

thực hành của bà mẹ bao gồm: Trình độ học vấn, nghề nghiệp và kiến thức, thực hành.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế. Quyết định 581/QĐ-BYT** giám sát và phòng chống bệnh tay chân miệng [Internet]. 2012 [cited 22 Tháng Chín 2021]. Available at: <https://thuvienphapluat.vn/van-ban>
- Bộ Y tế. Quyết định 1003/QĐ-BYT** hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh tay chân miệng. 2012.
- Koh WM, Bogich T, Siegel K, Jin J, Chong EY, Tan CY, và c.s.** The epidemiology of hand, foot and mouth disease in Asia: a systematic review and analysis. *The Pediatric infectious disease journal.* 2016;35(10):e285.
- Trung tâm Y tế huyện Quảng Ninh.** Báo cáo công tác y tế năm 2020.
- Dương Văn Tự, Ngô Thị Nhu, Đặng Thị Vân Quý, Đinh Thị Huyền Trang.** Kiến thức, thực hành phòng chống bệnh tay chân miệng của các bà mẹ có con dưới 5 tuổi tại 3 xã huyện Minh Hóa, tỉnh Quảng Bình. 2018;5.
- Lê Thị Lan Hương.** Đánh giá kết quả can thiệp cải thiện kiến thức, thực hành phòng chống bệnh tay - chân - miệng của bà mẹ có con dưới 5 tuổi tại xã An Lão, Bình Lục, Hà Nam. 2018.
- Nữ NT.** Kiến thức, thực hành phòng chống bệnh tay chân miệng của người chăm sóc trẻ tại Bệnh viện Vinmec năm 2019 và một số yếu tố liên quan [Internet]. Available at: <https://tailieu.vn/doc>
- Nhật LĐ.** Kiến thức, thực hành về phòng bệnh tay chân miệng của bà mẹ có con dưới 5 tuổi và một số yếu tố liên quan tại 02 phường thành phố Vĩnh Long, tỉnh Vĩnh Long năm 2017. 2018;6.

## SO SÁNH QUY TRÌNH LAMP VỚI QUY TRÌNH NUÔI CẤY PHÂN LẬP PHÁT HIỆN GEN ĐỘC TỔ TYPE A, B CỦA VI KHUẨN CLOSTRIDIUM BOTULINUM TRÊN MẪU THỰC PHẨM VÀ BỆNH PHẨM LÂM SÀNG

Nguyễn Đức Trường<sup>1</sup>, Đặng Thị Thùy Dương<sup>2</sup>, Lê Huy Hoàng<sup>3</sup>, Nguyễn Thùy Trâm<sup>3</sup>, Tăng Thị Nga<sup>3</sup>, Phạm Bảo Yên<sup>4</sup>, Dương Hồng Quân<sup>5</sup>

#### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Nghiên cứu tiến hành so sánh quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) type A, B. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm trên 90 mẫu thực phẩm và bệnh phẩm lâm sàng. **Kết quả:** Sử dụng kết quả của quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố làm tiêu chuẩn để so sánh với quy trình LAMP. Kết quả nghiên cứu cho thấy số mẫu cho kết quả dương tính khi thực hiện quy trình LAMP phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum* là 12/90 (13,3%) trong khi đó quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố là 11/90 (12,2%). Độ nhạy, độ đặc hiệu và độ đúng (độ chính xác) của quy trình LAMP phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum* lần lượt là 91,6%, 100%, và 98,8%. Bên cạnh đó, tỷ lệ dương tính giả 8,33%, tỷ lệ âm tính giả 0%, đặc biệt hệ số kappa là 0,986 cho thấy mức độ đồng thuận gần như hoàn toàn giữa 2 quy trình. Ngoài ra, quy trình LAMP cho thấy nhiều ưu điểm như thời gian thực hiện nhanh hơn, tiết kiệm chi phí hơn, dễ thực hiện hơn, có thể triển khai ở tất cả các phòng xét

thực nghiệm từ nhỏ đến lớn để phát hiện độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B trong thực phẩm cũng như các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

**Từ khóa:** Độc tố botulinum; *Clostridium botulinum*; LAMP; Ngộ độc thịt

#### SUMMARY

#### COMPARISON OF LAMP TECHNIQUE WITH ISOLATION CULTURING PROCEDURE FOR TYPE A, B ISOLATION OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM GENES IN FOOD SAMPLES AND CLINICAL DISEASES

**Objectives:** The study compares the LAMP technique with the culture technique to detect type A and B toxin genes of *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*). **Subjects and research methods:** Experimental study in the laboratory tested on 90 food samples and clinical specimens. **Results:** Use the results of the isolation culture to detect the toxin gene as a standard for comparison with the LAMP procedure. The study results showed that the number of samples showing positive results when performing the LAMP procedure to detect type A and B toxin genes of *C. botulinum* bacteria was 12/90 (13,3%) while the stool culture procedure The established toxin gene was 11/90 (12,2%). The sensitivity, specificity, and accuracy (accuracy) of the LAMP procedure to detect the type A and B toxin genes of *C. botulinum* were 91.6%, 100%, and 98,8%, respectively. Besides, the false-positive rate was 8,33%, the false-negative rate was 0%, especially the kappa coefficient was 0,986, showing an almost complete consensus between the two procedures. In addition, the LAMP technique shows many advantages such as faster implementation time, more cost savings, easier to

<sup>1</sup>Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hải Dương

<sup>2</sup>Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương

<sup>3</sup>Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

<sup>4</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

<sup>5</sup>Trường Đại học Y tế công cộng

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Đức Trường

Email: [nguyenductruong.medical@gmail.com](mailto:nguyenductruong.medical@gmail.com)

Ngày nhận bài: 23.6.2022

Ngày phản biện khoa học: 12.8.2022

Ngày duyệt bài: 22.8.2022

implement, and can be deployed in all laboratories from small to large to detect type toxins. A, B of *C. botulinum* bacteria in food as well as clinical samples.

**Keywords:** Botulinum toxin; Clostridium botulinum; LAMP; Meat poisoning

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Độc tố thần kinh botulinum gây bệnh ngộ độc thịt được coi là một trong những chất độc mạnh, được tạo ra chủ yếu bởi vi khuẩn Clostridium botulinum (*C. botulinum*). Vi khuẩn này tạo ra 7 loại độc tố được kí hiệu lần lượt là type A, B, C, D, E, F, G [2]. Trong đó type A, B là 2 type thường gặp nhất [2]. Độc tố có thể xâm nhập vào cơ thể qua đường tiêu hóa, niêm mạc mắt hoặc niêm mạc đường hô hấp. Thực tế lâm sàng cho thấy bệnh ngộ độc thịt do độc tố thần kinh của *C. botulinum* mang tính cấp tính nặng, tiến triển nguy kịch rất nhanh, tỉ lệ biến chứng và tử vong rất cao [2]. Vấn đề đặt ra là cần có một quy trình nhanh và nhạy để phát hiện độc tố botulinum giúp sớm phát hiện và loại bỏ thực phẩm nhiễm độc tố, chẩn đoán nhanh ca bệnh ngộ độc thịt giảm tỉ lệ biến chứng và tử vong. Hiện nay, có bốn loại xét nghiệm chính để chẩn đoán *C. botulinum* bao gồm: xét nghiệm miễn dịch phát hiện độc tố, thử nghiệm gây chết chuột, nuôi cấy phân lập *C. botulinum* sinh độc tố và quy trình khuếch đại gen sinh độc tố. Xét nghiệm miễn dịch có ưu điểm nhanh, đơn giản nhưng độ nhạy, đặc hiệu thấp [4]; thử nghiệm gây chết chuột có độ nhạy, độ đặc hiệu cao nhưng mất công sức, thao tác phức tạp, giá thành đắt và liên quan đến vấn đề y đức do sử dụng động vật sống làm thí nghiệm [3]; nuôi cấy phân lập *C. botulinum* sinh độc tố đang được áp dụng tại các phòng xét nghiệm trọng điểm tại nước ta và là tiêu chuẩn trong việc chẩn đoán độc tố botulinum. Tuy nhiên quy trình nuôi cấy phân lập đòi hỏi nhiều chi phí để nuôi cấy kỵ khí và mất thời gian dài 4-6 ngày [1]. Do vậy các quy trình này đều chưa đáp ứng được tiêu chí chẩn đoán nhanh, chính xác ca bệnh ngộ độc do *C. botulinum*. Trong quy trình khuếch đại gen sinh độc tố, quy trình LAMP có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, thời gian chẩn đoán nhanh, đơn giản, không phức tạp và tốn kém như Polymerase Chain Reaction (PCR) - phản ứng chuỗi polymerase, Real-time Polymerase Chain Reaction (realtime PCR), do vậy có thể trở thành quy trình thường quy chẩn đoán ca bệnh ngộ độc do *C. botulinum* tại các bệnh viện ở nước ta [7]. Năm 2021, nhóm nghiên cứu do TS. Lê Huy Hoàng tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VVSDTTƯ) đã thiết lập quy trình LAMP phát hiện

nhanh gen độc tố của *C. botulinum* gây bệnh ngộ độc thịt. Đây cũng là công trình nghiên cứu đầu tiên ở nước ta ứng dụng quy trình LAMP trong chẩn đoán căn nguyên này. Để góp phần xác định độ tin cậy của quy trình LAMP, nghiên cứu này tiến hành so sánh quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B trên các mẫu thực phẩm và bệnh phẩm lâm sàng.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng.** Quy trình LAMP phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum* và quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum*.

### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 12/2021 đến tháng 06/2022. Quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B được thực hiện tại phòng vi khuẩn kỵ khí VVSDTTƯ, quy trình LAMP thực hiện tại phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ enzyme và protein, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

**2.3. Thiết kế nghiên cứu.** Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

### 2.4. Cỡ mẫu và quy trình chọn mẫu.

Nghiên cứu trên tất cả 90 mẫu thu thập được trong thời gian nghiên cứu tại VVSDTTƯ gồm 47 mẫu thực phẩm (38 mẫu mật ong, 9 mẫu pate chay) và 43 mẫu bệnh phẩm lâm sàng (phân của người bệnh nghi nhiễm độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B).

**2.5. Vật liệu, hóa chất nghiên cứu.** Mẫu bệnh phẩm lâm sàng (phân,), mẫu thực phẩm (mật ong, pate chay) lưu tại phòng Vi khuẩn kỵ khí VVSDTTƯ.

Sinh phẩm, hóa chất cho quy trình LAMP phát hiện độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum* gồm bộ 6 cặp mồi *C. botulinum* type A, B (PHUSA Biochem, Việt Nam), OptiGene's Isothermal Master Mixes ISO-001 (OptiGene, Anh quốc), máy LAMP Genie III (OptiGene, Anh quốc).

Sinh phẩm, hóa chất cho quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum* gồm tủ ấm nuôi cấy kỵ khí, môi trường Brain Heart Infusion (BHI), đĩa Egg York Agar (EYA), máy votex, ống falcon, dung dịch gelatin, hệ thống máy PCR hoặc Realtime PCR, bộ sinh phẩm hóa chất và vật tư tiêu hao cho quy trình PCR hoặc Realtime PCR xác định gen độc tố của vi khuẩn *C. botulinum*.

**2.6. Các thông số so sánh quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phân lập phát**

**hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn C. Botulinum.** Mỗi mẫu được phân tích bằng 2 quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố và quy trình LAMP. Trong đó, quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố là tiêu chuẩn vàng, các mẫu được coi là dương tính đúng khi quy trình nuôi cấy phát hiện

gen độc tố cho kết quả dương tính và âm tính đúng khi kết quả nuôi cấy phát hiện độc tố cho kết quả âm tính. Các thông số độ nhạy, độ chính xác, độ đặc hiệu, tỉ lệ âm tính giả, dương tính giả, hệ số Kappa của quy trình LAMP được xác định qua bảng 2x2 theo các công thức như sau:

**Bảng 1. Bảng các chỉ số đánh giá**

Kết quả xét nghiệm LAMP phát hiện độc tố của vi khuẩn C. botulinum type A, B		Kết quả nuôi cấy phân lập phát hiện độc tố của vi khuẩn C. botulinum type A, B	
		Dương tính	Âm tính
	Dương tính	Dương tính thật (a)	Dương tính giả (b)
	Âm tính	Âm tính giả (c)	Âm tính thật (d)

$$\text{Độ nhạy} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{Độ đặc hiệu} = \frac{d}{c + d}$$

$$\text{Độ đúng} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

$$\text{Tỷ lệ dương tính giả} = \frac{b}{a + b}$$

$$\text{Tỷ lệ âm tính giả} = \frac{c}{c + d}$$

Hệ số Kappa(K) được tính theo công thức:

$$K = \frac{(a + d) - [(a + b)(a + c) + (c + d)(b + d)]}{1 - [(a + b)(a + c) + (c + d)(b + d)]}$$

Dựa theo tiêu chuẩn Cohen [5], đánh giá độ phù hợp của xét nghiệm dựa trên giá trị Kappa như sau:

- 0,0-0,2 Mức độ đồng thuận ít
- 0,2-0,4 Mức độ đồng thuận nhẹ
- 0,4-0,6 Mức độ đồng thuận trung bình
- 0,6-0,8 Mức độ đồng thuận chặt chẽ
- 0,8-1,0 Mức độ đồng thuận gần như hoàn toàn

**2.7. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu**

**2.7.1. Quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện độc tố của vi khuẩn C. botulinum type A, B.**

Quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện độc tố của vi khuẩn C. botulinum type A, B gồm 2 bước nuôi cấy phân lập và PCR đa môi phát hiện gen độc tố của vi khuẩn C. botulinum type A, B.

Nuôi cấy phân lập vi khuẩn C. botulinum

Mẫu thịt hộp, pate chay: lấy 1gam thực phẩm (nghiền nhỏ bằng cối vô trùng hoặc dùng que tre dầm nát) cho vào ống falcon 15ml, bổ sung dung dịch gelatin cho ngập thực phẩm, ngoáy đều để đồng nhất mẫu. Bổ sung 10ml môi trường Brain Heart Infusion (BHI) (tỉ lệ 1/10) bằng pipet nhựa vô trùng, tránh bọt khí trong môi trường. Ủ ống mẫu trong bể ổn nhiệt 70°C/10 phút. Ủ trong tủ kỵ khí ở 25°C trong 4 ngày, sau đó li tâm 12.000 vòng/10 phút, lấy 100µl cặn cấy trải trên đĩa Egg

York Agar (EYA). Ủ các đĩa trong tủ kỵ khí ở 25°C/48 giờ.

Mẫu bệnh phẩm phân: Lấy 1g phân cho vào ống eppendorf, bổ sung cồn tuyệt đối theo tỉ lệ 1:1, vortex kĩ để nhiệt độ phòng 30 phút, hút 100µl vào 10ml CMM có 0,3% glucose; ủ kỵ khí ở nhiệt độ 30°C/5-7 ngày. Hàng ngày kiểm tra nếu ống CMM nào đục thì cấy chuyển 10 µl bằng cách trải đều trên 1 đĩa EYA. Ủ kỵ khí 30°C/1-2 ngày.

Đọc kết quả: Nhặt khuẩn lạc bề mặt thô ráp, lipase dương tính, bờ không đều cấy chuyển sang đĩa EYA đồng thời tách ADN bằng quy trình nhiệt để chạy PCR đa môi phát hiện gen độc tố type A, B. Kỹ thuật PCR đa môi phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn C. botulinum

Dịch ADN thu được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR đa môi theo quy trình của phòng Vi khuẩn kỵ khí VVSDTTU. Hai cặp môi được sử dụng theo tiêu chuẩn quốc gia 11395:2016 về vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm là BoNT/A với với 2 môi gồm môi xuôi (Bot Af: 5'-AGCTA CGGAGGCAGCTATGTT-3') và môi ngược (Bot Ar: 5'-CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG-3') để phát hiện gen sinh độc tố A và BoNT/B với hai môi gồm môi xuôi (Bot Bf: 5'-CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA-3') và môi ngược (Bot Br: 5'-CTTGCGCCTTTGTTTTCTT G-3') để phát hiện gen sinh độc tố B. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt của phản ứng: 94°C (5 phút), 35 chu kì lặp lại gồm: 94°C (30 giây), 60°C (30 giây), 72°C (1 phút), 72°C (3 phút), giữ 15°C. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose 2% .

**2.7.2. Kỹ thuật LAMP phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn C. botulinum**

Quy trình LAMP phát hiện gen độc tố của vi khuẩn C. botulinum type A, B trong nghiên cứu gồm 2 bước tách chiết tách chiết ADN của vi khuẩn C. botulinum từ mẫu thực phẩm và lâm sàng sử dụng bộ kit thương mại QIAmpADN stool

Mini kit của hãng Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm ADN thu được sau tách chiết được dùng làm khuôn để chuẩn bị cho phản ứng LAMP phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum* sử dụng trình tự mỗi của tác giả Sakuma và cộng sự (2009) [8] (Bảng 2). Thành phần phản ứng LAMP phát hiện gan độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum* bao gồm 9,00µl OptiGene's Isothermal Master Mixes ISO-001 (OptiGene, Anh quốc); 0,29µl BoNT A/B

F3 (5pMol); 0,29µl BoNT A/B B3(5pMol); 0,14µl BoNT A/B LB (10pMol); 0,14µl BoNT A/B LF(10pMol); 0,57µl BoNT A/B BIP (20pMol); 0,57µl BoNT A/B FIP(20pMol) và 2,00µl ADN khuôn (Phản ứng LAMP được khuếch đại đẳng nhiệt và đọc kết quả trên máy Genie III ở nhiệt độ 65°C trong 30 phút, kết quả được phân tích trực tiếp trên máy máy Genie III hoặc phân tích trên máy tính bằng phần mềm Genie explorer v2.0.7.11 của nhà xuất suất OptiGene's.

**Bảng 2. Trình tự mỗi đặc hiệu của phản ứng LAMP phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B**

Gen đích	Tên mỗi	Trình tự mỗi (5'-3')	Kích thước sản phẩm LAMP (bp)
BoNT A	BoNT A (F3)	5'-TCAATACATTAGATTTAGCCCA-3'	250
	BoNT A (BIP)	5'-AGCACATGAACTTATACATGCTGGATTT TGCTTACTTCTAACCCACTCA-3'	
	BoNT A (B3)	5'-CCCAAATGTTCTAAGTTCCT-3'	
	BoNT A (FIP)	5'-GTAGCAAATTTGCCTGCACCTAAAATTT TCATTTGGTTTTGAGGAGTCA-3'	
	BoNT A (LB)	5'-GCAATTAATCCAAATAGGGTTTT-3'	
	BoNT A (LF)	5'-GAGGATTTGTATCAACTTCAA-3'	
BoNT B	BoNTB (F3)	5'-GCCAGTTTTAAATGAAAATGAGAC-3'	240
	BoNTB (BIP)	5'-TGTTCAAGAAAACAAAGGCGCAATTTT TAAGTTCATGCATTAATATCAAGGC-3'	
	BoNTB (B3)	5'-CTACTTTAATGCCATATAATCCATG-3'	
	BoNTB (FIP)	5'-CGCTTACATATTCTGGTTTTAATCATTT TGCATCAAGGGA-3'	
	BoNTB (LB)	5'-GTATATTTAATAGACGTGGATAT-3'	
	BoNTB (LF)	5'-GCATTATACCCCGAAGCCT-3'	

**2.8. Quy trình thu thập số liệu.** Số liệu nghiên cứu được ghi chép theo bộ công cụ thu thập số liệu của thí nghiệm.

**2.9. Quy trình phân tích số liệu.** Các thí nghiệm LAMP được thực hiện trên máy genie III kết nối với máy tính, số liệu được phân tích trực tiếp bằng phần mềm Genie explorer v2.0.7.11 đi kèm máy. Tính độ nhạy, độ đặc hiệu, độ đúng, tỷ lệ âm tính giả, dương tính giả, hệ số Kappa theo công thức và bảng tính 2x2.

**2.10. Đạo đức trong nghiên cứu.** Đề tài này nằm trong khuôn khổ đề tài "Nghiên cứu sản xuất bộ kit LAMP phát hiện nhanh gen độc tố của *Clostridium botulinum* gây bệnh ngộ độc thịt" mã số 02/2021/ĐX do quỹ khoa học và công nghệ Quốc gia tài trợ. Nghiên cứu tuân thủ đầy đủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học theo quy định của Bộ Y tế.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**Bảng 3. Bảng kết quả so sánh quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện độc tố type A của vi khuẩn *C. botulinum***

<b>Kết quả nuôi cấy phân lập phát</b>	<b>Tổng</b>
---------------------------------------	-------------

**3.1. Kết quả xét nghiệm *C. botulinum* type A, B trên quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố.** Kết quả nghiên cứu trên 90 mẫu cho thấy, số mẫu dương tính khi thực hiện với quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố type A và type B của vi khuẩn *C. botulinum* cùng là 11/90 (12,2%), số mẫu cho kết quả dương tính khi thực hiện quy trình LAMP phát hiện gen độc tố type A và type B của vi khuẩn *C. botulinum* cùng là 12/90 (13,3%). Sử dụng kết quả của quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc là tiêu chuẩn vàng để so sánh với quy trình LAMP. Độ nhạy của cả hai quy trình LAMP phát hiện gen độc tố type A và B của vi khuẩn *C. botulinum* so với quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố là 91,6%, độ đặc hiệu là 100%, độ đúng là 98,8% tỷ lệ dương tính giả là 8,33%, tỷ lệ âm tính giả là 0%. Hệ số tương đồng giữa 2 quy trình là 0,986 (mức độ phù hợp gần như hoàn toàn).

Kết quả xét nghiệm LAMP phát hiện độc tố của vi khuẩn <i>C. botulinum</i> type A và type B	Dương tính	Hiện độc tố của vi khuẩn <i>C. botulinum</i> type A và type B		
		Dương tính	Âm tính	
	Âm tính	11	01	12
	Âm tính	0	78	78
<b>Tổng</b>		11	79	90
Độ nhạy của LAMP (%)		91,6%		
Độ đặc hiệu của LAMP (%)		100%		
Độ đúng (%)		98,8%		
Tỷ lệ dương tính giả của LAMP (%)		8,33%		
Tỷ lệ âm tính giả (%)		0%		
Hệ số Kappa		0,986		

**3.2. So sánh khả năng áp dụng của quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố.** Dựa trên cơ sở điều kiện thực nghiệm rút ra từ nghiên cứu khi thực hiện 2 quy trình LAMP và quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum*. Kết quả so sánh về khả năng áp dụng của quy trình như sau (Bảng 4).

**Bảng 4. Bảng kết quả so sánh khả năng áp dụng quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện độc tố type B của vi khuẩn *C. botulinum***

Vấn đề so sánh	Quy trình LAMP phát hiện gen độc tố của vi khuẩn <i>C. botulinum</i> type A, B	Quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố của vi khuẩn <i>C. botulinum</i> type A, B
Máy móc trang thiết bị	Máy LAMP Genie III (OptiGene, Anh quốc), tủ ATSH (an toàn sinh học) cấp 2, tủ sạch	Tủ ấm kỵ khí, máy luân nhiệt PCR hoặc Realtime PCR, tủ ATSH cấp 2, tủ sạch
Điều kiện của phản ứng/quy trình	Phản ứng được thực hiện trong điều kiện đẳng nhiệt ở 65°C trong 30 phút	Tủ ấm, tủ kỵ khí, máy luân nhiệt PCR (cồng kềnh, đắt tiền) cho quá trình nuôi cấy và định danh vi khuẩn
Thời gian hoàn thành	90 phút	4-6 ngày hoặc lâu hơn
Phương pháp phát hiện	Kết quả đọc trực tiếp trên máy LAMP Genie III (OptiGene, Anh quốc)	Kết quả được phát hiện bằng cách kiểm tra sự xuất hiện khuẩn lạc bằng mắt thường, sau đó tiến hành quy trình PCR xác định căn nguyên <i>C. botulinum</i> trên những mẫu ADN tách chiết từ khuẩn lạc
Độ đặc hiệu và độ nhạy	Độ đặc hiệu và độ nhạy cao	Độ nhạy cao nhưng độ đặc hiệu thấp hơn so với phương pháp LAMP
Yêu cầu tinh sạch mẫu ADN hoặc yêu cầu mẫu, các yếu tố ức chế	Không cần thiết yêu cầu tinh sạch mẫu ADN do ít bị ảnh hưởng	Yêu cầu cao về môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy nhằm đảm bảo cho khả năng sống và phát triển của vi khuẩn kỵ khí ( <i>C. botulinum</i> )
Yêu cầu về con người	Không yêu cầu cao	Yêu cầu cao về thao tác, kỹ thuật
Khả năng áp dụng tại thực địa hoặc các phòng y tế vừa và nhỏ	Rất dễ triển khai áp dụng	Khó triển khai áp dụng
Giá thành xét nghiệm	300-500 nghìn đồng/mẫu	Trên 1 triệu đồng/mẫu

#### IV. BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu trên 90 mẫu của chúng tôi cho thấy quy trình LAMP phát hiện vi khuẩn *C. botulinum* type A và quy trình LAMP phát hiện vi khuẩn *C. botulinum* type B có kết quả giống nhau. Cụ thể về tỷ lệ mẫu dương tính khi thực hiện quy trình LAMP phát hiện vi khuẩn *C. botulinum* type A, B là 12/90 (13.3%) so với quy

trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố type A, B là 11/90 (12.2%). Độ nhạy, độ đặc hiệu và độ đúng của quy trình LAMP (>90%), độ nhạy, độ đặc hiệu, độ đúng của quy trình LAMP phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B lần lượt là 91.6%, 100%, 98.8%. Tỷ lệ dương tính giả và âm tính giả rất thấp (< 10%) lần lượt là 8.33% và 0%. Nghiên cứu của chúng

tôi có kết quả hoàn toàn tương đồng báo cáo của Yufei Chen 2021 [6] với độ đặc hiệu của quy trình LAMP là 100%. Tuy nhiên theo báo cáo của Yufei Chen 2021 [6] nghiên cứu chỉ được thực hiện trên các mẫu thực phẩm chưa tiếp cận thực hiện được trên các mẫu lâm sàng thực tế như trong nghiên cứu của chúng tôi. Với hệ số tương quan ( $K=0.986$ ) nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra mức độ đồng thuận gần như hoàn toàn so với quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B trên cả mẫu thực phẩm và lâm sàng.

Có 1 mẫu phân dương tính với cả 2 type A, B và 1 mẫu phân dương tính với type B được phát hiện bằng quy trình LAMP nhưng lại âm tính với quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố. Kết quả này có thể được giải thích bằng việc mẫu chỉ mang xác của vi khuẩn (chỉ chứa vật liệu di truyền của vi khuẩn) nguyên nhân do vi khuẩn đã chết trong quá trình vận chuyển, xử lý mẫu. Chúng tôi có loại trừ khả năng kết quả dương tính giả của quy trình LAMP bằng cách chúng tôi đã chia nhỏ mẫu gốc, thực hiện lại từ khâu tách chiết và tiến hành chạy lặp lại quy trình LAMP trên các mẫu chia nhỏ, kết quả cho thấy các mẫu chia nhỏ đều cho kết quả dương tính. Kết quả này có thể định hướng rằng mẫu dương tính với quy trình LAMP và âm tính với quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố thực sự mang độc tố của vi khuẩn.

Vi khuẩn *C. botulinum* là tác nhân gây ngộ độc thực phẩm nguy hiểm, gây nên bệnh ngộ độc thịt, có thể dẫn đến tử vong cho người nhiễm khuẩn. Để kịp thời ngăn chặn những hậu quả nghiêm trọng khi nhiễm phải độc tố của vi khuẩn *C. botulinum*, cần phát triển một phương pháp phát hiện nhanh chóng và hiệu quả. Quy trình nuôi cấy phát hiện độc tố vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng cho chẩn đoán nhiễm trùng do *C. botulinum*, cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhưng tốn kém và mất nhiều thời gian. Với việc đòi hỏi về điều kiện trong nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí rất phức tạp từ thao tác kỹ thuật đến những đòi hỏi rất cao về điều kiện môi trường, trang thiết bị cho việc nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn. Không như những quy trình nuôi cấy vi khuẩn thông thường khác, việc định danh vi khuẩn kỵ khí *C. botulinum* rất khó khăn. Sau khi nuôi cấy phân lập, do kỹ thuật viên phải thực hiện thêm quy trình tách chiết ADN từ các mẫu tăng sinh của quá trình nuôi cấy có chứa khuẩn lạc và tiến hành PCR để định danh khuẩn lạc. Tổng thời gian cho quy trình nuôi cấy phân lập phát hiện gen độc tố mất từ 4-6 ngày hoặc lâu hơn [1, 2]. Tuy nhiên thời gian xét nghiệm trung bình của

quy trình LAMP cho kết quả của 6 mẫu (bao gồm cả khâu tách chiết) chỉ là 90 phút hoặc thấp hơn. Chính vì vậy quy trình LAMP cho thấy khả năng vượt trội về thời gian với việc phát hiện nhanh chóng và hiệu quả giúp chúng ta kịp thời ngăn chặn những hậu quả nghiêm trọng khi nhiễm phải độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B.

Khó khăn trong thực hiện kỹ thuật và giá thành cao trong chẩn đoán vi khuẩn kỵ khí đặc biệt là tác nhân *C. botulinum* cũng là một trở ngại hiện nay. Việc nuôi cấy khó khăn, tốn kém về cả công sức và sinh phẩm - vật tư tiêu hao (bao gồm cho quy trình nuôi cấy phân lập và PCR xác định độc tố). Thông tư 14/2019/TT-BYT ngày 05/07/2019 - áp dụng từ 01/01/2020 theo đó giá áp dụng cho phương pháp nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí và định danh là rất cao (1.314.000 đồng/ mẫu). Thực tế cho thấy hiện nay rất ít cơ sở y tế, phòng xét nghiệm có đủ khả năng thực hiện xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí. Về giá thành cho một xét nghiệm LAMP như trong nghiên cứu của chúng tôi sử dụng từ 300 -500 nghìn đồng/mẫu bao gồm trang thiết bị đơn giản và hóa chất (tách chiết ADN của vi khuẩn trên kit thương mại QIAmp DNA stool Mini kit (Qiagen, Đức); bộ môi cho phản ứng LAMP đặt từ PHUSA Biochem, Việt Nam; master mix OptiGene's Isothermal Master Mixes ISO-001 (OptiGene, Anh quốc)). Như vậy quy trình LAMP của chúng tôi vượt trội hoàn toàn về giá thành và khả năng áp dụng so với quy trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B.

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng quy trình LAMP mà chúng tôi phát triển tại phòng thí nghiệm có thời gian thực hiện nhanh, đơn giản, ít tốn kém và phù hợp với hầu hết các phòng xét nghiệm, các cơ sở y tế, các trung tâm kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm hay ngay cả thực địa nơi đang xảy ra ngộ độc giúp phát hiện và sớm loại bỏ thực phẩm nhiễm độc tố *C. botulinum* type A, B giảm số ca ngộ độc thịt, chẩn đoán nhanh ca ngộ độc thịt giảm tỉ lệ biến chứng và tử vong. Vì vậy, quy trình LAMP trong nghiên cứu của chúng tôi mang ý nghĩa thực tiễn khoa học quan trọng trong việc phát hiện nhanh độc tố type A, B của vi khuẩn *C. botulinum*.

## V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy kết quả xác định sự có mặt của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B bằng quy trình LAMP với quy trình nuôi cấy phân lập trên cùng các mẫu thực phẩm và bệnh phẩm lâm sàng có sự tương đồng rất lớn. Độ nhạy, độ đặc hiệu, độ đúng của quy trình LAMP so với quy

trình nuôi cấy phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *C.botulinum* type A, B rất cao, tỷ lệ âm tính giả, dương tính giả rất thấp. Quy trình LAMP cho thấy khả năng chẩn đoán chính xác, thực hiện nhanh chóng, dễ triển khai trong chẩn đoán độc tố của vi khuẩn *C.botulinum* type A, B.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Thị Thủy Dương, Bùi Thị Việt Hà, và Vũ Thị Thu Hường (2016)**, So sánh ba phương pháp xét nghiệm chẩn đoán nhiễm trùng do *Clostridium difficile* tại Việt Nam: miễn dịch phát hiện độc tố, Nested PCR và nuôi cấy *Clostridium difficile* sinh độc tố, TẠP CHÍ Y HỌC DỰ PHÒNG, số 15(XXVI), tr. 188.
2. **Tăng Thị Nga, Vũ Thị Mai Hiền, Đặng Đức Anh, Phạm Bảo Yên, Nguyễn Thị Hương Giang, Đoàn Thu Trà, Nguyễn Trung Nguyên, Vũ Duy Nhân, và Nguyễn Thùy Trâm (2021)**, Phát hiện *Clostridium botulinum* trong mật ong, đất và thực phẩm đóng hộp tự chế biến ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam năm 2019-2020, Tạp chí Y học Dự phòng, số 31(2), tr. 35-41.
3. **Petr Capek và Tobin J Dickerson (2010)**, Sensing the deadliest toxin: technologies for botulinum neurotoxin detection, *Toxins*, số 2(1), tr. 24-53.
4. **Andreja Rajkovic, Benaissa El Moualij, Youssef Fikri, Katelijne Dierick, Willy Zorzi, Ernst Heinen, Ahu Uner, và Mieke Uyttendaele (2012)**, Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A and B in milk by ELISA and immuno-PCR at higher sensitivity than mouse bio-assay, *Food Analytical Methods*, số 5(3), tr. 319-326.
5. **Susana M Vieira, Uzay Kaymak, và João MC Sousa**. Cohen's kappa coefficient as a performance measure for feature selection. in International Conference on Fuzzy Systems. 2010. IEEE.
6. **Miia Lindström, Riikka Keto, Annukka Markkula, Mari Nevas, Sebastian Hiem, và Hannu Korkeala (2001)**, Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material, *Applied and environmental microbiology*, số 67(12), tr. 5694-5699.
7. **Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, và Tetsu Hase (2000)**, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic acids research*, số 28(12), tr. e63-e63.
8. **T Sakuma, Y Kurosaki, Y Fujinami, T Takizawa, và J Yasuda (2009)**, Rapid and simple detection of *Clostridium botulinum* types A and B by loop-mediated isothermal amplification, *Journal of applied microbiology*, số 106(4), tr. 1252-1259.

## KHẢO SÁT TỶ LỆ BỆNH LÝ HUYẾT SẮC TỔ TRÊN NGƯỜI TRƯỞNG THÀNH CÓ THAY ĐỔI CHỈ SỐ MÁU NGOẠI VI

Nguyễn Văn Chính<sup>1</sup>, Vũ Hải Nam<sup>1</sup>, Lê Văn Chương<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Thalassemia và bệnh huyết sắc tố là bệnh nằm trong nhóm các rối loạn di truyền của dòng hồng cầu phổ biến trên thế giới. Việc phát hiện người mang gen thalassemia thể nhẹ hay bất thường huyết sắc tố ở người trưởng thành có thay đổi chỉ số hồng cầu, góp phần làm giảm gánh nặng do bệnh gây ra. **Mục tiêu:** Xác định tỷ lệ bệnh lý huyết sắc tố, tỷ lệ mang gene bệnh thalassemia ở người trưởng thành có biểu hiện thay đổi về chỉ số máu ngoại vi. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu cắt ngang mô tả, 200 bệnh nhân có bất thường về chỉ số máu ngoại vi được tiến hành điện di hemoglobin để phát hiện bệnh lý huyết sắc tố. 30 bệnh nhân trong nhóm chưa phát hiện bệnh bằng kỹ thuật điện di hemoglobin được giải trình tự gen nhằm xác định đột biến gen thalassemia. **Kết quả:** Tỷ lệ bệnh lý huyết sắc tố và mang gen bệnh thalassemia được phát hiện bằng kỹ thuật điện di hemoglobin là 39,5% ( $\alpha$  thalassemia: 1,0%;  $\beta$

thalassemia: 19,0%, HbE: 4,5%;  $\beta$  thalassemia + HbE: 14,5%; HbC: 0,5%). Trong nhóm điện di hemoglobin chưa phát hiện bất thường, tiến hành giải trình tự gen, kết quả phát hiện tỷ lệ mang đột biến gen  $\alpha$ ,  $\beta$  globin tăng lên 93,3% (SEA: 86,7%, SEA C.\*247>C gen  $\beta$ : 3,3%; SEA C-59C>T gen  $\beta$ : 3,3%). **Kết luận:** Tỷ lệ bệnh lý huyết sắc tố và mang gen thalassemia tương đối cao ở người có thay đổi chỉ số hồng cầu máu ngoại vi. Bằng kỹ thuật giải trình tự gen chúng tôi phát hiện được một tỷ lệ rất cao những trường hợp mang đột biến gen thalassemia thể ẩn ở nhóm người chưa phát hiện bất thường trên kết quả điện di hemoglobin.

**Từ khóa:** Bệnh lý huyết sắc tố, đột biến gen, Thalassemia, điện di hemoglobin, giải trình tự gen.

### SUMMARY

#### STUDY OF HEMOGLOBIN DISEASES IN ADULTS WHO HAVE ALTERED EXPRESSION OF PERIPHERAL BLOOD INDEX

**Background:** Hemoglobin abnormalities especially thalassemia are the most frequent genetic diseases on the world. The detection of thalassemia carriers or abnormal hemoglobin in adults with changes in erythrocyte index, contributes to reducing the burden caused by this disease. **Objectives:** To determine the ratio of hemoglobin diseases and thalassemia gene carriers in adults with altered expression of peripheral blood index. **Methods:** In a descriptive cross-sectional

<sup>1</sup>Bệnh viện 30-4, Bộ Công An

<sup>2</sup>Trung tâm Kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm y học – Đại học Y Dược TP.HCM

Chịu trách nhiệm chính: Lê Văn Chương

Email: chuongmedtech@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 28.6.2022

Ngày phản biện khoa học: 15.8.2022

Ngày duyệt bài: 26.8.2022