

Phát triển kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan lớn *Fasciola* spp.

Nguyễn Thị Hồng Ngọc^{1*}, Nguyễn Thị Hương Bình¹, Nguyễn Thu Hương¹, Nguyễn Thị Thu Huyền¹,
Trần Văn Hải², Trần Thanh Dương¹

¹Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương (NIMPE)

²Viện Y học dự phòng Quân đội

Ngày nhận bài 27/5/2020; ngày chuyển phản biện 1/6/2020; ngày nhận phản biện 30/6/2020; ngày chấp nhận đăng 3/7/2020

Tóm tắt:

Sán lá gan lớn (SLGL) *Fasciola* spp. có hai loài là *Fasciola gigantica* và *Fasciola hepatica* gây bệnh chủ yếu ở động vật ăn cỏ như trâu, bò, cừu... và cho cả người. Theo Tổ chức y tế thế giới (WHO), hiện nay bệnh lưu hành ở 75 quốc gia và vùng lãnh thổ trên toàn cầu. WHO coi bệnh này là vấn đề sức khỏe cần được quan tâm trong chương trình sức khỏe cộng đồng và đã được nhiều quốc gia xếp vào vị trí quan trọng trong chiến lược và chính sách y tế. Việc phát triển một kỹ thuật phát hiện nhiễm SLGL nhanh, chính xác là rất quan trọng và cần thiết. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã phát triển kỹ thuật LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) để phát hiện SLGL *Fasciola* spp. từ các nền mẫu khác nhau như phân, mô... Kỹ thuật này có ưu điểm là tính đặc hiệu cao, thời gian phát hiện nhanh và sử dụng trang thiết bị đơn giản. Bộ mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen ITS2. Phản ứng dương tính được quan sát bằng mắt thường, sử dụng chất chỉ thị màu là xanh malachit (MG).

Từ khóa: *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola* spp., gen ITS2, LAMP.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Bệnh SLGL ở người do *Fasciola* spp. gây nên, theo WHO, hiện nay bệnh lưu hành ở 75 quốc gia và vùng lãnh thổ trên toàn cầu. Các khu vực có tỷ lệ nhiễm SLGL cao là cao nguyên Nam Mỹ, thung lũng sông Nile, lưu vực biển Caspi, cũng như Đông Á và Đông Nam Á [1]. WHO coi bệnh SLGL là vấn đề sức khỏe cần được quan tâm trong chương trình sức khỏe cộng đồng và đã được nhiều quốc gia xếp vào vị trí quan trọng trong chiến lược và chính sách y tế. Một số đặc điểm dịch tễ của SLGL có sự khác nhau giữa các quốc gia.

Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới, có điều kiện về tự nhiên và xã hội thuận lợi cho các loài ký sinh trùng như SLGL, sán lá gan nhỏ, các loài giun tròn đường ruột... phát triển, gây ảnh hưởng lớn tới sức khỏe người dân. Tại Việt Nam, SLGL đã được ghi nhận là bệnh lây truyền từ động vật sang người, phổ biến nhất là loài *F. gigantica*. Theo báo cáo của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương (NIMPE), bệnh nhân nhiễm SLGL được phát hiện trên nhiều tỉnh/thành phố trong cả nước. Bệnh gặp chủ yếu ở người trên 15 tuổi và có chiều hướng gia tăng trong những năm gần đây: năm 2011 có khoảng 10.407 ca bệnh phân

bổ ở 53 tỉnh/thành phố trong cả nước đã được điều trị; năm 2019, số bệnh nhân SLGL được điều trị tại NIMPE, Trung tâm Phòng chống Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Nghệ An, Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Thanh Hóa và Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn là 12.309.

Việc phát hiện nhanh SLGL để có biện pháp phòng chống hiệu quả là rất quan trọng. Hiện nay, các kỹ thuật xét nghiệm SLGL chủ yếu dựa vào xét nghiệm trực tiếp tìm trứng trong phân như phương pháp lắng cặn, phương pháp Willis, hoặc các kỹ thuật miễn dịch phát hiện kháng nguyên, kháng thể... [2-6]. Tuy nhiên, kỹ thuật soi phân tìm trứng có độ nhạy thấp (khoảng 30-40%), độ đặc hiệu phụ thuộc nhiều vào kinh nghiệm của kỹ thuật viên. Các kỹ thuật miễn dịch phát hiện kháng thể có độ nhạy cao hơn nhưng có hiện tượng âm tính giả.

Kỹ thuật PCR có độ nhạy, độ đặc hiệu cao nhưng đòi hỏi các máy móc trang thiết bị đắt tiền, khó áp dụng tại thực địa, do đó kỹ thuật ADN/ARN đẳng nhiệt có độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương PCR, không đòi hỏi các trang thiết bị đắt tiền là hướng đi được ưu tiên và được ứng dụng ngày càng rộng rãi trên thế giới.

Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt LAMP được nghiên cứu

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

Development of a LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay for detection of *Fasciola* spp.

Thi Hong Ngoc Nguyen^{1*}, Thi Huong Binh Nguyen¹,
Thu Huong Nguyen¹, Thi Thu Huyen Nguyen¹,
Van Hai Tran², Thanh Duong Tran¹

¹National Institute of Malarology, Parasitology and Entomology (NIMPE)

²Military Preventive Medicine Institute

Received 27 May 2020; accepted 3 July 2020

Abstract:

Fasciola spp. have two species, *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica*, which cause disease mainly in herbivores such as buffaloes, cows, sheep, etc. and cause disease in humans. According to the World Health Organization (WHO), the disease is currently circulating in 75 countries and territories around the globe. WHO considers the disease a health issue that needs attention in public health programs and has been ranked as an important position in health strategy and policy by many countries. Therefore, developing a fast and accurate technique to detect *Fasciola* infection is very important and necessary. In this study, the authors developed the LAMP technique to detect *Fasciola* spp. from different kinds of sample such as feces, tissue samples, etc. The advantages of this method included high specificity, fast detection time, and simple equipment use. Primer set was designed for founding on ITS2 gene. A positive reaction was visualised with the naked eye, using the color indicator, malachite green.

Keywords: *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola* spp., ITS2 gene, LAMP.

Classification number: 3.5

và phát triển bởi Công ty Eiken Chemical (Nhật Bản) và là phương pháp nhân bản gen đẳng nhiệt đang được ứng dụng nhiều nhất. Thành phần phản ứng gồm có ADN khuôn, mồi, enzyme Bst DNA polymerase, hỗn hợp phản ứng 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 [7, 8]. Ưu điểm vượt trội của kỹ thuật này là độ nhạy, độ đặc hiệu cao (tương đương với các phương pháp PCR), ADN làm khuôn khuếch đại không đòi hỏi độ tinh sạch cao, do đó có thể sử dụng các phương pháp tách chiết đơn giản, tiết kiệm được kinh phí, thời gian. Kết quả của phản ứng LAMP có thể được quan sát trực tiếp bằng mắt thường. Thời gian xét nghiệm nhanh (khoảng 60 phút), xét nghiệm đồng thời nhiều mẫu. Trên thế giới cũng đã có những nghiên cứu về kỹ thuật LAMP để phát hiện SLGL từ mẫu phân của các loài gia súc như trâu, bò, cừu... [9-12]. Tuy nhiên ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được công bố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển và đánh giá kỹ thuật LAMP cho việc phát hiện SLGL, hướng tới phát triển thành bộ kit dùng cho chẩn đoán nhanh SLGL từ các mẫu bệnh phẩm.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

- Mẫu chứng chuẩn: SLGL trưởng thành, trứng SLGL trưởng thành đã định loại bằng hình thái và khẳng định bằng kỹ thuật PCR được lưu giữ tại Khoa Ký sinh trùng của NIMPE.

- Mẫu nghiên cứu: mẫu được thu thập tại phòng khám chuyên ngành của NIMPE, và thu thập tại hai tỉnh Bình Định và Quảng Nam.

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

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN: ADN tổng số được tách chiết từ mẫu mô và mẫu phân lắng cặn bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA micro kit và QIAamp DNA stool mini kit của Hãng Qiagen (Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thiết kế bộ mồi LAMP: mồi cho phản ứng LAMP được thiết kế trên vùng gen ITS2 sử dụng phần mềm chuyên dụng thiết kế mồi là phần mềm Primer Explorer v.5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Đánh giá hiệu quả nhân bản và tính đặc hiệu của mồi với tác nhân cần nhân bản.

Khảo sát và tối ưu hóa phản ứng LAMP: các thông số cần được khảo sát tối ưu hóa trong phản ứng LAMP là nồng độ Mg^{2+} , nhiệt độ hoạt động của bộ mồi, thời gian phản ứng, chất chỉ thị màu dùng để quan sát phát hiện sản phẩm LAMP và độ nhạy (ngưỡng phát hiện) của hệ mồi thiết kế. $MgSO_4$ được khảo sát ở các nồng độ 4, 6 và 8 mM. Phản ứng LAMP được thực hiện ở dải nhiệt độ từ 60 đến 65°C, sử dụng chất chỉ thị màu MG với các nồng độ 0,012, 0,008, 0,004 và 0,001%. Thời gian thực hiện phản ứng LAMP được khảo sát ở 40 và 60 phút. Tiêu chí đánh giá lựa chọn các thông số dựa vào việc quan sát sản phẩm LAMP trên gel agarose 2% và sự chuyển màu dung dịch trong các ống mẫu âm và dương sau phản ứng.

Độ nhạy của bộ mồi được xác định bằng cách thực hiện phản ứng LAMP với nền mẫu là dãy nồng độ ADN pha loãng bậc 10 liên tiếp từ plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen ITS2 đặc trưng của SLGL. Nồng độ ADN thấp nhất mà tại đó có sản phẩm khuếch đại sau phản ứng LAMP chính là ngưỡng phát hiện, hay độ nhạy của phản ứng.

Kết quả

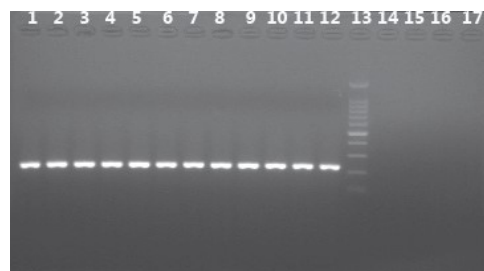
Mồi và thiết kế mồi

Kết quả bộ mồi thu được có trình tự được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi LAMP thiết kế để chẩn đoán SLGL.

TT	Tên mồi	Trình tự mồi	Chiều dài mồi (bp)	Nhiệt độ nóng chảy T_m (°C)	Tỷ lệ % GC	5'dG	3'dG
1	F3	GGTTGGACTGATAACC TGG	19	56,50	53	-5,61	-5,84
2	B3	CAAGCCACGACTTTT GG	18	55,96	50	-5,85	-4,28
3	FIP	GCTCTTCATCGACACA CGAG-CTTTGACCATAC GTACAACTCT	42				
4	BIP	TGCTTTGAACATCGACA TCTTGAAC-AGTTTATAA GCCGACCCTC	44				
5	LB	TTAGCCTGTGGCCACGC	17	61,63	65	-4,93	-7,18

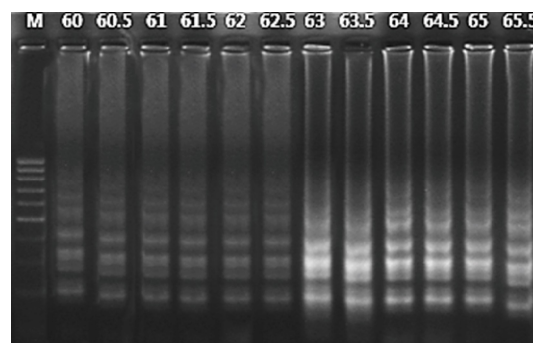
Thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi F3 và B3 trong bộ mồi LAMP với nền mẫu ADN tách chiết từ SLGL, sản lá gan nhỏ, sản lá ruột nhỏ và giun đầu gai để xác định tính đặc hiệu của bộ mồi. Sản phẩm PCR thu được bằng có kích thước 228 bp đối với các mẫu ADN tách chiết từ SLGL, không có sản phẩm khuếch đại ở các mẫu ADN tách chiết từ các loại giun sản còn lại (hình 1).



Hình 1. Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi F3-B3. Làn 1-4: mẫu SLGL *F. gigantica* trưởng thành; làn 5-8: mẫu SLGL *F. hepatica* trưởng thành; làn 9, 10: mẫu trứng SLGL *F. gigantica*; làn 11, 12: mẫu trứng SLGL *F. hepatica*; làn 13: thang chuẩn ADN 100 bp; làn 14: chứng âm; làn 15: mẫu sản lá ruột nhỏ; làn 16: mẫu sản lá gan nhỏ; làn 17: mẫu giun đầu gai.

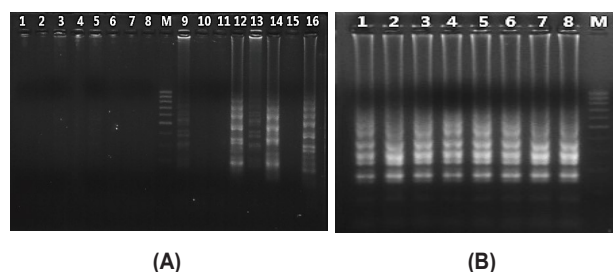
Khảo sát và tối ưu hóa phản ứng LAMP

Nhiệt độ của phản ứng LAMP được tiến hành khảo sát từ 60 đến 65,5°C. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy ở nhiệt độ 63°C sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất (hình 2).



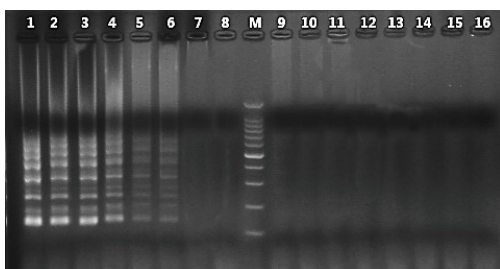
Hình 2. Sản phẩm LAMP khảo sát ở dải nhiệt độ 60-65,5°C.

Khi khảo sát nồng độ $MgSO_4$, chúng tôi tiến hành các phản ứng ở cùng nhiệt độ 63°C, thành phần các chất tham gia phản ứng là như nhau, chỉ khác biệt về nồng độ Mg^{2+} (4, 6 và 8 mM). Kết quả được đánh giá thông qua điện di sản phẩm trên gel agarose 2% (hình 3A, B), Mg^{2+} ở nồng độ 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định.



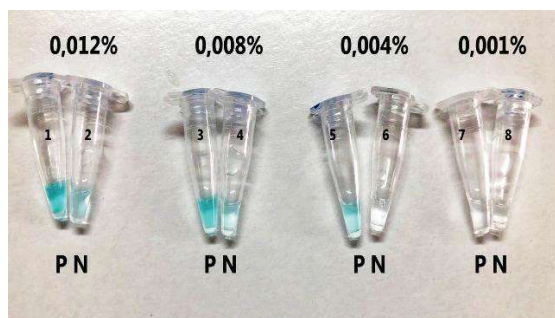
Hình 3. Sản phẩm LAMP ở nồng độ khác nhau. (A) Nồng độ 4 mM (làn 1-8) và 6 mM (làn 10-16); (B) Nồng độ 8 mM.

Khảo sát thời gian tối thiểu thực hiện phản ứng LAMP ở 40 và 60 phút, các thành phần phản ứng: ADN khuôn, môi, đệm phản ứng, nồng độ Mg^{2+} 8 mM... và các điều kiện khác (điều kiện về thiết bị...) giữ nguyên và đồng nhất, chỉ thay đổi thời gian thực hiện phản ứng. Do mong muốn giảm thiểu thời gian phản ứng nên trong nghiên cứu này chúng tôi không tiến hành thực nghiệm ở các khoảng thời gian dài hơn 60 phút. Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để khuếch đại ADN trong phản ứng LAMP là 60 phút (hình 4).



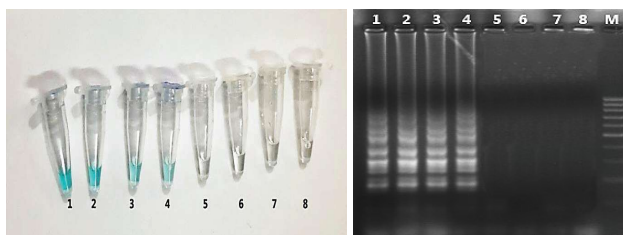
Hình 4. Sản phẩm LAMP sau thời gian phản ứng 40 và 60 phút. Làn 1-8: sản phẩm LAMP từ mẫu mô và trứng SLGL sau 60 phút; làn 9-16: sản phẩm LAMP từ mẫu mô và trứng SLGL sau 40 phút.

Khảo sát lựa chọn nồng độ MG với 4 nồng độ 0,012, 0,008, 0,004 và 0,001%. 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 5).



Hình 5. Hình ảnh màu của các ống sau phản ứng. Ống 1-P, 2-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,012%; ống 3-P, 4-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,008%; ống 5-P, 6-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,004%; ống 7-P, 8-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,001%.

Để xác định ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP, chúng tôi thực hiện phản ứng LAMP ở điều kiện 63°C, nồng độ Mg^{2+} 8 mM trong 60 phút với mẫu thêm chuẩn có dãy nồng độ ADN từ 10^{-6} đến 10^{-11} ng/μl. Kết quả cho thấy, ngưỡng phát hiện của bộ môi đạt 10^{-9} ng/μl (hình 6).



Hình 6. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ môi LAMP. 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.

Thảo luận

Môi và thiết kế môi LAMP

50 trình tự gen ITS2 của 2 loài *F. gigantica*, *F. hepatica* (mỗi loài 25 trình tự) trên ngân hàng dữ liệu NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) đã được tải về và sử dụng phần mềm MEGA 7 với tính năng Clustal W để sắp giống các trình tự của 2 loài nhằm tìm ra vùng bảo tồn đặc trưng cho giống *Fasciola*. Kết quả chúng tôi thu được đoạn trình tự bảo tồn cho giống *Fasciola* có kích thước 461 bp. Vùng trình tự này được tải lên phần mềm trực tuyến Primer Explorer v.5 (Eiken, Nhật Bản) để thiết kế và lựa chọn bộ môi dựa trên một số tiêu chí sau: độ dài đoạn khuếch đại dao động quanh khoảng 200 bp, tính bền vững ở đầu các môi: đầu 3' của các môi F2/B2, F3/B3, LF/LB và đầu 5' của F1c/B1c được thiết kế với năng lượng tự do $\Delta G \leq -4$ kcal/mol. Thành phần GC trong môi chiếm 40-65%...

Qua bảng 1 cho thấy, bộ môi thiết kế đáp ứng đủ các điều kiện đề ra của một hệ môi LAMP. Tính đặc hiệu của bộ môi được khảo sát bằng cả lý thuyết và thực nghiệm. Để khẳng định sản phẩm PCR khuếch đại bằng bộ môi đúng là trình tự của giống *Fasciola* spp., chúng tôi sử dụng 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 ITS2 của SLGL được công bố trên NCBI. Để đánh giá khả năng hoạt động của bộ môi, phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3-B3 đã được thực hiện với mẫu ADN của SLGL, sản lá gan nhỏ, giun đầu gai, sản lá ruột nhỏ. Từ kết quả điện di trên gel agarose 2% cho thấy, chứng dương có vạch sản phẩm với kích thước như dự kiến (228 bp), không xuất hiện băng phụ và nhiệt độ biến tính đúng thiết kế. Chứng âm không có sản phẩm khuếch đại. Không có sự bắt cặp chéo của cặp môi với các loài khác, chứng tỏ môi hoạt động tốt, thể hiện tính đặc hiệu của hệ môi thiết kế.

Nhiệt độ của phản ứng LAMP

Nhiệt độ gắn mỗi (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 được phát triển từ PCR. Một đặc trưng của LAMP là khuếch đại ADN hiệu quả trong điều kiện đẳng nhiệt, trong đó nhiệt độ phù hợp cho phản ứng có thể dao động từ 50 đến 68°C. Trên cơ sở này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát nhiệt độ trong khoảng 60-65°C. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy, ở nhiệt độ 63°C sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất. Nhiệt độ 63°C được đánh giá là tạo điều kiện ủ mỗi và tăng cường khả năng chịu đựng các chất ức chế thường được tìm thấy trong các mẫu chẩn đoán bệnh. Đây cũng là nhiệt độ phù hợp nhất cho hoạt tính xúc tác của enzyme trong vi khuẩn so với *Bacillus* tự nhiên.

Nồng độ $MgSO_4$

Nồng độ $MgSO_4$ ảnh hưởng đến hiệu quả và tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Trong dung dịch đệm quan trọng nhất là ion Mg^{2+} làm tăng nhiệt độ nóng chảy (T_m -melting temperature) của ADN mạch đôi, tạo ra phức chất tan với dNTPs để hình thành cơ chất mà enzym polymerase có thể nhận ra, điều này rất cần thiết cho quá trình liên kết của các dNTPs. 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, chúng tôi chọn $MgSO_4$ ở 8 mM là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP.

Chất chỉ thị màu sử dụng để đọc kết quả LAMP

Có nhiều nghiên cứu đã chứng minh kỹ thuật LAMP là một kỹ thuật có độ đặc hiệu cao, độ nhạy, thời gian phản ứng ngắn và cho phép phát hiện sản phẩm khuếch đại trực quan đơn giản bằng cách quan sát độ đục, bằng thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc thuốc nhuộm chỉ thị pH. Mỗi cách thức lại có những ưu và nhược điểm riêng. Mặc dù độ đục do kết tủa trắng (magie pyrophosphate) được tạo ra sau phản ứng LAMP có thể phát hiện bằng mắt thường, nhưng nó có độ chụm ngắn (khoảng 5-10 giây) sau khi lấy mẫu ra khỏi máy ủ nhiệt. Do vậy, cách phát hiện này có thể cần một máy đo độ đục thời gian thực để có kết luận chính xác hơn. Sử dụng các thuốc nhuộm huỳnh quang như calcein hoặc SYBR Green I có giá thành cao và cần có một hệ thống đèn UV để đọc kết quả. Hơn nữa, calcein có thể kết hợp với ion Mg^{2+} gây ức chế hoạt động ADN polymerase và làm giảm độ nhạy chung của xét nghiệm. Việc bổ sung SYBR Green I

sau phản ứng có thể làm tăng khả năng tập nhiễm ADN, dẫn đến sai lệch kết quả. Chất chỉ thị màu pH Hydroxy Naphthol Blue (HNB) đã được nhiều nghiên cứu sử dụng để phát hiện sản phẩm của LAMP, tuy nhiên sự khác biệt giữa màu ở những mẫu dương tính là màu xanh lam và tím tương ứng ở mẫu âm tính là chưa rõ ràng. Gần đây, chất chỉ thị màu MG đã được sử dụng thành công như là một chất chỉ thị nhạy với pH để phát hiện các sản phẩm LAMP. Sự thay đổi màu sắc của MG (dạng cation) phụ thuộc vào pH của dung dịch (pH<2: vàng, pH=3-9: xanh lam, pH>10: không màu). Bước sóng hấp thụ cho MG là 621 nm. Trong xét nghiệm LAMP-MG, các mẫu dương tính và âm tính dễ dàng được phân biệt bằng mắt thường là màu xanh nhạt và không màu, tương ứng [13].

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 tập nhiễm giữa các mẫu. Ưu điểm của xét nghiệm LAMP-MG có thể cải thiện và khắc phục những hạn chế từ các phát hiện LAMP khác như đã đề cập ở trên. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn MG làm chất chỉ thị màu để đọc kết quả sau phản ứng LAMP. Các nồng độ MG được khảo sát là 0,012, 0,008, 0,004 và 0,001%. Kết quả cho thấy, có sự tương đồng 100% giữa 3 người quan sát và kết luận nồng độ MG 0,004% là nồng độ tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính. Nồng độ MG cao hơn dẫn đến sự gia tăng dương tính giả, nồng độ MG thấp sẽ không thể phân biệt được mẫu âm và mẫu dương. Màu xanh lam ở các ống mẫu dương tính sau phản ứng vẫn còn nguyên màu cho đến tối đa 6 tuần, ở điều kiện nhiệt độ phòng. Thời gian sau 6 tuần không được khảo sát ở nghiên cứu này.

Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP

Trong nghiên cứu này, ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP là 10^{-9} ng/phản ứng, tương đương với 0,294 bản sao/phản ứng. Ngoài ra, chúng tôi cũng tiến hành thử nghiệm ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP với bộ môi tự thiết kế trên đây 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. Ngưỡng phát hiện này tương đương, thậm chí tốt hơn so với các nghiên cứu khác của các tác giả trên thế giới với ngưỡng phát hiện từ 10^{-3} [12] đến 10^{-5} ng [10]. Đồng thời, kỹ thuật LAMP cũng cho kết quả tốt với khả năng phát hiện ở ngưỡng rất thấp khi tiến hành trên các mẫu giả định (bổ sung 5 trứng SLGL/200 mg phân) và trên các mẫu lâm sàng thu được từ bệnh nhân tại phòng khám chuyên ngành của NIMPE (với mật độ trứng là 1 trứng/200 mg mẫu lắng cặn).

Kết luận

Bộ mồi thiết kế trong nghiên cứu hoạt động tốt, có tính đặc hiệu cao với SLGL *Fasciola* spp., không có sự bắt cặp chéo với các loài sán khác. Kết quả tối ưu của phản ứng LAMP chẩn đoán SLGL được tóm tắt như sau:

Các yếu tố	Điều kiện tối ưu
Nồng độ Mg ²⁺	8 mM
Nhiệt độ phản ứng	63°C
Thời gian phản ứng	60 phút
Chất chỉ thị màu	MG 0,004%
Ngưỡng phát hiện	10 ⁻⁹ ng/μl ADN

Sản phẩm LAMP có thể quan sát bằng mắt thường sau khi bổ sung chất chỉ thị màu MG. Với phương pháp nhận biết này cho phép phương pháp LAMP dễ dàng được triển khai ngoài thực địa tại các cơ sở y tế. Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP trong nghiên cứu này là 10⁻⁹ ng/μl ADN, tương đương với 0,294 bản sao/phản ứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2018), who.int/foodborne_trematode_infections/fascioliasis/fascioliasis_epidemiology/en/.
- [2] A.M. Espino, C.M. Finlay (1994), "Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis", *J. Clin. Microbiol.*, **32**, pp.190-193.
- [3] A.M. Flanagan, et al. (2011), "Standardisation of a coproantigen reduction test (CRT) protocol for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*", *Veterinary Parasitology*, **176**, pp.34-42.
- [4] M.M. Hassan, et al. (2001), "Evaluation of circulating *Fasciola* antigens in specific diagnosis of fascioliasis", *J. Egypt Soc. Parasitol.*, **31**, pp.271-279.
- [5] M. Mezo, et al. (2004), "An ultrasensitive capture elisa for

detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3)", *Journal of Parasitology*, **90**, pp.845-852.

[6] D. Palmer, et al. (2014), "Evaluation of a copro-antigen ELISA to detect *Fasciola hepatica* infection in sheep, cattle and horses: Production animals", *Australian Veterinary Journal*, **92**, pp.357-361.

[7] T. Notomi, et al. (2015), "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects", *Journal of Microbiology*, **53(1)**, pp.1-5.

[8] T. Notomi, et al. (2000), "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", *Nucleic Acids Research*, **28(12)**, p.e63.

[9] L. Ai, et al. (2011), "Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches", *Parasites & Vectors* [online], DOI: 10.1186/1756-3305-4-101.

[10] L. Ai, et al. (2010), "Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay", *Veterinary Parasitology*, **174(3-4)**, pp.228-233.

[11] J.M. Martínez-Pérez, et al. (2012), "Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep", *Veterinary Parasitology*, **190(1-2)**, pp.80-86.

[12] M. Martínez-Valladares, F.A. Rojo-Vázquez (2016), "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions", *Parasites & Vectors*, **9(1)**, DOI: 10.1186/s13071-016-1355-2.

[13] Sarunya Tedlongthong, et al. (2017), "Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay combined with malachite green as a rapid screening test for *Candidatus Mycoplasma haemominutum* infection in cats", *ScienceAsia*, **43**, pp.354-361.