

Nghiên cứu chế tạo kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis* nhiễm trên người

Phạm Thị Hà Trang^{1*}, Trương Văn Hạnh², Trần Thanh Dương³, Hoàng Đình Cảnh²

¹Sở Y tế Hà Nội, 4 Sơn Tây, phường Điện Biên, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, 34 Trung Văn, phường Trung Văn, quận Nam Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Dinh dưỡng Quốc gia, 48 Tăng Bạt Hổ, phường Phạm Đình Hổ, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/1/2024; ngày chuyển phân biện 5/1/2024; ngày nhận phân biện 26/1/2024; ngày chấp nhận đăng 30/1/2024

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: *Clonorchis sinensis* là một trong ba loài sán lá gan nhỏ gây bệnh trên người, lưu hành chủ yếu ở châu Á và miền Bắc Việt Nam. LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) có độ nhạy, đặc hiệu tương đương với PCR nhưng yêu cầu về trang thiết bị xét nghiệm đơn giản hơn so với PCR. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm chế tạo kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis*, đánh giá kit LAMP tại phòng thí nghiệm và thực địa hẹp với 150 mẫu phân thu thập từ người dân sống trong vùng dịch tễ sán lá gan nhỏ. **Kết quả:** Thiết kế, lựa chọn bộ môi LAMP, tối ưu điều kiện và thành phần của phản ứng LAMP chẩn đoán *C. sinensis*. **Kết quả đánh giá kit LAMP tại phòng thí nghiệm** cho độ nhạy là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99%), độ đặc hiệu 100% (95% CI: 85,25-100%), ngưỡng giới hạn phát hiện tối thiểu 26 bản sao gen/ μ l, độ ổn định là 12 tháng (bảo quản $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$) và 6 tháng kể từ ngày mở nắp. **Đánh giá kit LAMP tại tỉnh Ninh Bình** phát hiện tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* là 6,66%, tương đồng với xét nghiệm bằng real-time PCR. **Kết luận:** Chế tạo được kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* có độ nhạy, độ đặc hiệu cao >95%, độ ổn định của kit là 12 tháng trong điều kiện bảo quản $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ và 6 tháng kể từ ngày mở nắp sản phẩm.

Từ khóa: kit LAMP, real-time PCR, sán lá gan nhỏ.

Chỉ số phân loại: 3.3

1. Đặt vấn đề

C. sinensis là một trong ba loài sán lá gan nhỏ gây bệnh ở người. Trên thế giới, ước tính có khoảng 35 triệu người nhiễm sán lá gan nhỏ *C. sinensis*, lưu hành chủ yếu ở một số quốc gia châu Á bao gồm Hàn Quốc, Triều Tiên, Nhật Bản, Trung Quốc và các tỉnh miền Bắc Việt Nam [1]. Tại Việt Nam, sán lá gan nhỏ *C. sinensis* lưu hành ở ít nhất 22 tỉnh/thành phố phía Bắc, tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ có khác nhau ở các điểm nghiên cứu, một số vùng dịch tễ có tỷ lệ nhiễm cao như ở Nam Định lên tới 37% và Ninh Bình khoảng 20-30% [2].

Đến nay, xét nghiệm phát hiện nhiễm sán lá gan nhỏ trên người chủ yếu được thực hiện bằng kỹ thuật Kato-Katz để tìm trứng sán trong phân. Tuy vậy, kỹ thuật này có độ nhạy thấp, không phân biệt được trứng giữa các loài sán lá gan nhỏ, có thể nhầm lẫn với trứng các loài sán lá ruột khác [3]. Các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch như ELISA ít được sử dụng do có độ phức tạp hơn và nhiều bằng chứng cho thấy có tỷ lệ dương tính giả nhất định.

Chẩn đoán bằng sinh học phân tử thường sử dụng các gen đích ITS1, ITS2 và DNA ty thể với các kỹ thuật PCR, real-time PCR để chẩn đoán sán lá gan nhỏ cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Tuy vậy, chưa được áp dụng rộng rãi do giá thành cao và khâu kỹ thuật phức tạp, không triển khai được tại thực địa [4].

LAMP là kỹ thuật sinh học phân tử mới được nghiên cứu và phát triển năm 1998. Thành phần phản ứng gồm có DNA khuôn, môi, enzyme Bst DNA polymerase, hỗn hợp phản ứng và được ủ

ở 65°C . Phương pháp này có hiệu quả khuếch đại cao khoảng 10^9 - 10^{10} bản sao trong 15-60 phút. Ưu điểm vượt trội của kỹ thuật này là có độ nhạy, độ đặc hiệu cao tương đương với các phương pháp PCR, DNA làm khuôn khuếch đại không đòi hỏi độ tinh sạch cao. Kết quả của phản ứng LAMP có thể được quan sát trực tiếp bằng mắt thường. Thời gian xét nghiệm nhanh khoảng 60 phút. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn kỹ thuật LAMP để nghiên cứu, phát triển và ứng dụng trong xét nghiệm chẩn đoán nhiễm sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên người, hiện chưa có sản phẩm kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ được thương mại trên thế giới và Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Đối tượng nghiên cứu:

+ Sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

+ Con trưởng thành hoặc ấu trùng của một số loài sán, giun khác thu thập từ người hoặc động vật gồm: *Haplorchis taichui*, *H. pumilo*, *Fasciola gigantica*, *Paragonimus heterotremus*, *Taenia solium*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Opisthorchis viverrini*.

+ Người dân sống trong vùng dịch tễ sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

- Thời gian: Nghiên cứu được tiến hành từ năm 2018-2020.

- Địa điểm: Phòng Thí nghiệm sinh học phân tử, Viện Sốt rét -

*Tác giả liên hệ: Email: hatrangpham89@gmail.com

Study on producing a LAMP kit for diagnosis of small liver fluke *Clonorchis sinensis* infection in humans

Thi Ha Trang Pham^{1*}, Van Hanh Truong²,
Thanh Duong Tran³, Dinh Canh Hoang²

¹Hanoi Department of Health,

4 Son Tay Street, Dien Bien Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Malaria Parasitology and Entomology,

34 Trung Van Street, Trung Van Ward, Nam Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

³National Institute of Nutrition, 48 Tang Bat Ho Street,

Pham Dinh Ho Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 3 January 2024; revised 26 January 2024; accepted 30 January 2024

Abstract:

Background: *Clonorchis sinensis* is one of the three species of small liver flukes that cause infections in humans. *C. sinensis* is found mainly in several Asian countries and Northern, Vietnam. The Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with a sensitivity and specificity comparable to that of the PCR method, which requires less complex equipment and facilities for performance. **Methods:** The research design describes the laboratory experiment and evaluates a LAMP kit for the diagnosis of *C. sinensis* in the laboratory and the small-scale field assessment, using 150 human stool samples from fascioliasis endemic areas. **Results:** The LAMP primer sets have been designed and selected; the conditions and components of the LAMP reaction for *C. sinensis* diagnosis have been optimised. Evaluation results of the LAMP kit in the laboratory showed a sensitivity of the test was 98.63% (95% CI: 91.92-99.99%); a specificity was 100% (95% CI: 85.25-100%); the limit of detection was 26 gene copies/ μ l. The LAMP test kit was found to be stable within 12 months at $-20\pm 5^\circ\text{C}$, and 6 months after opening the tubes. The field assessment of the LAMP kit in Ninh Binh province showed a *C. sinensis* rate of 6.66%, which was similar to the rate obtained from the studies using the real-time PCR method. **Conclusions:** The research has successfully produced a LAMP kit for the diagnosis of *C. sinensis* that is sensitive >95% and highly specific >95%. The LAMP kit is stable within 12 months at $-20\pm 5^\circ\text{C}$ and for 6 months after opening the tubes.

Keywords: *Clonorchis sinensis*, LAMP kit, real-time PCR.

Classification number: 3.3

Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương và xã Yên Lộc, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả thực nghiệm phòng thí nghiệm và đánh giá kit LAMP tại thực địa hẹp tỉnh Ninh Bình.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

- Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu tại phòng thí nghiệm: 100 mẫu phân có kết quả xét nghiệm bằng real-time PCR, trong đó có 73 mẫu dương tính và 27 mẫu âm tính với sán lá gan nhỏ *C. sinensis*. Các mẫu phân được thu từ người dân sống tại Ninh Bình.

- Đánh giá bộ kit tại thực địa hẹp tại Ninh Bình: 150 mẫu.

2.2.3. Nội dung nghiên cứu

- Thiết kế bộ môi LAMP: Môi LAMP được thiết kế trên vùng gen ty thể nad1 bằng phần mềm Primer Explorer v.5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Đánh giá tính đặc hiệu của môi bằng Blast Primer trên Ngân hàng gen NCBI và thực nghiệm bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp môi ngoài F3/B3 trên các mẫu sán lá gan nhỏ trưởng thành, mẫu phân và một số loài sán, giun khác.

- Khảo sát tối ưu hóa các thông số của phản ứng LAMP: Nhiệt độ hoạt động của bộ môi ($59-68^\circ\text{C}$); nồng độ Mg^{2+} (2, 4, 6 và 8 mM); thời gian của phản ứng, dye màu phát hiện sản phẩm LAMP bằng hydroxyl naphthol blue (HNB) thêm vào hỗn hợp dung dịch trước phản ứng. Các nồng độ HNB được khảo sát là 80, 100, 120 và 140 μM .

- Ngưỡng phát hiện của kit LAMP được xác định bằng cách thử nghiệm phản ứng LAMP trên dãy nồng độ pha loãng bậc 10 liên tiếp với mẫu DNA plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen nad1 đặc trưng của sán lá gan nhỏ đã biết nồng độ.

- Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, độ ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm.

- Đánh giá bộ kit LAMP tại thực địa tỉnh Ninh Bình.

2.2.4. Hóa chất, vật liệu tiêu hao

- Hóa chất: Kit tách chiết DNA từ mẫu mô, mẫu phân của Hãng Qiagen, Đức. Enzyme Bst DNA polymerase large fragment của Hãng New England Biolabs, Mỹ; dNTPs mix của Hãng Qiagen và Thermo Fisher Scientific. Các trình tự môi thiết kế được đặt tổng hợp bởi Hãng IDT, Mỹ...

- Vật liệu tiêu hao: ống nhựa 2 ml, ống PCR 0,2 ml, đầu tip phin lọc 1 ml, 200 μ l, 100 μ l và 10 μ l.

2.2.5. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Thiết kế môi sử dụng các phần mềm tin sinh chuyên dụng như Bioedit V.7.2.6.1, Primer Explorer v.5, Primer Blast...

- Kỹ thuật real-time PCR xác định sán lá gan nhỏ theo X.Q. Cai và cs (2012) [5].

- Kỹ thuật phản ứng PCR, LAMP.

- Xử lý thống kê bằng phần mềm MedCalc 19.4.1.

2.2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

Hồ sơ nghiên cứu được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương thông qua tại Quyết định số 87/QĐ-VSR ngày 9/1/2017.

3. Kết quả

3.1. Thiết kế, đánh giá lựa chọn các bộ môi LAMP

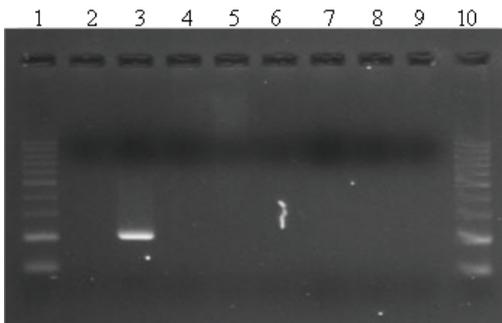
Bộ môi được thiết kế dựa trên gen ty thể nad1 mã số MF287784.1 của chủng *C. sinensis* công bố trên Ngân hàng gen NCBI với các chủng lưu hành ở Việt Nam, Trung Quốc và Hàn Quốc. Môi được lựa chọn đáp ứng các yêu cầu kỹ thuật như về độ dài đoạn khuếch đại là 188 bp, tính bền vững ở đầu các môi như đầu 3' của các môi F3/B3, F2/B2 và đầu 5' của F1c/B1c với năng lượng tự do $\Delta G \leq -4$ kcal/mol, thành phần GC trong môi chiếm 40-65%... Bộ môi thiết kế có trình tự được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi LAMP thiết kế để chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

Thứ tự	Tên môi	Trình tự môi	Chiều dài môi (bp)
1	HCS-nad1-F3	GTTCA GTGACGCTTTTG TG	19
2	HCS-nad1-B3	GTAATCACCACACACAAAG	20
3	HCS-nad1-FIP (F1c+F2)	TATACGACCCCAACCAACC- GTTGCTTTTAATTACTAGGTTGAC	48
4	HCS-nad1-BIP (B1c+B2)	AAGTTTGCTCTTATAAGTTGTGTC- AATGCACATAAAACAGGCC	48

Khi Blast trình tự primer trên Ngân hàng gen NCBI chỉ bắt cặp đặc hiệu với các trình tự gen đích nad1 của *C. sinensis*, không lai chéo với các loài khác.

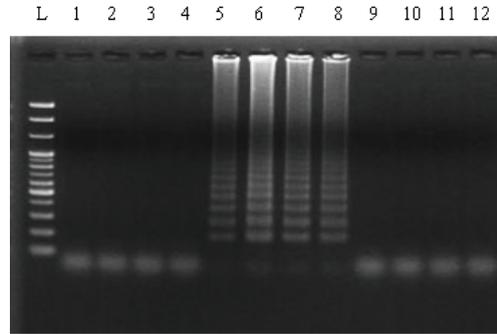
Kết quả khảo sát độ đặc hiệu thực nghiệm bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3/B3 của bộ môi LAMP với nền mẫu DNA tách chiết từ mẫu phân nhiễm trứng sán lá gan nhỏ và 8 mẫu DNA tách từ các loài sán, giun khác chỉ cho sản phẩm PCR với kích thước band điện di thu được là 188 bp với sán lá gan nhỏ *C. sinensis* đúng với kích thước thiết kế, không lai chéo với các loài sán, giun thử nghiệm khác.



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp môi F3/B3 của *C. sinensis*. Giếng 1 và 10: ladder 100 bp; giếng 2: *O. viverrini*; giếng 3: *C. sinensis*; giếng 4: *H. pumilio*; giếng 5: *H. taichui*; giếng 6: *E. japonicas*; giếng 7: *F. gigantica*; giếng 8: *A. lumbricoide*; giếng 9: chứng âm.

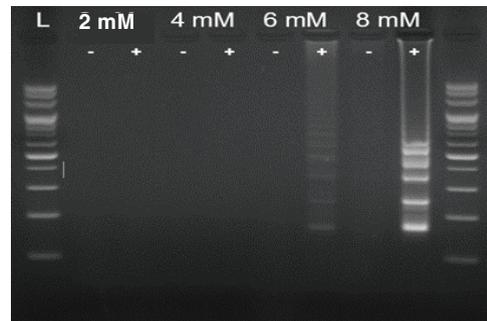
3.2. Kết quả khảo sát và tối ưu hóa phản ứng LAMP

Nhiệt độ bắt cặp môi LAMP: Kết quả khảo sát lựa chọn nhiệt độ ủ môi tiến hành cho phản ứng LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là 63°C (hình 2).



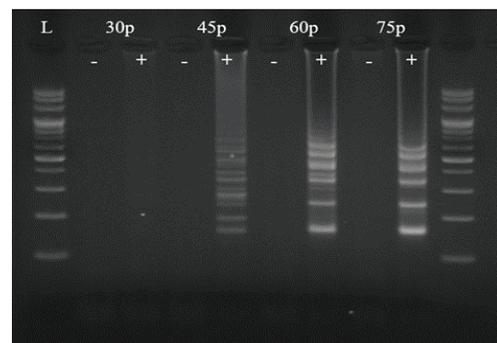
Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm LAMP khảo sát nhiệt độ ủ môi ở dải nhiệt độ 59-68°C. L: thang đo 100 bp; giếng 1: chứng âm; giếng 2-12: khảo sát nhiệt độ ủ môi ở 59-68°C; giếng 6: nhiệt độ ủ môi 63°C.

Nồng độ $MgSO_4$ 8 mM cho sản phẩm LAMP tối ưu với hiệu suất tổng hợp cao hơn được lựa chọn sử dụng cho phản ứng LAMP (hình 3).



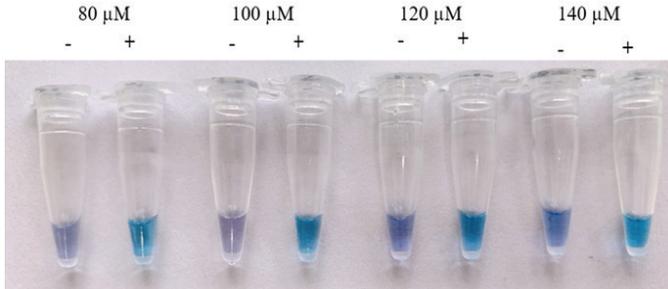
Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm LAMP khảo sát với các nồng độ $MgSO_4$. L: thang đo 100 bp; (-): chứng âm; (+): DNA khuôn nồng độ 10^{-3} ng/ μ l.

Thời gian thực hiện phản ứng LAMP cho sản phẩm tổng hợp với hiệu suất tổng hợp cao, ổn định là 60 hoặc 75 phút (hình 4). Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn thời gian tối ưu cho phản ứng LAMP là 60 phút.



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm LAMP khảo sát thời gian thực hiện phản ứng. L: thang đo 100 bp; (-): chứng âm là nước khử ion; (+): DNA khuôn nồng độ 10^{-3} ng/ μ l.

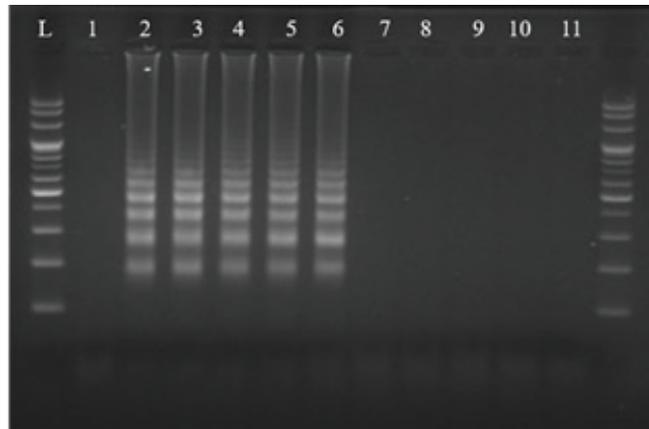
Khảo sát chất chỉ thị màu sử dụng để phát hiện sản phẩm LAMP bằng mắt thường: Kết quả thực nghiệm cho thấy, cả 4 nồng độ chất chỉ thị màu HNB đều có thể phát hiện, phân biệt rõ ràng giữa mẫu âm tính và dương tính bằng mắt thường. Nồng độ 100 μM được chọn là nồng độ tối ưu được thêm vào phản ứng LAMP (hình 5).



Hình 5. Ảnh sản phẩm LAMP được phát hiện bằng chất chỉ thị màu HNB với các nồng độ. "-": âm tính; "+": dương tính.

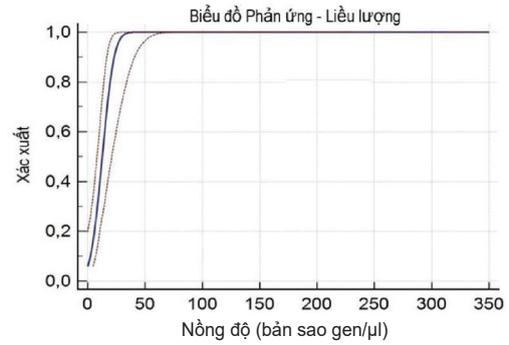
3.3. Kết quả xác định ngưỡng phát hiện của bộ kit LAMP

Ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* là 10^{-7} ng/ μl . Đây là ngưỡng thấp nhất cả 3 lần thử nghiệm đều cho kết quả dương tính (hình 6).



Hình 6. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP dựa trên dãy nồng độ pha loãng của chứng dương chuẩn là plasmid tái tổ hợp. L: thang đo 100 bp; giếng 1: chứng âm; giếng 2: nồng độ DNA 10^{-3} ng/ μl ; giếng 3: nồng độ DNA 10^{-4} ng/ μl ; giếng 4: nồng độ DNA 10^{-5} ng/ μl ; giếng 5: nồng độ DNA 10^{-6} ng/ μl ; giếng 6: nồng độ DNA 10^{-7} ng/ μl ; giếng 7: nồng độ DNA 5×10^{-8} ng/ μl ; giếng 8: nồng độ DNA $2,5 \times 10^{-8}$ ng/ μl ; giếng 9: nồng độ DNA 10^{-8} ng/ μl ; giếng 10: nồng độ DNA 10^{-9} ng/ μl ; giếng 11: nồng độ DNA 10^{-10} ng/ μl .

Kết quả sử dụng phần mềm MedCalc 19.4.1 để phân tích xác định ngưỡng phát hiện của kit LAMP được thể hiện ở hình 7.



Hình 7. Biểu đồ xác định ngưỡng phát hiện của kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

Kết quả phân tích xác định ngưỡng phát hiện LOD 95% của kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là $2,66 \times 10^1$ bản sao gen/ μl (95% CI: $2,05 \times 10^1$ đến $4,15 \times 10^1$ bản sao gen/ μl).

3.4. Kết quả đánh giá bộ kit LAMP tại phòng thí nghiệm và thực địa

Kết quả bảng 2 cho thấy, độ nhạy của kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* tại phòng thí nghiệm là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99), độ đặc hiệu là 100% (95% CI: 85,25-100%).

Bảng 2. Độ nhạy, độ đặc hiệu của kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

Kit LAMP	Kỹ thuật real-time PCR	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính	72	0
Âm tính	1	27
Tổng	73	27
	Độ nhạy là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99%)	Độ đặc hiệu là 100% (95% CI: 85,25-100%)

Tổng số 150 mẫu DNA tách từ mẫu phân bằng bộ QIAamp DNA Stool mini Kit được xét nghiệm bằng kỹ thuật LAMP tại thực địa tỉnh Ninh Bình và real-time PCR tại phòng thí nghiệm kết quả xác định có 10/150 (6,66%) mẫu dương tính và 140/150 (93,34%) mẫu âm tính với sán lá gan nhỏ *C. sinensis*, tỷ lệ tương đồng kết quả là 100% (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả xét nghiệm phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* bằng bộ kit LAMP tại thực địa tỉnh Ninh Bình và so sánh với xét nghiệm real-time PCR.

Kit LAMP	Kỹ thuật real-time PCR		
	Dương tính	Âm tính	Tổng
Dương tính	10	0	10
Âm tính	0	140	140
Tổng	10	140	150
Kapa: 1,0			

4. Bàn luận

4.1. Thiết kế lựa chọn môi LAMP

Bộ môi LAMP được thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu bộ gen của sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên Ngân hàng gen NCBI, sử dụng phần mềm như Bioedit V.7.2.6.1, để tìm vùng bảo tồn trên vùng gen mục tiêu. Có 24 trình tự gen nad1 của các chủng *C. sinensis* có nguồn gốc từ Việt Nam, Trung Quốc và Hàn Quốc được lựa chọn để thiết kế môi, kết quả phân tích đã lựa chọn được vùng bảo thủ có chiều dài 309 bp. Sử dụng phần mềm trực tuyến Primer Explorer v.5 để thiết kế môi, lựa chọn môi dựa trên các tiêu chí kỹ thuật của yêu cầu thiết kế môi về mặt lý thuyết theo hướng dẫn [1]. Bộ môi HCS-nad1 được lựa chọn do đáp ứng các yêu cầu kỹ thuật về mặt kích thước chiều dài môi F3/B3 là 188 bp, về tỷ lệ phần trăm GC nằm trong khoảng 45-65% và mức năng lượng tự do ở các đầu 3' của các môi thiết kế có ΔG từ -4,01 đến -6,73 < -4 kcal/mol. Hơn nữa, khi Blast các trình tự môi trên Ngân hàng gen NCBI để kiểm tra độ đặc hiệu lý thuyết cho thấy, môi thiết kế bắt cặp đặc hiệu với các trình tự gen nad1 của các chủng *C. sinensis* được công bố trên Ngân hàng gen NCBI với tỷ lệ 100%, không lai chéo với các loài sán lá gan nhỏ khác và cũng không có sự lai chéo với các trình tự DNA các loài giun khác. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu bằng thực nghiệm cho thấy, cặp môi F3/B3 của bộ môi LAMP thiết kế chỉ cho sản phẩm PCR đặc hiệu với mẫu DNA của sán lá gan nhỏ *C. sinensis*, kích thước sản phẩm PCR thu được đúng với kích thước thiết kế là 188 bp, không có lai chéo với các loài giun, sán khác (hình 1).

4.2. Tối ưu thành phần và điều kiện của phản ứng LAMP, xác định ngưỡng phát hiện của kit LAMP

Một trong những đặc trưng của LAMP là khuếch đại DNA ở điều kiện đẳng nhiệt có thể dao động 50-68°C. Nhiệt độ ủ môi theo lý thuyết là nhiệt độ tham khảo, trong khi nhiệt độ bắt cặp thực tế có thể cao hơn 3-12°C [1]. Trên cơ sở này, chúng tôi đã khảo sát nhiệt độ ủ môi trong khoảng 59-68°C. Kết quả khảo sát bộ môi HCS-nad1 cho thấy, ở nhiệt độ 63°C cho sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất (hình 2). Điểm nhiệt độ này cao hơn nhiệt độ nóng chảy (T_m) của bộ môi thiết kế ở 5-7°C phù hợp với nhiệt độ lai theo lý thuyết, đây cũng là nhiệt độ phù hợp cho hoạt tính xúc tác của enzyme Bst DNA Polymerase theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Thời gian ủ của phản ứng LAMP được khảo sát với các mốc thời gian là 30, 45, 60 và 75 phút. Kết quả cho thấy, phản ứng LAMP cho sản phẩm nhân bản DNA ở mốc thời gian là 45, 60 và 75 phút (hình 4). Trong đó, ở mốc thời gian 45 phút do chưa đủ thời gian cho phản ứng tổng hợp nên lượng sản phẩm thu được còn ít, ở mốc 60 và 75 phút lượng sản phẩm tổng hợp được cao hơn, các band điện di thu được rõ ràng. Với mục tiêu giảm thời gian xét nghiệm nên chúng tôi lựa chọn thời gian ủ 60 phút để phát triển các bộ kit LAMP. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] khi lựa chọn thiết kế bộ môi dựa

trên gen đích Cox1 của bộ gen ty thể phát hiện *C. sinensis* với thời gian phản ứng là 60 phút; một số tác giả khác lựa chọn thời gian lâu hơn như T.H. Le và cs (2012) [7] là 75 phút hoặc ít hơn như Y. Arimatsu và cs (2015) [8] phát triển kỹ thuật LAMP xác định sán lá gan lớn *Fasciola* với thời gian ủ phản ứng là 45 phút.

Nồng độ $MgSO_4$ là yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả và tính đặc hiệu của phản ứng LAMP. Trong dung dịch đệm quan trọng nhất là ion Mg^{2+} làm tăng nhiệt độ nóng chảy của DNA mạch đôi, tạo ra phức chất tan với dNTPs để hình thành cơ chất mà enzyme polymerase có thể nhận ra, điều này rất cần thiết cho quá trình liên kết của các dNTPs. Nồng độ $MgSO_4$ trong phản ứng thấp làm giảm hiệu quả nhân bản thậm chí không thể nhân bản được. Ở nồng độ cao, $MgSO_4$ ức chế phản ứng LAMP hoặc giảm tính đặc hiệu của môi do nó ổn định cấu trúc bắt cặp không đặc hiệu và tạo ra sản phẩm ký sinh. Trong phản ứng LAMP, nồng độ $MgSO_4$ thích hợp thường nằm trong khoảng 4 đến 10 mM. Sau khảo sát, chúng tôi nhận thấy rằng, $MgSO_4$ ở nồng độ 4 mM không có sản phẩm khuếch đại; $MgSO_4$ ở nồng độ 6 mM cho sản phẩm không ổn định, hiệu suất không cao; $MgSO_4$ ở nồng độ 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định. Do vậy, nồng độ $MgSO_4$ 8 mM được lựa chọn là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của T.H. Le và cs (2012) [7], S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] và cũng nằm trong khoảng nồng độ $MgSO_4$ tối ưu theo khuyến cáo của nhà sản xuất enzyme Bst DNA polymerase.

Để phát hiện sản phẩm của phản ứng LAMP bằng mắt thường có nhiều phương pháp như phát hiện sản phẩm khuếch đại trực quan bằng cách quan sát độ đục của dung dịch, bằng thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc thuốc nhuộm chỉ thị pH, mỗi cách thức lại có những ưu và nhược điểm riêng. Gần đây, một số chất chỉ thị màu được sử dụng thêm vào phản ứng LAMP là các chỉ thị nhạy với pH như là HNB [9]. HNB hiệu quả khi các chất chỉ thị này được bổ sung vào đệm LAMP trước khi tiến hành phản ứng và không ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme Bst DNA polymerase, đồng thời loại bỏ nguy cơ tạp nhiễm giữa các mẫu. Trong quá trình phản ứng LAMP xảy ra, ban đầu nồng độ Mg^{2+} cao và có 1,4 mM dNTPs thì HNB cho màu tím than. Sau đó lượng Mg^{2+} giảm dần do tham gia phản ứng kết tủa với một sản phẩm phụ của phản ứng LAMP (pyrophosphate) và dẫn đến dung dịch phản ứng LAMP chuyển dần sang màu xanh da trời. Với nghiên cứu này, nồng độ HNB 100 μM là tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính.

Theo T. Notomi và cs (2000) [10], giới hạn phát hiện của kỹ thuật LAMP có thể tương đương với kỹ thuật PCR. Nghiên cứu trước đây của T.H. Le và cs (2012) [7] cho kết quả ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP là từ 10^{-3} (1 pg) đến 10^{-4} ng (100 fg) với nền mẫu DNA tách từ sán lá gan nhỏ trưởng thành, trong khi với xét nghiệm PCR thông thường là 10^{-2} ng (10 pg). Điều này cho thấy, LAMP nhạy hơn khoảng 100 lần so với xét nghiệm PCR thông thường. Trong nghiên cứu này, ngưỡng phát hiện của kỹ

thuật LAMP xác định sán lá gan nhỏ được xác định bằng phản ứng LAMP với nền mẫu là dãy nồng độ DNA pha loãng từ plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen nad1 đặc trưng của sán lá gan nhỏ *C. sinensis*. Kết quả khảo sát xác định ngưỡng phát hiện (LOD 95%) của bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là $2,66 \times 10^1$ số bản sao gen/ μ l (95% CI: $2,05 \times 10^1$ đến $4,15 \times 10^1$ bản sao gen/ μ l) (hình 7). Với ngưỡng phát hiện đạt $2,66 \times 10^1$ bản sao gen/ μ l tương đương với ngưỡng phát hiện của một số bộ kit đã được công bố và thương mại trên thị trường như kit LAMP xác định ký sinh trùng sốt rét của Công ty Eiken, Nhật Bản với ngưỡng phát hiện 10-100 bản sao gen/ μ l [11].

4.3. Độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP và kết quả đánh giá tại thực địa

Đến nay còn có rất ít các nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên người. Một số nhà khoa học đã phát triển ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên vật chủ trung gian cá nước ngọt, ốc. Kết quả xác định LAMP không có sự nhiễm chéo với các loài khác, độ nhạy của LAMP cao hơn 1000 lần so với PCR thông thường, giới hạn phát hiện khoảng 10 fg [9]. S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP sử dụng gen CoxI phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên mẫu phân người, giới hạn phát hiện của kỹ thuật khoảng 100 fg, với khoảng 1 trứng/100 mg phân, độ nhạy với mẫu 100 trứng/g phân đạt được 100%. Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá trên 100 mẫu phân để xét nghiệm đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu tham chiếu với kết quả xét nghiệm bằng real-time PCR. Kết quả đã xác định được độ nhạy của kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* do chúng tôi phát triển tại phòng thí nghiệm là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99%), độ đặc hiệu là 100% (95% CI: 85,25-100%). Độ nhạy, độ đặc hiệu này cũng tương đồng với độ nhạy của kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* của S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] với độ nhạy đạt 97,1% và độ đặc hiệu là 100%. Bộ kit LAMP được theo dõi đánh giá độ ổn định trong vòng 1 năm, kết quả cho thấy, bộ kit hoạt động ổn định sau 6 tháng mở nắp sử dụng và 1 năm kể từ ngày sản xuất khi chưa mở nắp. Với độ ổn định của bộ kit trong 1 năm sử dụng khi được bảo quản ở $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ là tương đối phù hợp cho triển khai xét nghiệm ở các cơ sở y tế tuyến dưới. Kết quả thử nghiệm đánh giá bộ kit LAMP tại xã Yên Lộc, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình bước đầu cho thấy đã phát hiện được tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là 6,66%, kết quả này tương đương với xét nghiệm bằng real-time PCR tại phòng thí nghiệm.

5. Kết luận

Chế tạo được bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* có độ nhạy, độ đặc hiệu cao $>95\%$, độ ổn định của kit là 12 tháng trong điều kiện bảo quản $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ và 6 tháng kể từ ngày mở nắp sản phẩm. Từ kết quả này có thể tiếp tục nghiên cứu đánh giá mở rộng và hoàn thiện bộ kit thành bộ sinh phẩm chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V. Bouvard, R. Baan, K. Straif, et al. (2009), "A review of human carcinogens - part B: Biological agents", *Lancet Oncol.*, **10**(4), pp.321-322, DOI: 10.1016/s1470-2045(09)70096-8.
- [2] National Institute of Malaria Parasitology and Entomology (2019), *Report Summarizing The Prevention of Malaria, Parasites and Insects in 2019 and Implementing The Plan for 2020* (in Vietnamese).
- [3] World Health Organisation (2019), *Bench Aids for The Diagnosis of Intestinal Parasites*, Second Edition, 32pp.
- [4] K. Duenngai, P. Sithithaworn, U.K. Rudrappa, et al. (2008), "Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples", *J. Clin. Microbiol.*, **46**(1), pp.366-368, DOI: 10.1128/JCM.01323-07.
- [5] X.Q. Cai, H.Q. Yu, J.S. Bai, et al. (2012), "Development of a TaqMan based real-time PCR assay for detection of *Clonorchis sinensis* DNA in human stool samples and fishes", *Parasitol Int.*, **61**(1), pp.183-186, DOI: 10.1016/j.parint.2011.06.010.
- [6] S.M.M. Rahman, H.B. Song, Y. Jin, et al. (2017), "Application of a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting cox1 gene for the detection of *Clonorchis sinensis* in human fecal samples", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **11**(10), DOI: 10.1371/journal.pntd.0005995.
- [7] T.H. Le, N.T.B. Nguyen, N.H. Truong, et al. (2012), "Development of mitochondrial Loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae, Trematoda, Platyhelminthes)", *J. Clin. Microbiol.*, **50**(4), pp.1178-1184, DOI: 10.1128/JCM.06277-11.
- [8] Y. Arimatsu, S. Kaewkes, T. Laha, et al. (2015), "Specific diagnosis of *Opisthorchis viverrini* using Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting parasite microsatellites", *Acta Trop.*, **141**, Pt. B, pp.368-371, DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.09.012.
- [9] M. Goto, E. Honda, A. Ogura, et al. (2009), "Colorimetric detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue", *Biotechniques*, **46**(3), pp.167-172, DOI: 10.2144/000113072.
- [10] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, et al. (2000), "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", *Nucleic Acids Res.*, **28**(12), DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [11] Eiken Chemical Co. Ltd (2012), *Manual of Standard Operating Procedures for Malaria LAMP*, 30pp.