độ ADN 10^{-10} ng/µl.
 Ống 6: nồng độ ADN 10^{-11} ng/µl.
 Ống 7: Chứng âm 1
 Ống 8: chứng âm 2

Hình 3.2. Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ mồi LAMP chẩn đoán SLGL

Bảng 3.9. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ mồi LAMP

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

Kết quả ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ kit là 10^{-9} ng/μl tương ứng với $2,94 \times 10^{-1}$ số bản sao/μl.

Bảng 3.10. Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ kit chẩn đoán sán lá gan lớn

Nồng độ (ng/μl)	Số lượng bản sao (bản sao gen/μl)	Số lần lặp lại	Số lần dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)
1×10^{-6}	$2,94 \times 10^2$	12	12	100,00
1×10^{-7}	$2,94 \times 10^1$	12	12	100,00
1×10^{-8}	$2,94 \times 10^0$	12	12	100,00
1×10^{-9}	$2,94 \times 10^{-1}$	12	12	100,00
$7,5 \times 10^{-10}$	$2,21 \times 10^{-1}$	12	11	91,67
5×10^{-10}	$1,47 \times 10^{-1}$	12	8	66,67
$2,5 \times 10^{-10}$	$7,35 \times 10^{-2}$	12	6	50,00
$1,25 \times 10^{-10}$	$3,68 \times 10^{-2}$	12	4	33,33
1×10^{-10}	$2,94 \times 10^{-2}$	12	1	8,33
$6,25 \times 10^{-11}$	$1,84 \times 10^{-2}$	12	0	0,00

Kết quả LOD95% của bộ kit là $2,21 \times 10^{-1}$ số bản sao gen/μl (95%CI: $1,79 \times 10^{-1}$ bản sao gen/μl đến $3,01 \times 10^{-1}$ bản sao gen/μl).

3.2.6. Độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP

Tiến hành đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu trên 130 mẫu phân. Kết quả xét nghiệm được trình bày tại phụ lục 4.

Độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP so sánh với phương pháp tiêu chuẩn vàng PCR.

Bảng 3.11. Độ nhạy, độ đặc hiệu bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn

Fasciola-LAMP	PCR		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	29	3	32
Âm tính	1	97	98
Tổng	30	100	130
Độ nhạy, độ đặc hiệu	Se: 96,67% (95% CI: 82,78 - 99,92); Sp: 97,0% (95% CI: 91,48 - 99,38)		

Độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP chẩn đoán SLGL lần lượt là 96,97% và 97%.

3.2.7. So sánh bộ kit với bộ môi có cùng mục đích và đánh giá bộ kit tại thực địa

Do chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán SLGL được thương mại hóa trên thị trường, chúng tôi tiến hành so sánh bộ kit LAMP với bộ môi LAMP chẩn đoán SLGL của tác giả Martinez và cs công bố trên tạp chí Parasites & vectors năm 2016 [83]. 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 PCR.

Bảng 3.12. Hệ số KAPPA giữa bộ kit LAMP - NIMPE và bộ môi Martinez

	LAMP-NIMPE		Tổng
	Dương	Âm	

Bộ môi Martinez	Dương	24	0	24
	Âm	1	25	26
Tổng		25	25	50

Kappa = 0,96; Tỷ lệ tương đồng giữa hai phương pháp là 96%.

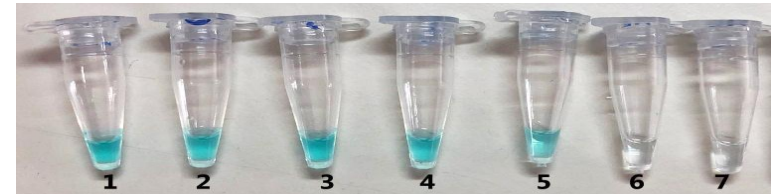
Với Kappa = 0,96 chứng tỏ khả năng phát hiện chẩn đoán của bộ kit LAMP (với ngưỡng phát hiện là 10^{-6} ng/μl ADN).

3.2.8. Độ ổn định của bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn

Bộ sinh phẩm đóng gói và được bảo quản trong 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} ng/μl, 10^{-7} ng/μl và 10^{-9} ng/μl, 2 mẫu bệnh dương tính, 2 mẫu âm tính. 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ và $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ sau khi mở nắp bộ kit.

Bảng 3.13. Kết quả khảo sát độ ổn định của bộ kit sau 12 tháng bảo quản

Nồng độ (ng/μl)	Điều kiện bảo quản $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	
	Lần 1	Lần 2
10^{-6}	(+)	(+)
10^{-7}	(+)	(+)
10^{-9}	(+)	(+)
ADN mẫu 1	(+)	(+)
ADN mẫu 2	(+)	(+)
Neg1	(-)	(-)
Neg2	(-)	(-)



Hình 3.3. Kết quả khảo sát độ ổn định của bộ kit sau 12 tháng

Kết quả cho thấy, bộ kit vẫn hoạt động ổn định sau 6 tháng mở nắp sử dụng và 1 năm kể từ ngày sản xuất khi chưa mở nắp, đồng thời không tiến hành làm tan và đông đá bộ kit LAMP quá 3 lần.

3.2.9. Đóng gói thành phẩm bộ kit, xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và đăng ký kiểm định bộ kit

3.2.9.1. Đóng gói thành phẩm bộ kit, hướng dẫn sử dụng, bảo quản bộ KIT

Bộ kit được đóng gói 50 phản ứng/bộ, gồm: Tờ hướng dẫn sử dụng của bộ kit và 6 ống hóa chất. 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 3.4. Hình ảnh bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn

Thông tin cụ thể trên các ống thành phần của bộ kit LAMP chẩn đoán SLGL được trình bày chi tiết ở phụ lục 6. Hướng dẫn sử dụng bộ kit LAMP chẩn đoán SLGL được trình bày chi tiết trong phụ lục 7.

3.2.9.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và đăng ký kiểm định bộ kit

Nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit LAMP chẩn đoán SLGL dựa trên ba thông số: Độ nhạy, độ đặc hiệu và ngưỡng phát hiện.

Bảng 3.14. Tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit LAMP chẩn đoán SLGL

Chỉ tiêu đánh giá	Tiêu chuẩn cơ sở
Độ nhạy	$\geq 95\%$
Độ đặc hiệu	$\geq 95\%$
Ngưỡng phát hiện LOD95%	$2,21 \times 10^{-1}$ số bản sao gen/μl (95%CI: $1,79 \times 10^{-1}$ bản sao gen/μl đến $3,01 \times 10^{-1}$ bản sao gen/μl)

Bộ tiêu chuẩn cơ sở này đã được thẩm định bởi Viện kiểm định Quốc gia và Sinh phẩm y tế.

3.2.10. Kết quả đánh giá tỷ lệ nhiễm SLGL trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

Bảng 3.15. Kết quả xét nghiệm SLGL bằng các phương pháp ELISA, xét nghiệm phân, LAMP 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

Kết quả ELISA (OD > 0,1 – (+)	Kết quả xét nghiệm (n=2014)						Tổng		
	Thanh Hóa (1004)			Nghệ An (1010)					
	ELISA	Phân	LAMP	ELISA	Phân	LAMP	ELISA	Phân	LAMP
0,1 – 0,5	8	0	1	13	0	0	21	0	1
> 0,5 - ≤ 1,0	3	0	2	7	0	3	10	0	5
> 1,0	1	1	1	3	3	3	4	4	4
Tổng (+)	12	1	4	23	3	6	35	4	10
Âm tính	992	1003	1000	991	1011	1008	1979	2010	2004

Toàn bộ các mẫu (+) với xét nghiệm phân đều dương tính với bộ kit LAMP, ngoài ra còn phát hiện 5/10 mẫu (50%) có độ OD từ 0,5 đến 1, dương tính với bộ kit LAMP và chỉ có 01 trường hợp mẫu có OD < 0,5 dương tính với bộ kit LAMP. Tỷ lệ nhiễm SLGL chung ở hai tỉnh qua kỹ thuật LAMP là 0,5%.

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Mô tả thực trạng nhiễm và xác định một số yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

4.1.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành điều tra trên 2014 người dân sinh sống tại các xã Phú Lâm, Tân Trường (thị xã Nghi Sơn, tỉnh Thanh Hóa) và xã Nghĩa Thuận, Nghĩa Mỹ (thị xã Thái Hòa, tỉnh Nghệ An). Chúng tôi chủ động lựa chọn nhóm đối tượng từ 18 tuổi trở lên do trong một số nghiên cứu trước đây về sán lá gan lớn chỉ ra nhóm tuổi dưới 18 thường có tỷ lệ nhiễm sán lá gan lớn thấp.

Đối tượng nghiên cứu chủ yếu thuộc nhóm tuổi từ 41 – 60 tuổi (40,42%) và từ 21 – 40 tuổi (39,18%), thấp nhất là nhóm từ 18-20 tuổi (gần 4%). Phân bố nhóm tuổi tương đồng với nghiên cứu của Ngô Văn Thanh (2016) [95], Đoàn Thúy Hòa (2020) [96]. Nữ giới chiếm tỷ lệ cao hơn nam giới, lần lượt là 53,67% và 46,33%, tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Thu Hương [97], Nguyễn Khắc Lực [98]. Chúng tôi chọn ngẫu nhiên người dân trong cộng đồng nên phân bố nhóm tuổi, giới tính của dân cư có thể ảnh hưởng đến các đặc điểm này ở đối tượng nghiên cứu.

Khi được hỏi về tình trạng biết đến bệnh SLGL, chỉ có 35,3% người dân có biết đến bệnh này. Đặc điểm trình độ học vấn của người dân từ trung học phổ thông trở xuống có thể là nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ hiểu biết về bệnh còn chưa cao. Đặc điểm này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thu Hương tại Quảng Ngãi khi báo cáo 34,1% người dân có biết về bệnh SLGL [97]. Về tình hình sử dụng nhà vệ sinh, kết quả cho thấy có 94,14% người dân sống trong nhà có hố xí và 83,71% sử dụng hố xí hợp vệ sinh (hố xí tự hoại hoặc hố xí 2 ngăn). Đặc điểm này tương đồng với nghiên cứu của Đoàn Thúy Hòa (2020) tại Ninh Bình. Về thói quen ăn sống rau thủy sinh, phần lớn đối tượng có thói quen này (87,39%) và hơn 1/4 đối tượng thường xuyên ăn sống rau thủy sinh. Tỷ lệ người dân thường xuyên ăn sống rau thủy sinh ở 2 xã của tỉnh Nghệ An cao hơn so với tỉnh Thanh Hóa, cao nhất ở xã Nghĩa Mỹ (gần 35%). Loại rau thủy sinh được sử dụng nhiều nhất là rau xà lách (24,6%) và rau ngổ (22,44%). Tôn Nữ Phương Anh và cs nghiên cứu ở bệnh nhân đến khám tại chỉ ra có 75,6% bệnh nhân có thói quen ăn rau thủy sinh chưa chín [102].

4.1.2. Thực trạng nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

Để xác định tình trạng nhiễm SLGL ở người dân, chúng tôi tiến hành 2 xét nghiệm là: xác định kháng thể kháng SLGL trong huyết thanh bằng ELISA, xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cận. Chúng tôi chỉ phát hiện trứng SLGL khi xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cận ở 4 đối tượng (chiếm 0,2%) – tỷ lệ rất thấp nhưng tương đồng với kết quả nhiều nghiên cứu khác. Nghiên cứu tại Malaysia, Thái Lan sử dụng phương pháp soi phân tìm trứng SLGL báo cáo tỷ lệ dương tính lần lượt là 0,3% và 0,5% [103]. Một nghiên cứu khác trên đối tượng trẻ em tại Pakistan năm 2019 cũng cho kết quả tương tự [40]. Đối với xét nghiệm Ab-ELISA, 35 đối tượng có kết quả dương tính, chiếm tỷ lệ 1,74%. Tỷ lệ nhiễm SLGL trên người xác định được bằng kỹ thuật ELISA cao hơn có ý nghĩa thống kê so với xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cận. Tỷ lệ nhiễm SLGL trong nghiên cứu của chúng tôi cũng thấp hơn so với một số nghiên cứu trong và ngoài nước, như của Nguyễn Văn Văn [50], Nguyễn

Thu Hương [97]. Năm 2012, một nghiên cứu tại thành phố Hồ Chí Minh trên 10.084 người dân, sử dụng kỹ thuật ELISA cho thấy tỷ lệ nhiễm SLGL là 5,9% [104]. So sánh với các nghiên cứu trên thế giới, Y. Corrales và cs (2021) điều tra về tình trạng nhiễm SLGL ở người tại các trang trại chăn nuôi vùng nông thôn Andes ở Venezuela chỉ ra trong số 34 đối tượng không có đối tượng nào soi phân phát hiện trứng nhưng có 29,4% có kết quả SP-ELISA dương tính [105]. Kết quả một nghiên cứu phân tích tổng hợp báo cáo tỷ lệ nhiễm SLGL trên toàn cầu là 4,5% (95%CI: 3,1 – 6,1%), trong đó tỷ lệ tại Châu Á là 2,0% - tương đương với kết quả của chúng tôi [3].

4.1.3. Một số yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

Liên quan giữa tuổi và tình trạng nhiễm sán lá gan lớn

Chúng tôi không tìm thấy mối liên quan giữa tuổi và tình trạng nhiễm SLGL. Kết quả này có sự khác biệt so với nghiên cứu của Nguyễn Khắc Lực (2010) [98], Nguyễn Thu Hương [97]. M.A. Najib và cs (2020) nghiên cứu tại Malaysia ở người dân và công nhân trong các trang trại gia súc cho thấy nhóm từ 18 tuổi trở lên có nguy cơ nhiễm SLGL cao gấp hơn 3 lần nhóm dưới 18 tuổi [108]. Một số nghiên cứu cho thấy tuổi là yếu tố có liên quan đến nhiễm SLGL, thường gặp ở người trưởng thành với tỷ lệ mắc tăng dần theo tuổi và giảm đi ở người cao tuổi. Đặc điểm phân bố giữa các độ tuổi chủ yếu liên quan đến tập quán xã hội do đáp ứng miễn dịch thường ít có vai trò quan trọng trong nhiễm SLGL.

Liên quan giữa giới tính và tình trạng nhiễm SLGL

Chúng tôi cũng không tìm thấy mối liên quan giữa giới tính và tình trạng nhiễm SLGL. Kết quả của chúng tôi có sự khác biệt so với nghiên cứu của Nguyễn Thu Hương [97], Nguyễn Khắc Lực [98]. Toan Nguyen và cs (2016) nghiên cứu tại thành phố Hồ Chí Minh cho thấy nam giới có nguy cơ nhiễm bệnh thấp hơn nữ giới 0,8 lần (95%CI: 0,69 – 0,96) [104]. Do đáp ứng miễn dịch thường ít có vai trò quan trọng trong bệnh này nên sự khác biệt về khả năng mắc bệnh giữa hai giới chủ yếu do các yếu tố hành vi nguy cơ.

Liên quan giữa nghề nghiệp và tình trạng nhiễm SLGL

Nhóm đối tượng nông dân có tỷ lệ nhiễm SLGL là 1,69%, tương đương với nhóm các nghề còn lại gồm công nhân, cán bộ, hưu trí, đi học, nghề tự do.... Kết quả này của chúng tôi có sự khác biệt so với một số nghiên cứu của Nguyễn Thu Hương [97], Nguyễn Khắc Lực [98] khi báo cáo nông dân là nhóm nghề nghiệp có tỷ lệ nhiễm SLGL cao nhất. Nông dân thường có tỷ lệ nhiễm cao nhất do tính chất công việc phơi nhiễm với các yếu tố nguy cơ như tăng khả năng tiếp xúc với nguồn nước ô nhiễm, không an toàn, điều kiện vệ sinh kém, chăn nuôi gia súc. Chúng tôi không thấy mối liên quan giữa nghề nghiệp và nhiễm SLGL có thể là do tại Việt Nam, người dân thường tham gia vào nhiều công việc khác nhau. Những người cán bộ, hưu trí hoặc công nhân vẫn có nhiều thời điểm làm các công việc trồng trọt, chăn nuôi như những người nông dân. Do đó nguy cơ nhiễm giữa các nhóm đối tượng này còn chưa có sự khác biệt rõ ràng.

Liên quan giữa học vấn và tình trạng nhiễm sán lá gan lớn

Tỷ lệ nhiễm sán lá gan lớn ở có học vấn từ tiểu học trở xuống là 2,37%, cao hơn so với nhóm từ THCS trở lên 1,61%. Tất cả 111 người dân có trình độ trên THPT đều không nhiễm SLGL. Tuy nhiên, sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm giữa các nhóm trình

độ học vấn không có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể là do tỷ lệ nhiễm SLGL thấp, số lượng người nhiễm chưa đủ nhiều nên thống kê chưa đủ tác động. Kết quả của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Khắc Lực (2010) [98], Đoàn Thúy Hòa (2020) [96]. Trình độ học vấn có thể ảnh hưởng đến những tiêu chuẩn về vệ sinh và thói quen cá nhân. Ngoài ra những người có học vấn cao hơn cũng thường có ý thức hơn trong việc tìm hiểu và dự phòng các loại bệnh tật. Họ cũng có thể có khả năng hiểu và áp dụng các biện pháp khi được giáo dục, truyền thông phòng bệnh.

Liên quan giữa hiểu biết về bệnh SLGL và tình trạng nhiễm SLGL

Hiểu biết về bệnh SLGL sẽ giúp con người có kiến thức, thái độ và thực hành tốt hơn về các biện pháp dự phòng. Qua phân tích, chúng tôi thấy những người dân chưa nghe về bệnh SLGL có nguy cơ mắc bệnh cao hơn nhóm đã từng nghe về bệnh này gần 6 lần. Những người đã từng nghe đến bệnh SLGL cũng thường thuộc nhóm có trình độ học vấn cao hơn. Những người dân đã từng nghe về bệnh này có thể đã có những hiểu biết nhất định về bệnh, trong đó có các yếu tố nguy cơ và biện pháp dự phòng. Do vậy nên tỷ lệ nhiễm ở nhóm đối tượng này là thấp hơn. Kết quả này cũng góp phần gợi mở về hiệu quả của các chương trình can thiệp giáo dục, truyền thông sức khỏe trong nỗ lực làm giảm tỷ lệ nhiễm SLGL.

Liên quan giữa điều kiện nhà vệ sinh và nhiễm SLGL

Sử dụng hố xí hợp vệ sinh là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến nhiều bệnh lý đường ruột. Kết quả của chúng tôi cho thấy, người dân sống ở gia đình không có hố xí hoặc có hố xí không hợp vệ sinh có nguy cơ nhiễm SLGL cao gấp 4,5 lần (95%CI: 2,29 – 8,85) so với người dân sống ở gia đình có hố xí hợp vệ sinh. Đặc điểm này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Huyền (2018) [110]. Hố xí/nhà tiêu tự hoại giúp quá trình xử lý chất thải tốt hơn nên hạn chế sự ô nhiễm và khả năng lan truyền mầm bệnh ra môi trường nước cũng giảm nhiều. Y. Huang và cộng sự (2017) tiến hành một nghiên cứu can thiệp liên tục bằng chiến lược kiểm soát tích hợp trong đó có việc tác động vào hệ thống nhà vệ sinh. Tất cả các hố xí/nhà tiêu kiểu cũ được thay thế bằng hố xí/nhà tiêu hợp vệ sinh với thiết kế xử lý vô hại. Kết quả kiểm tra cho thấy đã không phát hiện thấy trứng ký sinh trùng sống nào trong các mẫu phân từ các hố xí/nhà tiêu được xây dựng lại [111].

Liên quan giữa thói quen ăn uống và tình trạng nhiễm SLGL

Thói quen ăn uống đóng vai trò quan trọng trong việc lây truyền bệnh SLGL. Chúng tôi thấy rằng đối tượng thường xuyên ăn sống rau thủy sinh có nguy cơ mắc bệnh cao hơn nhóm thỉnh thoảng/hầu như không ăn 7,28 lần (95%CI: 3,47 – 15,26). Kết quả này của chúng tôi tương đồng với nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước [109],[112],[113],[114]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy người dân ăn rau cải xoong có tỷ lệ dương tính (3,5%) cao hơn so với rau ngổ (2,78%), rau muống (1,2%), rau xà lách (0,46%). Trong vòng đời phát triển của SLGL, sau khi phát triển thành trùng nang cercariae được giải phóng khỏi ốc và tìm đến một số thực vật thủy sinh thích hợp để bám vào và phát triển thành nang trùng Metacercariae. Con người và các loài động vật có vú sẽ mắc bệnh nếu ăn phải thực vật có chứa Metacercariae. Do vậy, nếu con người có thói quen thường xuyên ăn sống rau thủy sinh thì nguy cơ mắc bệnh tích lũy càng cao.

4.2. Chế tạo bộ kit Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) phát hiện nhiễm sán lá gan lớn tại thực địa

4.2.1. Thiết kế bộ môi LAMP

Trên thế giới, nhiều tác giả đã sử dụng kỹ thuật LAMP trong chẩn đoán nhiễm SLGL trên đối tượng gia súc như trâu, bò, cừu. Vùng gen được các tác giả quan tâm sử dụng là vùng gen ITS2. Tương tự, chúng tôi cũng sử dụng trình tự gen này để thiết kế bộ môi. Kết quả thu được đoạn trình tự bảo tồn cho giống *Fasciola* có kích thước 461bp. Với vùng trình tự bảo tồn này, chúng tôi thu được 100 bộ môi khác nhau. Bộ môi được lựa chọn cuối cùng đáp ứng được các yêu cầu kỹ thuật về mặt kích thước chiều dài mỗi F3, B3; tỷ lệ % GC nằm trong khoảng 40 – 65%; nhiệt độ nóng chảy của các cặp môi đều thỏa mãn điều kiện của môi LAMP chuẩn và 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 -7,32 đến -5,02 < -4Kcal/mol. Kích thước sản phẩm khuếch đại sau phản ứng LAMP bằng cặp môi F3-B3 có kích thước theo lý thuyết là 218 bp, đảm bảo yêu cầu kỹ thuật là < 280 bp.

4.2.2. Tính đặc hiệu và khả năng hoạt động của bộ môi LAMP

Chúng tôi sử dụng chương trình Primer Blast trên NCBI để kiểm tra tính đặc hiệu của cặp môi F3-B3. Kết quả cho thấy, mỗi bắt cặp hoàn toàn với trình tự ITS2 của SLGL được công bố trên NCBI. Tiến hành thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3-B3 với mẫu ADN của SLGL, sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% để kiểm tra sự bắt cặp của môi trên gene ITS2 của từng loài. Ngoài ra, để khẳng định sản phẩm khuếch đại thu được sử dụng cặp môi F3-B3 chính là của SLGL, chúng tôi tiến hành giải trình tự sản phẩm này và nhận thấy vùng trình tự tương đồng của sản phẩm PCR sử dụng cặp môi F3-B3 với trình tự vùng gen ITS của *Fasciola* là 100%. Kết quả E chúng tôi thu được đạt 2×10^{-108} chứng tỏ sự tương đồng giữa các trình tự chúng tôi thu được với trình tự trên ngân hàng gen là đáng tin cậy.

4.2.3. Khảo sát, tối ưu hóa các điều kiện phản ứng LAMP Nhiệt độ gắn môi

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. Kết quả điện di sản phẩm LAMP thu được cho thấy nhiệt độ phù hợp nhất cho LAMP là 63°C, nhiệt độ này dao động quanh điểm nhiệt độ nóng chảy (T_m) của bộ môi là $5^\circ\text{C} \pm 2$. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu của Ai và cs (2016) và Martinez và cs (2015), đều có nhiệt độ bám môi là 63°C. Nhiệt độ 63°C được đánh giá là nhiệt độ lai lý tưởng theo lý thuyết, có 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. Từ kết quả nghiên cứu này, nhiệt độ 63°C được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

4.2.4. Khảo sát nồng độ MgSO_4

Nồng độ MgSO_4 ảnh hưởng đến hiệu quả và tính đặc hiệu của phản ứng PCR [116]. Với nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy MgSO_4 ở 8 mM là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP, kết quả này của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu của Martinez (2016) [73]. Nồng độ 8 mM cũng nằm trong khoảng nồng độ tối ưu theo khuyến cáo của nhà sản xuất enzyme Bst ADN polymerase.

4.2.5. Khảo sát thời gian thực hiện phản ứng LAMP

Đối với thời gian thực hiện phản ứng LAMP, tiến hành khảo sát với các mốc thời gian là 40 phút và 60 phút. Các thành phần phản ứng giữ nguyên và đồng nhất. Ở mốc 40 phút, lượng sản phẩm của phản ứng LAMP thu được còn ít. Ở mốc 60 phút, lượng sản phẩm ADN tổng hợp được cao hơn, các band điện di thu được rõ ràng. Do vậy, chúng tôi lựa chọn thời gian là 60 phút để phát triển các bộ kit LAMP. Các nhóm tác giả Ai và cộng sự phát triển kỹ thuật LAMP chẩn đoán SLGL; Chen và cs xây dựng kỹ thuật LAMP chẩn đoán *Paragonimus westermani* với thời gian phản ứng là 45 phút – ngắn hơn so với kết quả của chúng tôi [72], [117]. Tác giả Lê Thanh Hòa và cộng sự thực hiện phản ứng LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ với thời gian phản ứng là 75 phút – dài hơn so với nghiên cứu của chúng tôi [118].

4.2.6. Khảo sát chất chỉ thị màu cho phản ứng LAMP

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn Xanh malachite là chất chỉ thị màu cho phản ứng LAMP. Kết quả cho thấy nồng độ MG 0,004% là tối ưu để 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. Kết quả này của chúng tôi cũng tương đồng với các tác giả khác khi sử dụng MG làm chất chỉ thị màu cho phản ứng LAMP [122], [123]. Về khả năng giữ màu sau phản ứng, kết quả cho thấy: Mẫu xanh lam ở các ống mẫu dương tính sau phản ứng vẫn còn nguyên cho đến tối đa 6 tuần, ở điều kiện nhiệt độ phòng.

4.2.7. Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn

Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP xác định sán lá gan lớn 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 ITS2 đặc trưng của SLGL. Kết quả khảo sát xác định ngưỡng phát hiện LOD95% của bộ kit là $2,21 \times 10^{-1}$ số bản sao gen/μl (95%CI: $1,79 \times 10^{-1}$ bản sao gen/μl đến $3,01 \times 10^{-1}$ bản sao gen/μl). Chúng tôi cũng tiến hành thử nghiệm ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP với bộ môi tự thiết kế trên dây nồng độ pha loãng ADN tổng số, tách chiết từ mẫu mô SLGL trưởng thành. Kết quả cho thấy ngưỡng phát hiện đạt 10^{-6} ng/μl, tương đương với nghiên cứu của Ai và cs (2010) là 10^{-5} ng/μl, khi sử dụng kỹ thuật LAMP để chẩn đoán phân biệt nhiễm sán lá gan lớn *F.hepatica* và *F.gigantica* ở cừu [72]. Đồng thời, ngưỡng phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi là “cao” hơn so với ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP (10^{-3} ng/μl) mà Martinez và cs (2016) sử dụng để xác định nhiễm sán lá gan lớn trên cừu ở thực địa [73].

4.2.8. Độ nhạy, độ đặc hiệu, của bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn, so sánh bộ kit với bộ môi cùng mục đích

Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá trên 130 mẫu phân thu thập tại hai tỉnh Bình Định và Quảng Nam và các mẫu bệnh phẩm thu từ Bệnh Viện Đặng Văn Ngữ, Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương, trong đó có 30 mẫu dương tính và 100 mẫu âm tính. Tất cả các mẫu này đều đã được xét nghiệm bằng phương pháp lắng cặn soi tìm trứng trong phân và thẩm định lại bằng phương pháp qPCR. Kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật LAMP cho thấy có 33 mẫu dương tính và 97 mẫu âm tính. Điều này cho thấy bộ kit LAMP có độ nhạy cao hơn và phát hiện được nhiều trường hợp dương tính hơn (33/30 mẫu dương tính) so với kỹ thuật lắng cặn soi tìm trứng trong

phân (27/30 mẫu dương tính). Kết quả này là hoàn toàn hợp lý và tương đồng với những nghiên cứu khác về SLGL.

So sánh với phương pháp tham chiếu qPCR, kết quả của kỹ thuật LAMP cho ra 01 trường hợp âm tính giả và 03 trường hợp dương tính giả. Với trường hợp mẫu âm tính giả: đây là mẫu không phát hiện được bằng phương pháp lắng cặn soi tìm trứng trong phân, nhưng lại dương tính khi sử dụng kỹ thuật qPCR để xác định. Điều này chứng tỏ, mẫu này có nồng độ ADN thấp, kỹ thuật LAMP có ngưỡng phát hiện chưa đủ để phát hiện ở nồng độ này. Độ nhạy của kit LAMP chẩn đoán SLGL tại phòng thí nghiệm là 96,67% (95% CI: 82,78 - 99,92), độ đặc hiệu là 97,0% (95% CI: 91,48 - 99,38).

So sánh với bộ môi LAMP chẩn đoán SLGL của tác giả Martinez và cs công bố trên tạp chí Parasites & vectors năm 2016 [73], bộ kit LAMP chẩn đoán SLGL do Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương chế tạo (với ngưỡng phát hiện là 10^6 ng/μl ADN) có độ phù hợp chẩn đoán cao, với hệ số Kappa = 0,96.

4.2.9. Đánh giá tỷ lệ nhiễm sán lá gan lớn trên người tại Thanh Hóa và Nghệ An bằng bộ kit LAMP

Sán lá gan lớn (*Fasciola spp.*) là một trong những ký sinh trùng gây bệnh quan trọng ở người và động vật, đặc biệt tại các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới. Việc chẩn đoán chính xác đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát và điều trị bệnh, từ đó giảm thiểu tác động đến sức khỏe cộng đồng và năng suất chăn nuôi.

Trong nghiên cứu này, phương pháp LAMP đã xác định được 10 trường hợp dương tính với SLGL trong tổng số mẫu xét nghiệm tại hai tỉnh Nghệ An và Thanh Hóa, cho thấy tỷ lệ nhiễm thực tế thấp hơn đáng kể so với các phương pháp truyền thống như soi hình thái trứng và ELISA. So với phương pháp soi phân, LAMP vượt trội khi không phụ thuộc vào mật độ trứng trong phân – một hạn chế lớn của phương pháp truyền thống. Ở các bệnh nhân nhiễm nhẹ hoặc trong giai đoạn đầu, số lượng trứng được bài tiết ra ngoài thường rất ít và không đều, dẫn đến tỷ lệ phát hiện của soi phân chỉ dừng lại ở 4 trường hợp dương tính trong nghiên cứu này. Thêm vào đó, khả năng nhận diện trứng của SLGL dưới kính hiển vi cũng bị giới hạn bởi nguy cơ nhầm lẫn với các loại trứng sán lá khác hoặc các cấu trúc không liên quan trong mẫu phân.

ELISA phát hiện 35 trường hợp dương tính, nhưng phần lớn không được xác nhận bởi LAMP, cho thấy nguy cơ dương tính giả cao. Nguyên nhân chủ yếu là do ELISA phát hiện kháng thể kháng SLGL, vốn có thể tồn tại lâu dài trong cơ thể sau khi bệnh đã được điều trị hoặc tự khỏi. Ngoài ra, ELISA dễ bị ảnh hưởng bởi phản ứng chéo với kháng nguyên của các loại sán lá khác. Trái lại, LAMP nhắm trực tiếp vào ADN của SLGL, giúp phát hiện chính xác tác nhân gây bệnh bất kể giai đoạn nhiễm, và không phụ thuộc vào mật độ trứng hay sự hiện diện của kháng thể. Phương pháp này còn có ưu điểm vượt trội khi có thể phát hiện ADN từ bất kỳ thành phần nào của SLGL, bao gồm cả các mảnh vụn ký sinh trùng bài tiết ra theo phân, không chỉ giới hạn ở trứng, giúp tăng cường khả năng chẩn đoán ở các mẫu có tải lượng thấp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy cần triển khai rộng rãi phương pháp LAMP trong chẩn đoán SLGL tại các vùng lưu hành, đặc biệt là trong các chương trình giám sát dịch tễ học, nhằm thay thế hoặc bổ sung cho các phương pháp truyền thống. Việc này giúp cung cấp dữ liệu chính xác hơn, hỗ trợ việc xây dựng các chiến lược phòng chống và điều trị hiệu quả hơn. Đồng thời, việc kết hợp LAMP với soi phân hoặc ELISA có thể tận dụng

các ưu điểm của mỗi phương pháp: trong khi soi phân và ELISA hữu ích trong việc sàng lọc ban đầu, LAMP có thể đóng vai trò xác nhận cuối cùng để xác định các trường hợp dương tính thực sự.

KẾT LUẬN

1. Mô tả thực trạng nhiễm và xác định một số yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan lớn trên người tại 4 xã thuộc 2 tỉnh Thanh Hóa và Nghệ An năm 2020-2022

Điều tra bằng xét nghiệm phân, ELISA huyết thanh trên 2014 người dân tại xã Phú Lâm, xã Tân Trường (thị xã Nghi Sơn – Thanh Hóa), xã Nghĩa Thuận, Nghĩa Mỹ (thị xã Thái Hòa – Nghệ An) cho thấy:

- Tỷ lệ nhiễm SLGL qua xét nghiệm phân bằng phương pháp lắng cặn ở 4 xã Phú Lâm, Tân Trường, Nghĩa Thuận, Nghĩa Mỹ lần lượt là 0,2%, 0%, 0,4% và 0,2%, tỷ lệ nhiễm chung là 0,2%.
- Tỷ lệ nhiễm SLGL qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh ở 4 xã lần lượt 1,59%, 0,8%, 2,61% và 1,95%, tỷ lệ nhiễm chung là 1,74%.
- Theo nhóm tuổi: tỷ lệ nhiễm SLGL qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh ở nhóm từ 21-40 tuổi là cao nhất (2,15%), tiếp đến là nhóm từ 41-60 tuổi (1,72%), nhóm từ 18-20 tuổi (1,28%) và thấp nhất ở nhóm trên 60 tuổi (0,9%).
- Theo giới tính: tỷ lệ nhiễm SLGL qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh ở nữ giới (2,04%) cao hơn nam giới (1,39%).
- Theo nghề nghiệp: tỷ lệ nhiễm SLGL qua xét nghiệm Ab-ELISA huyết thanh ở cán bộ, hưu trí là 1,85%, nông dân 1,69%, công nhân 1,3% và nhóm nghề khác là 2,09%.

- Nhóm đối tượng chưa biết về bệnh SLGL có nguy cơ nhiễm SLGL cao hơn nhóm đối tượng có biết về bệnh SLGL là 5,94 lần.

- Nhóm đối tượng ở gia đình không có hố xí/hố xí không hợp vệ sinh có nguy cơ nhiễm cao hơn nhóm đối tượng sống ở gia đình có hố xí hợp vệ sinh gấp 4,5 lần.

- Nhóm đối tượng thường xuyên ăn sống rau thủy sinh có nguy cơ nhiễm sán lá gan lớn cao hơn nhóm thỉnh thoảng/hầu như không ăn 7,28 lần.

- Không phát hiện mối liên quan giữa nhóm tuổi, giới tính, trình độ học vấn, nghề nghiệp với tình trạng nhiễm sán lá gan lớn.

2. Chế tạo bộ kit Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) phát hiện nhiễm sán lá gan lớn tại thực địa

- Đã chế tạo thành công kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn. Các kết quả đánh giá, thử nghiệm tại phòng thí nghiệm, và kiểm định kit tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc-xin và sinh phẩm y tế.

- Bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan lớn có độ nhạy là 96,67%, độ đặc hiệu là 97,0% và ngưỡng giới hạn phát hiện tối thiểu là $2,21 \times 10^{-1}$ số bản sao gen/μl. Độ ổn định của bộ kit là 12 tháng trong điều kiện bảo quản $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$; 6 tháng trong điều kiện bảo quản $2^{\circ}\text{C} \pm 8^{\circ}\text{C}$ kể từ ngày mở nắp sản phẩm.

- Tỷ lệ nhiễm SLGL trên người tại Thanh Hóa và Nghệ An khi sử dụng bộ kit LAMP là 0,5%.

KIẾN NGHỊ

1. Cần tăng cường truyền thông, giáo dục sức khỏe nhằm nâng cao kiến thức, thái độ của người dân về nguy cơ nhiễm sán lá gan lớn. Triển khai đồng bộ các biện pháp phòng chống hiệu quả trong cộng đồng bằng cách ngăn ngừa một số yếu tố liên quan chính như xây dựng, cải tạo lại hồ xí hợp vệ sinh, đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm, ăn chín, uống sôi, hạn chế ăn sống rau thủy sinh. Từ đó, làm giảm tỷ lệ nhiễm sán lá gan lớn trong cộng đồng.

2. Triển khai rộng rãi phương pháp LAMP trong chẩn đoán SLGL tại các vùng lưu hành, đặc biệt là trong các chương trình giám sát dịch tễ học, nhằm bổ sung cho các phương pháp truyền thống. Việc này giúp cung cấp dữ liệu chính xác hơn, hỗ trợ việc xây dựng các chiến lược phòng chống và điều trị hiệu quả hơn.