

**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 CHẨN ĐOÁN**  
**NHIỄM GIUN LƯƠN ĐƯỜNG RUỘT**  
**(*Strongyloides stercoralis*) Ở NGƯỜI, 2017-2020**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**Chuyên ngành: Ký sinh trùng y học**

**Mã số: 62.72.01.16**

**Hà Nội – Năm 2021**

**Công trình được hoàn thành tại Cơ sở đào tạo Sau đại học**

**Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương**

Cán bộ hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trần Xuân Mai
2. PGS.TS. Nguyễn Thị Hương Bình

Phản biện thứ nhất:

Phản biện thứ hai:

Phản biện thứ ba:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện,

Hội đồng họp tại Viện Sốt rét – KST – CTTU vào hồi           giờ  
ngày   năm 2021

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh giun lươn (*Strongyloidiasis*) là bệnh nhiễm ký sinh trùng đường ruột mãn tính ở người do *Strongyloides* spp. gây ra. Việt Nam được xác định là vùng dịch tễ lưu hành của bệnh. Việc chẩn đoán chính xác, sớm ca bệnh gặp nhiều khó khăn và dễ bị bỏ sót. Soi phân tìm ấu trùng có độ nhạy rất thấp. Chẩn đoán huyết thanh tìm kháng thể có độ nhạy cao nhưng có độ đặc hiệu thấp. Phương pháp Baermann, cấy phân trên đĩa thạch hay nuôi cấy từ giấy lọc cần lượng phân nhiều, dụng cụ chuyên biệt, tốn nhân lực và thời gian. Các phương pháp khuếch đại ADN đẳng nhiệt (thường dùng nhất là kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian – Loop-mediated isothermal amplification LAMP) có độ nhạy và đặc hiệu tương đương với PCR; cần các thiết bị xét nghiệm đơn giản, nhỏ gọn; có thể phát hiện kết quả xét nghiệm bằng mắt thường; thời gian xét nghiệm nhanh. Hiện nay chưa có bộ kit LAMP để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột được thương mại hóa. Việc nghiên cứu, phát triển ứng dụng kỹ thuật LAMP mà có thể áp dụng tại thực địa để chẩn đoán nhiễm giun lươn đường ruột là nhu cầu cấp bách. 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.

## 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.

## CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án có 112 trang (không kể phụ lục) bao gồm các phần: Đặt vấn đề (2 trang); chương 1: Tổng quan tài liệu (31 trang); chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (19 trang); chương 3: Kết quả nghiên cứu (34 trang); chương 4: Bàn luận (23 trang); Kết luận (2 trang); Kiến nghị (1 trang); Các công trình đã công bố của tác giả có liên quan đến nội dung luận án (1 trang); Những đóng góp mới của luận án (1 trang); tài liệu tham khảo 120 (17 trang, gồm 26 tài liệu tiếng việt, 94 tài liệu tiếng Anh) và phụ lục (30 trang). Luận án được trình bày với 28 bảng, 28 hình.

## 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. Giống *Strongyloides* có 2 loài được xác định là gây bệnh ở người, chủ yếu là *S. stercoralis* và hiếm gặp hơn là *S. fuelleborni* [39].

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

Giun lươn (GL) *S. stercoralis* có chu kỳ phát triển phức tạp. GL ký sinh ở ruột non, đẻ ra trứng số lượng mỗi ngày rất ít, trứng nhanh chóng nở ra thành ấu trùng (AT) ngay tại ruột non. Trong chu kỳ phát triển của GL có quá trình tự nhiễm.

Bệnh do GL có thời gian ủ bệnh khoảng 1 tháng. Hai thể bệnh chính của bệnh giun lươn là: Thể bệnh thông thường: đau bụng; rối loạn tiêu hóa; ngứa, nổi mẩn, mề đay và thể bệnh nặng [3] bao gồm hội chứng tăng nhiễm GL và bệnh GL lan tỏa, thường gặp nhất trên những bệnh nhân dùng corticosteroid liều cao.

### 1.3 Chẩn đoán và điều trị bệnh giun lươn

Độ nhạy của các kỹ thuật dựa trên kính hiển vi (KHV) thấp, đặc biệt là trong các trường hợp nhiễm mạn tính. Các kỹ thuật như Baermann hoặc nuôi cấy đĩa thạch rất công kênh và tốn thời gian. Miễn dịch là một công cụ hữu ích nhưng nó có thể cho kết quả cao hơn thực tế do không xác định được đang mắc hay đã mắc [31], [42]. 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].

Điều trị cho bệnh GL được khuyến cáo cho tất cả những người bị nhiễm, dù có triệu chứng hay không với một trong hai phác đồ dùng ivermectin hoặc albendazole [3].

## 1.4 Tình hình nhiễm giun lươn

Bệnh giun lươn xảy ra nhiều tại các quốc gia, mức độ nhiễm khác nhau tùy từng vùng. Châu Phi, Nam và Trung Mỹ, Đông Nam Á là vùng dịch tễ lưu hành. Tỷ lệ *S. stercoralis* bị đánh giá thấp so với thực nhiễm. Theo điều tra của Trường Đại học Y Hà Nội và Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng trung ương tỷ lệ nhiễm GL ở miền Bắc thường xuyên dưới 1% [6]. Ở các tỉnh phía Nam Việt Nam, số bệnh nhân nhiễm GL được phát hiện, chẩn đoán và điều trị trong những năm gần đây tương đối nhiều [12], [18]. Ngoài ra, Việt Nam có một số báo cáo về các ca bệnh GL nặng.

## 1.5 Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng trung gian LAMP

Kỹ thuật LAMP là một phương pháp nhân bản gen, có thể tổng hợp một đoạn ADN lớn mà không cần chu trình biến nhiệt. LAMP sử dụng 4-6 mồi khác nhau được thiết kế đặc biệt để nhận ra 6-8 vùng riêng biệt trên gen đích. LAMP chỉ xảy ra khi cả 4 chuỗi mồi bám được vào các vị trí đích của khuôn, tạo ra sản phẩm ADN-vòng. Quá trình diễn ra ở 55°C-65°C, hiệu quả khuếch đại cao. Sản phẩm của phản ứng có thể quan sát bằng mắt thường. LAMP thường được sử dụng để tạo các bộ kit chẩn đoán nhanh [9], [110] và đã được xây dựng để ứng dụng chẩn đoán một số đơn bào, việc thương mại hóa ứng dụng này được cũng đánh giá là rất hiệu quả [70]. Tại Việt Nam hiện chưa có nghiên cứu về ứng dụng LAMP vào chẩn đoán nhiễm *S. stercoralis* được công bố. Trên thị trường chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán *S. stercoralis* được thương mại hóa và ứng dụng trên lâm sàng.

## 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**

**Đối tượng nghiên cứu:** Ấu trùng (AT) *S.stercoralis* làm chứng chuẩn và phát triển chứng dương.

**Địa điểm và thời gian nghiên cứu:** từ tháng 9 năm 2017 đến tháng 5 năm 2019 tại 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.

**Thiết kế nghiên cứu:** Thực nghiệm và mô tả phòng thí nghiệm

**Cỡ mẫu:** Mẫu chuẩn dương để chuẩn kỹ thuật: tối thiểu 03 mẫu AT giun lươn *S. stercoralis* ở các giai đoạn nghiên cứu, mỗi mẫu tiến hành xét nghiệm lặp lại 3 lần.

### **Nội dung nghiên cứu**

- Xây dựng quy trình gồm 4 bước:

+ Bước 1: Thiết kế bộ môi: Tải 30 trình tự gen 18S rRNA của giun lươn, xác định vùng bảo tồn, đưa vào phần mềm thiết kế môi LAMP để lựa chọn bộ môi. Khảo sát tính đặc hiệu của môi.

+ Bước 2: Khảo sát tối ưu hóa các điều kiện của phản ứng LAMP.

+ Bước 3: Khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ môi.

+ Bước 4: Tạo chứng dương bằng công nghệ ADN tái tổ hợp.

- Đóng gói bộ kit.

### **Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:**

Thu thập và bảo quản mẫu, xử lý mẫu và tách chiết ADN, sử dụng các phần mềm tin sinh chuyên dụng như Primer Explorer v.5, Primer Blast, Mega 7, kỹ thuật qPCR – Taqman Probe, phương pháp điện di, phương pháp tạo dòng, giải trình tự.

### **Các chỉ số đánh giá**

- Tính đặc hiệu của bộ môi với *S. stercoralis*
- Các điều kiện phản ứng.
- Ngưỡng phát hiện
- Chất lượng chứng dương

- Quy trình chế tạo bộ kit và đóng gói: 2000 test.

## **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**

**Đối tượng nghiên cứu:** Bộ kit LAMP sản phẩm của mục tiêu 1, mẫu phân, mẫu huyết thanh thu thập được từ người đã xác định nhiễm, nghi ngờ nhiễm và không nhiễm GLĐR.

**Địa điểm và thời gian nghiên cứu:** từ tháng 9 năm 2017 đến tháng 8 năm 2020 tại Đức Hòa, Long An, ĐHYK Phạm Ngọc Thạch, Khoa Khám bệnh chuyên ngành và Khoa SHPT Viện Sốt rét-Ký sinh trùng -Côn trùng Trung ương, BM Vi sinh-Ký sinh, khoa Y, Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh.

**Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm tại phòng thí nghiệm và tại thực địa.

**Cỡ mẫu:** Đánh giá độ nhạy độ, đặc hiệu của bộ kit: dựa vào công thức tính mẫu [105], tính được cỡ mẫu là 73 mẫu, trong đó cần có 19 mẫu dương thật, thực tế đã sử dụng bộ 132 mẫu gồm: 100 mẫu (-) và 32 mẫu (+). Đánh giá tính ổn định của bộ kit: 07 mẫu. Đánh giá bộ kit tại thực địa: thu thập có chủ đích 300 mẫu. So sánh bộ kit với bộ môi khác có cùng mục đích tương tự cần 50 mẫu gồm 25 mẫu dương tính và 25 mẫu âm tính. Dựa trên 141 mẫu lưu và thu tại Khoa Khám bệnh trong thời gian nghiên cứu để so sánh bộ kit với soi phân và ELISA.

### **Nội dung nghiên cứu**

- Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit tại phòng thí nghiệm: qPCR làm phương pháp tham chiếu.
- Tính ổn định của bộ kit: tiến hành qua 3 thử nghiệm.
- Đánh giá bộ kit tại thực địa.
- So sánh bộ kit với bộ môi cùng mục tiêu đã được công bố trên các tạp chí uy tín. Mức độ đồng thuận: 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 mức độ đồng thuận giữa mỗi cặp phương pháp: hệ số Kappa.
- Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và đăng ký kiểm định bộ kit.

**Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:** Thu thập và bảo quản mẫu, xử lý mẫu và tách chiết ADN, kỹ thuật ELISA, kỹ thuật soi phân, kỹ thuật qPCR – Taqman Probe, phương pháp điện di trên gel agarose.

**Các chỉ số đánh giá:**

- Độ nhạy: > 95%.
- Độ đặc hiệu: > 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.

**Xử lý số liệu:** Phần mềm MedCalc, tính độ nhạy, độ đặc hiệu, hệ số Kappa, sai số bằng độ lệch chuẩn SD.

**2.3 Kiểm soát sai số**

Quá trình thực nghiệm dựa trên các quy trình chuẩn, tuân thủ theo tiêu chuẩn phòng thí nghiệm ISO 15189, mã hóa số liệu.

**2.4 Đạo đức trong nghiên cứu**

Tuân thủ đầy đủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học.

### Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 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

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

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

St	Tên	Trình tự môi	Độ dài
1	F3	AGAGGGTTTAAACCAGACATT	21
2	B3	CTTCGAACCTCTAACTTTCGTT	22
3	FIP	GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA- GGTCTAGCATGGAATAACACT	45
4	BIP	TACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGAC- CTTGATTAATGAAAACATTCTTGGC	50
5	LF	GGTCTAGCATGGAATAACACT	21
6	LB	GCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA	24

**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

Số TT	Tên môi	Nhiệt độ nóng chảy Tm	5'dG	3'dG	Tỷ lệ GC
1	F3	56.60	-5.53	-4.06	0.38
2	B3	57.89	-5.04	-4.85	0.41
3	FIP				
4	BIP				
5	LF	56.79	-4.43	-4.55	0.43
6	LB	63.00	-7.64	-3.15	0.46

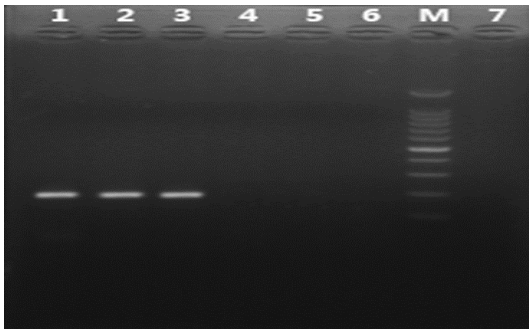
Dựa trên kết quả các bảng, chúng tôi nhận thấy:

- Các môi F3, B3 thiết kế đều đạt yêu cầu về chiều dài.
- Về khoảng cách giữa các môi đều thỏa mãn yêu cầu.
- Các môi đều có %GC nằm trong tỉ lệ cho phép (38% - 46%).
- Nhiệt độ nóng chảy của các cặp môi: thỏa mãn điều kiện.
- 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  $\Delta G$  từ -7,64 đến  $-4,06 < -4\text{Kcal/mol}$ , là yêu cầu bắt buộc với một bộ môi LAMP.
- Sản phẩm khuếch đại sau phản ứng LAMP bằng cặp môi F3-B3 có kích thước theo lý thuyết là  $226 \text{ bp} < 250 \text{ bp}$ .

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

### 3.1.1.2 Khảo sát tính đặc hiệu của bộ môi

- Lý thuyết: chúng tôi dùng chương trình Primer Blast trên NCBI để kiểm tra tính đặc hiệu của cặp môi F3-B3. Kết quả thu được cho thấy, môi bắt cặp hoàn toàn với trình tự 18S rRNA của *Strongyloides stercoralis* được công bố trên NCBI.
- Khảo sát bằng thực nghiệm: Kiểm tra phản ứng chéo của bộ môi thiết kế qua các bước:
  - + Thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp môi 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: không có sản phẩm nhân bản của cặp môi F3/B3 thiết kế với ADN của giun móc, giun mỏ, *Gnathostoma sp...*



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

Làn

1-3:

*Strongyloides stercoralis*                      Làn 6: *Gnathostoma sp*  
 Làn 4: Giun móc *A. duodenale*                      Làn 7: Chứng âm  
 Làn 5: Giun mỏ *Necator americanus*

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 không có sự bắt cặp chéo của cặp mồi với các loài khác, chứng tỏ mồi hoạt động tốt.

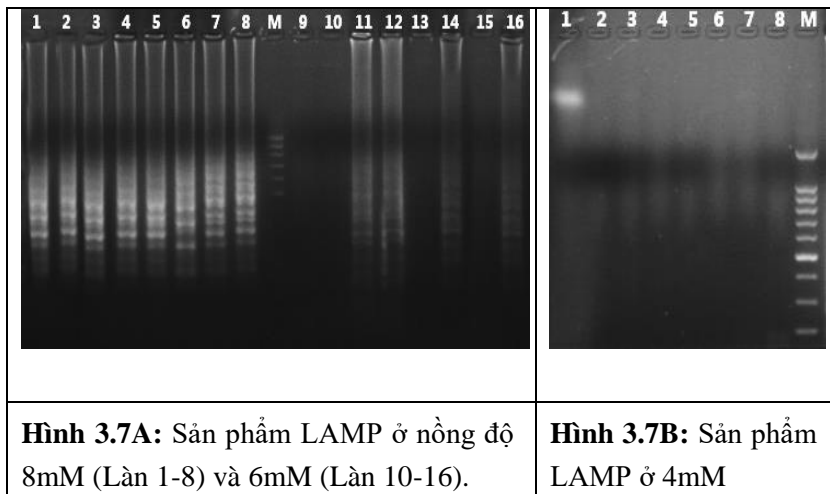
### **3.1.2 Kết quả xác định các điều kiện phản ứng LAMP với hệ mồi tự thiết kế**

#### **3.1.2.1 Nhiệt độ của phản ứng LAMP**

Tiến hành khảo sát nhiệt độ trong khoảng từ 60°C đến 65°C, chỉ thay đổi về nhiệt độ lai còn các thành phần (ADN bản mẫu, mồi, đệm phản ứng...) và các điều kiện khác (thiết bị, thời gian ...) 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. Chúng tôi lựa chọn điểm nhiệt độ 63°C cho phản ứng LAMP.

#### **3.1.2.2 Nồng độ MgSO<sub>4</sub>**

Trong phản ứng LAMP, nồng độ MgSO<sub>4</sub> thích hợp thường nằm trong khoảng 4mM đến 8mM. Chúng tôi tiến hành các phản ứng với thành phần, điều kiện như nhau, chỉ khác biệt về nồng độ MgSO<sub>4</sub>, thí nghiệm được lặp lại ba lần. Kết quả được đánh giá thông qua điện di sản phẩm trên gel agarose 2%



$MgSO_4$  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.

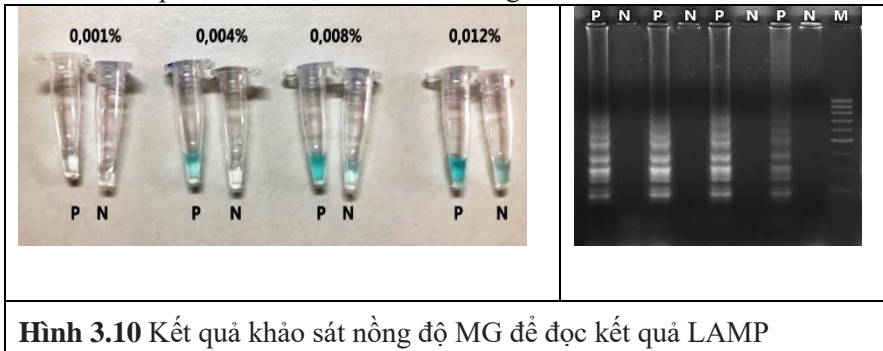
### 3.1.2.3 Thời gian tiến hành phản ứng LAMP

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 và các điều kiện khác 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.

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



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

### 3.1.3 Ngưỡng phát hiện của bộ kit LAMP

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 dãy 6 nồng độ plasmid tái tổ hợp được pha loãng bậc 10 liên tiếp (từ  $10^{-6}$ ng/ $\mu$ L đến  $10^{-11}$ ng/ $\mu$ 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.

Giai đoạn hai: 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 của giai đoạn 1.

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%. Kết quả cho thấy, ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ kit là  $10^{-8}$  ng/ $\mu$ L tương ứng với  $2,82 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L.

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

TT	Nồng độ (ng/ $\mu$ L)	SL bản sao (bản sao gen/ $\mu$ L)	Số lần lặp lại	Số lần đương	Tỉ lệ đương (%)
1	$1 \times 10^{-6}$	$2,82 \times 10^2$	12	12	100,00
2	$1 \times 10^{-7}$	$2,82 \times 10^1$	12	12	100,00
3	$1 \times 10^{-8}$	$2,82 \times 10^0$	12	12	100,00
4	$7,5 \times 10^{-9}$	$2,12 \times 10^0$	12	11	91,67
5	$5 \times 10^{-9}$	$1,41 \times 10^0$	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	$1 \times 10^{-9}$	$2,82 \times 10^{-1}$	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/ $\mu$ L (95% CI:  $1,71 \times 10^0$  bản sao gen/ $\mu$ L đến  $2,89 \times 10^0$  bản sao gen/ $\mu$ L). Đây là ngưỡng phát hiện tốt, cho phép phát hiện tác nhân gây bệnh ở mật độ thấp.

### 3.1.4 Kết quả xây dựng chứng dương

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 được là 5 $\mu$ g và hòa tan trong 50 $\mu$ L để thu được nồng độ 100ng/ $\mu$ L, tương đương với  $2,82 \times 10^{10}$  copies/ $\mu$ L.

### 3.1.5 Kết quả chế tạo bộ kit LAMP chẩn đoán nhiễm *Strongyloides 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 và 6 ống hóa chất. Ngoài hộp có nhãn với đầy đủ thông tin về lô sản xuất, ngày hết hạn, điều kiện bảo quản, nơi sản xuất.

### 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

Xét nghiệm 132 mẫu phân thu thập tại tỉnh Long An và các mẫu bệnh phẩm thu từ ĐHYK Phạm Ngọc Thạch năm 2018: phương pháp xét nghiệm phân và real-time PCR cho kết quả như nhau gồm 32 mẫu dương tính và 100 mẫu âm tính, còn bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR thì có kết quả là có 34 mẫu dương tính và 98 mẫu âm tính.

**Bảng 3.11** Kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR

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%)			

So sánh với phương pháp qPCR làm phương pháp tham chiếu (chuẩn vàng), 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 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  $10^{-6}\text{ng}/\mu\text{L}$ ,  $10^{-7}\text{ng}/\mu\text{L}$  và  $10^{-8}\text{ng}/\mu\text{L}$ ; 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 11 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.

Kết quả thử nghiệm 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 trở lại bộ kit LAMP quá 3 lần.

**Bảng 3.12 Kết quả khảo sát độ ổn định của bộ Kit sau 6 tháng bảo quản**

Nồng độ (ng/ $\mu\text{L}$ )	Điều kiện bảo quản $2-8^{\circ}\text{C}$ sau mở nắp					
	1/2019	2/2019	3/2019	4/2019	5/2019	6/20
$10^{-6}$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
$10^{-7}$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
$10^{-8}$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Mẫu dương 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Mẫu dương 2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Neg 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Neg 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Bảng 3.15** Khảo sát độ ổn định của bộ Kit sau 12 tháng bảo quản.

Nồng độ (ng/uL)	Điều kiện bảo quản - 20°C ± 5°C	
	Lần 1: tháng 1/2019	Lần 2: tháng 12/2019
10 <sup>-6</sup>	(+)	(+)
10 <sup>-7</sup>	(+)	(+)
10 <sup>-8</sup>	(+)	(+)
ADN mẫu 1	(+)	(+)
ADN mẫu 2	(+)	(+)
Neg1	(-)	(-)
Neg2	(-)	(-)

### 3.2.3 Đánh giá và so sánh bộ kit tại thực địa

#### 3.2.3.1 Kết quả đánh giá bộ kit tại thực địa

Đánh giá khả năng hoạt động của bộ kit tại thực địa ở 4 xã của 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. Soi phân không phát hiện trường hợp nhiễm GL nào. Kết quả LAMP và qPCR cho kết quả dương tính với *S. stercoralis* với 3 mẫu giống nhau và âm tính đối với 297 mẫu còn lại.

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

So sánh bộ kit LAMP trong nghiên cứu của chúng tôi với bộ môi LAMP chẩn đoán GLĐR của tác giả Perdro- Fernandez- Soto và cs trên 25 mẫu (+), 25 mẫu (-) đã được xác định bằng phương pháp real-time PCR. Kết quả được thể hiện qua phụ lục 4 và bảng 3.19. Với K = 0,91 chúng tôi khả năng phát hiện chẩn đoán 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, xét nghiệm phân và ELISA trong chẩn đoán nhiễm giun lươn

Kết quả xét nghiệm chẩn đoán nhiễm GLĐR của 141 bệnh nhân đến khám tại Khoa khám bệnh chuyên ngành như sau:

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

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

Khả năng phát hiện chẩn đoán *S. stercoralis* của bộ kit LAMP là phù hợp thấp với phương pháp soi phân trực tiếp,  $K=0,39$ ; phù hợp khá với phương pháp ELISA,  $K=0,74$ .

### 3.2.4 Đăng ký kiểm định tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit.

**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°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/ $\mu$ L
5	Thời gian xét nghiệm	Không quá 3 giờ
6	Độ ổn định	12 tháng trong điều kiện bảo quản -20°C $\pm$ 5°C; 6 tháng kể từ ngày mở nắp

Bộ tiêu chuẩn cơ sở này được thẩm định bởi Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế đạt yêu cầu theo đúng công bố.

## **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**

Nhiều xét nghiệm PCR đã được thiết kế để phát hiện *S. stercoralis*, với gen đích là gen ty thể cythochrome 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 đã được chứng minh là nhạy hơn và được sử dụng trong hầu hết các xét nghiệm qPCR cho chẩn đoán *Strongyloides stercoralis* [31], [43], [56]. Chúng tôi đã chọn vùng gen đích trong nghiên cứu của mình là 18S rRNA. Kết quả các bảng 3.1, 3.2, 3.3 và 3.4 cho thấy khi đánh giá chất lượng của môi so với tiêu chuẩn thì các môi đều đạt tiêu chuẩn.

Kết quả ở hình 3.4 cho thấy, dùng phần mềm Primer Blast để kiểm tra thì thấy đoạn môi F3, B3 bắt cặp 100% trên ngân hàng gen và có sản phẩm khuếch đại cùng với kích thước 226 bp. Khi thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3 và B3 trong bộ môi LAMP với các nền mẫu ADN 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**

Nhiệt độ gắn môi ( $T_a$ ) 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 ( $T_m$ )  $5^\circ\text{C}$ . Theo đó, nhiệt độ của phản ứng LAMP được tiến hành khảo sát từ  $60$  đến  $65^\circ\text{C}$ . Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy không có sự khác biệt giữa 3 điểm nhiệt độ khảo sát là  $63^\circ\text{C}$ ,  $64^\circ\text{C}$ ,  $65^\circ\text{C}$  (hình 3.6). Chúng tôi chọn điểm

nhệt độ 63°C vì nhiệt độ này tạo điều kiện ủ môi và tăng cường khả năng chịu đựng các chất ức chế.

Trong dung dịch đệm, ion  $Mg^{2+}$  đóng vai trò quan trọng nhất, nó làm tăng nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) của ADN mạch đôi, tạo ra phức chất tan với dNTPs để hình thành cơ chất mà enzym polymerase có thể nhận ra, cần thiết cho quá trình liên kết của các dNTPs. Thông qua điện di sản phẩm trên gel agarose 2% chúng tôi chọn  $MgSO_4$  ở nồng độ 8mM là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP.

Chúng tôi thử nghiệm ở các mức điều kiện thời gian phản ứng 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).

Độ đục do kết tủa trắng 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. Sử dụng các thuốc nhuộm huỳnh quang như calcein hoặc SYBR Green I như trong nghiên cứu của các tác giả khác [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. Chất chỉ thị màu Xanh malachite (MG) 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 [81], [96]. 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. 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) ở nồng độ MG 0,004%.

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%). Kết quả ngưỡng phát hiện này là tương đương nghiên cứu khác về ứng dụng sinh học phân tử để chẩn đoán GL của các tác giả 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.

#### **4.1.3 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. 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 5 $\mu$ g và hòa tan trong 50 $\mu$ L để thu được nồng độ 100ng/ $\mu$ L, tương đương với 2,82x10<sup>10</sup> copies/ $\mu$ L, 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<sup>o</sup>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.

### **4.2 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 bộ kit tại phòng thí nghiệm**

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]. Kết quả 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 cũng như sự phù hợp cao giữa 2 phương pháp.

#### **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, kết quả cho thấy 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 không được khảo sát. Như vậy 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  $2-8^{\circ}\text{C}$  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  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  hoặc  $2-8^{\circ}\text{C}$ ) 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 và so sánh bộ kit tại thực địa**

Phương pháp soi phân trực tiếp không phát hiện trường hợp nhiễm GLDR nào (0%) và phương pháp qPCR và LAMP cùng cho kết quả giống nhau 100% với 3 trường hợp dương tính (1%). 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 (2017 – 2018) [25] là 6,64%. Sự khác biệt về tỉ lệ do: tác giả Lê Đức Vinh sử dụng đồng thời nhiều kỹ thuật xét nghiệm phân (trong đó có kỹ thuật cấy phân), nghiên cứu của tác giả cũng tiến hành ở những địa bàn khác, dẫn đến khác nhau về tính chất dịch tễ khu trú cũng như khác nhau về

thời điểm lấy mẫu và 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.

Chúng tôi tìm các bộ kit sẵn có nhưng chưa có bộ kit LAMP chẩn đoán GLĐR trên thị trường. Vì vậy, chúng tôi so sánh bộ kit LAMP trong nghiên cứu với kết quả ứng dụng bộ mỗi LAMP chẩn đoán GLĐR của tác giả Perdro- Fernandez- Soto và cs công bố trên tạp chí Plos Neglected tropical diseases năm 2016 [86]. Hệ số Kappa là 0,92 chứng tỏ bộ kit LAMP của chúng tôi phù hợp cao với bộ mỗi đã công bố của Perdro, đáp ứng tiêu chuẩn và độ tin cậy để sử dụng cho các nghiên cứu đánh giá hoặc áp dụng kỹ thuật LAMP.

Phụ lục 5, bảng 3.20 và 3.21 cho thấy khả năng phát hiện chẩn đoán của bộ kit LAMP là phù hợp thấp với phương pháp soi phân trực tiếp. Như chúng ta đã biết soi phân có độ nhạy thấp trong chẩn đoán giun lươn [31], trong khi LAMP được đánh giá là có độ nhạy cao hơn. Phụ lục 5, bảng 3.20 và 3.22 cho thấy khả năng phát hiện chẩn đoán của bộ kit LAMP là phù hợp khá với phương pháp ELISA. Có 18 trường hợp chỉ dương tính với một trong hai kỹ thuật LAMP và ELISA. Hai phương pháp này sử dụng hai cơ chế khác nhau nên 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.

#### **4.2.4 Kiểm định tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit**

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của bộ kit LAMP chẩn đoán giun lươn đường ruột, 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

### 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 môi đặc hiệu cho giun lươn đường ruột trên vùng gen 18S rRNA gồm 6 môi cụ thể là:

+ F3 (21 bp) có trình tự AGAGGGTTTAAACCAGACATT

+ B3 (22 bp) có trình tự CTTCGAACCTCTAACTTTCGTT

+ FIP (45 bp) có trình tự GCCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA-GGTCTAGCATGGAATAAACT

+ BIP (50 bp) có trình tự TACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGAC-CTTGATTAATGAAAACATTCTTGGC

+ LF (21 bp) có trình tự GGTCTAGCATGGAATAAACT

+ LB (24 bp) có trình tự GCCCCCGTTTGTTCCTATTAATCA.

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

+ Nhiệt độ bắt cặp môi là 63°C

+ Thời gian phản ứng là 60 phút

+ Nồng độ  $Mg^{2+}$  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  $2,12 \times 10^0$  bản sao gen/ $\mu$ L

- 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 có độ nhạy là 96,88% (CI 95%: 83,78% - 99,92%), 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.

## **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.