

QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI (NEXT GENERATION SEQUENCING) MỘT SỐ GEN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG THUỐC ĐIỀU TRỊ CỦA PLASMODIUM FALCIPARUM

Nguyễn Thị Thanh Chung¹, Nguyễn Thị Hồng Ngọc²,
Nguyễn Quang Thiệu², Nguyễn Văn Hồng², Nguyễn Thị Hương Bình²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequencing) một số gen liên quan đến tính kháng thuốc của Plasmodium falciparum. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tối ưu hóa quy trình tách chiết ADN, chuẩn hóa nồng độ và số lượng ADN đầu vào, thiết kế 2 sét mồi đặc hiệu để khuếch đại các đoạn gen có liên quan đến 14 gen kháng thuốc điều trị sốt rét và tối ưu hóa các bước thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen trên máy Miseq của hãng Illumina. Áp dụng quy trình giải trình tự toàn bộ hệ gen đã tối ưu với mẫu máu để đánh giá thông số kỹ thuật. **Kết quả:** Xây dựng và thẩm định quy trình giải trình tự toàn bộ hệ gen với một số gen liên quan đến tính kháng thuốc của Plasmodium falciparum trên máy Miseq bao gồm: tối ưu hóa được lượng mẫu đưa vào (1 giọt máu đường kính 5mm) và lượng ADN đầu vào mật độ ký sinh trùng sốt rét (100 KST/ μ L), thiết kế được 2 set mồi khuếch đại 233-265 đoạn gen liên quan đến 13-14 gen kháng thuốc với P. falciparum. Khảo sát ADN của 10 mẫu nhiễm đơn ký sinh trùng Plasmodium falciparum, đánh giá chất

lượng theo phần mềm FASTQC. **Kết luận:** Đã xây dựng và tối ưu quy trình giải trình tự toàn bộ hệ gen với một số gen liên quan đến tính kháng thuốc của Plasmodium falciparum trên máy Miseq của hãng Illumina. Áp dụng quy trình trên 10 mẫu lâm sàng đạt yêu cầu về chất lượng.

Từ khóa: Giải trình tự toàn bộ hệ gen, giải trình tự thể hệ mới, gen kháng thuốc điều trị sốt rét, mrp1, ubp-1, dhfr1, mdr1, dhr1, dhps, crt

SUMMARY

DEVELOP SOP FOR NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS) OF SOME GENES RELATED TO DRUG RESISTANCE IN PLASMODIUM FALCIPARUM

Objective: To develop a Whole Genome Sequencing process of some genes related to drug resistance in Plasmodium falciparum. **Research objects and methods:** Optimizing the DNA extraction process, standardizing the concentration and quantity of input DNA, designing 2 set specific primers to amplify gene segments related to 14 antimalarial drug resistance genes and optimizing the steps of whole genome sequencing on Miseq machine. Applying the optimized whole genome sequencing process to blood samples to evaluate technical parameters. **Results:** Develop and validating the whole genome sequencing process with some genes related to drug resistance of P. falciparum on the Illumina Miseq machine including: optimizing the amount of sample input (1 drop of blood with 5mm diameter) and the amount of input DNA with malaria parasite

¹Đại học Y khoa Vinh

²Viện Sốt rét - Ký Sinh Trùng - Côn trùng Trung Ương
Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Thanh Chung
SĐT: 0989656595

Email: chungnguyenykv@gmail.com

Ngày nhận bài: 27/8/2024

Ngày phản biện khoa học: 20/9/2024

Ngày duyệt bài: 02/10/2024

density (100 parasites/ μ L), designing 2 sets of primers to amplify 233-265 gene segments related to 13-14 drug resistance genes with *P. falciparum*. Do sequencing 10 samples single infected with *P. falciparum*, evaluating the quality by FASTQC software. **Conclusion:** Building and optimizing the whole genome sequencing process with some genes related to drug resistance of *P. falciparum* on the Illumina Miseq machine. Applying the process on 10 clinical samples adapted the quality requirements.

Keywords: Whole genome sequencing, next generation sequencing, antimalarial drug resistance genes, Pfmpr1, ubp-1, Pfdhfr1, Pfmdr1, Pfdhr1, Pfdhps, Pfcrt.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Plasmodium falciparum là tác nhân chính gây sốt rét ác tính, với tỷ lệ tử vong cao nếu không được điều trị kịp thời. Sự xuất hiện của các chủng kháng thuốc đã trở thành một thách thức lớn trong việc kiểm soát và điều trị bệnh sốt rét. Các gen liên quan đến tính kháng thuốc, như pfcrt, pfmdr1, k13, là những yếu tố quan trọng giúp xác định khả năng kháng của ký sinh trùng (KST) đối với các loại thuốc điều trị.

Mục tiêu của chính phủ Việt Nam là loại trừ sốt rét do *P. falciparum* gây ra vào năm 2025 và sốt rét do *P. vivax* gây ra vào năm 2030. Tuy nhiên, mục tiêu này cũng có nhiều thách thức chủ yếu là hiện tượng ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) kháng các liệu pháp điều trị kết hợp artemisinin hiện tại và lan rộng ở Tiểu vùng Mêkông mở rộng (GMS); năm tính của Việt Nam đã được xác định để có KSTSR kháng thuốc và đã có những tỉnh mới nghi ngờ có KSTSR kháng thuốc, cần có các công cụ mới để đánh giá sâu và đúng KST: thực trạng mắc, cấu trúc quần thể, nguồn gốc, tính kháng thuốc điều trị... Công nghệ giải trình tự thế hệ mới (Next Generation

Sequencing - NGS) có thể giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) đáp ứng được nhu cầu này.

Tuy nhiên tại Việt Nam những nghiên cứu cho việc áp dụng kỹ thuật này trên KSTSR còn ít, trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu hợp tác Nghị định thư với Đại học Vệ sinh và Y học Nhiệt đới, Luân Đôn Vương quốc Anh “**Nghiên cứu tính đa hình di truyền và kháng thuốc của Plasmodium falciparum và Plasmodium vivax bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen**” chúng tôi tiến hành chuẩn hóa, xây dựng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen tập trung vào những gen liên quan đến tính kháng thuốc đối với hai loài KSTSR nói trên.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm phòng thí nghiệm

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: tháng 01/11/2021 đến tháng 15/04/2022, tại Khoa Sinh học phân tử, Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương.

Phương pháp nghiên cứu:

Mẫu nghiên cứu: Mẫu máu thu thập tại Gia Lai đã được xác định dương tính với *P. falciparum*

Đối tượng nghiên cứu: Các đặc điểm kỹ thuật của thí nghiệm giải trình tự toàn bộ hệ gen, bao gồm: kỹ thuật tách chiết ADN trên mẫu máu giấy thấm khô; PCR khuếch đại đoạn gen cần giải trình tự; kỹ thuật tạo thư viện, kỹ thuật giải trình tự WGS.

Các bước tiến hành nghiên cứu

1. Sử dụng thông tin từ cơ sở dữ liệu của Kho dữ liệu hệ gen Plasmodium (PlasmoDB – Plasmodium Genomic Resource). Trích xuất các đoạn trình tự gen quan tâm trên bộ gen *Plasmodium falciparum* (phiên bản Pf3D7), từ đó thiết kế 2 set mồi khuếch đại 233-265 đoạn gen tương ứng với 13-14 gen liên quan đến

tính kháng thuốc bao gồm các trình tự tham chiếu Pf3D7-0112200; Pf3D7-014300; Pf3D7-0417200; Pf3D7-0523000; Pf3D7-0516500; Pf3D7-0709000; Pf3D7-08108000; Pf3D7-0813000; Pf3D7-1025000; Pf3D7-12183000; Pf3D7-1251200; Pf3D7-1235400; Pf3D7-1343700.

2. Tối ưu hóa quá trình tách chiết và đánh giá chất lượng ADN (Bộ kit Qiagen Mini kit) sử dụng số giọt máu khác nhau, đánh giá ngưỡng ADN đầu vào tối thiểu để phản ứng giải trình tự đạt hiệu quả cao nhất. Tiêu chí chất lượng cần đạt: nồng độ DNA của Plasmodium thu được từ 20-50 ng/1 phản ứng; nồng độ ADN không vượt quá 100 ng, độ tinh khiết OD260/280 từ 1,8-2,0.

3. Xác định điều kiện tối ưu của phản ứng PCR với các set môi.

4. Chuẩn bị thư viện cho phản ứng giải trình tự.

5. Giải trình trên máy Miseq; sử dụng bộ sinh phẩm NGS MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles).

6. Sử dụng phần mềm FASTQC và FASTScreen để phân tích số liệu thô, đánh giá chất lượng các kết quả giải trình tự.

7. Đánh giá lại toàn bộ quy trình với các điều kiện thử nghiệm đã tối ưu từ bước 1 đến bước 6 trên 10 mẫu lâm sàng.

Xử lý số liệu: Xử lý kết quả chuẩn hóa quy trình, bằng phần mềm Excell. Kiểm tra kết quả và đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự bằng phần mềm.

Đạo đức trong nghiên cứu: Chứng nhận chấp thuận đạo đức trong nghiên cứu y sinh, số 1096/QĐ-VSR ngày 12/08/2020 của Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương cho đề tài nghị định thư mã số NĐT.84.GB/20.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định các trình tự tham chiếu và thiết kế các sét môi

Liệt kê các gen kháng thuốc kháng các thuốc điều trị sốt rét đã và đang được sử dụng trong chương trình phòng chống sốt rét tại Việt Nam.

Bảng 1. Danh sách các gen đã được xác định liên quan đến tính kháng thuốc điều trị *P. falciparum* tại Việt Nam

TT	Gen trên NST	Tên gen	Tên thuốc	Cơ chế kháng Thuốc
1	1	Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated protein 1 (pfmrp1)	Artemisinin (ART), Mefloquine, MQ	Các đột biến và mức độ biểu hiện ảnh hưởng đến sự vận chuyển và hiệu quả của thuốc.
2	1	Ubiquitin-specific protease 1 (ubp-1)	Mefloquine, Chloroquine (CQ)	Các thay đổi trong biểu hiện có thể ảnh hưởng đến phản ứng của KST với thuốc.
3	4	Dihydrofolate reductase (dhfr)	Pyrimethamine (PYR)	Các đột biến C50R, N51I, C59R, S108N, I164L... làm giảm độ khả năng phân giải của enzyme với thuốc.
4	5	Plasmodium falciparum multidrug resistance protein 1 (pfmdr1)	Chloroquine, Amodiaquine, Mefloquine, Lumefantrine (LF)	Tăng sự khuếch đại và hiện diện enzyme phân hủy thuốc và các đột biến: N86Y, Y184F, D1246Y... ảnh hưởng đến sự vận chuyển thuốc.
5	5	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 (Eps15)	Kháng Thuốc nói chung	Đang được nghiên cứu.

TT	Gen trên NST	Tên gen	Tên thuốc	Cơ chế kháng Thuốc
6	5	Multidrug transporter (pfmdt)	Chloroquine, Mefloquine	Tham gia vào việc vận chuyển thuốc qua màng tế bào ký sinh trùng.
7	7	Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (pfcr1)	Chloroquine	Các đột biến: K76T... giảm tích lũy chloroquine trong ký sinh trùng
8	8	Kinesin family member 7 (KIC7)	Chloroquine	Thay đổi khả năng gắn kết hoặc hấp thụ chloroquine.
9	8	Dihydropteroate synthase (dhps)	Sulfadoxine (SD)	Các đột biến: A437G, K540E làm giảm độ nhạy với sulfadoxine.
10	12	Plasmodium falciparum Ca ²⁺ -ATPase 6 (pfatp6)	Artemisinin (ART)	Đang nghiên cứu
11	12	Plasmodium falciparum GTP-cyclohydrolase 1 (pfgch1)	Piperaquine (PPQ)	Sự khuếch đại và các đột biến ảnh hưởng đến độ nhạy với thuốc.
12	12	Adaptor protein complex 2, mu subunit (ap2-mu)	Artemisinin, Piperaquine	Đột biến: S160N.. liên quan đến kháng artemisinin và piperaquine, thông qua thay đổi trong quá trình nhập bào và vận chuyển thuốc.
13	12	Coronin, actin-binding protein (coronin)	Artemisinin	Các đột biến thay đổi cấu trúc protein liên kết actin, ảnh hưởng đến quá trình phân chia của KST.
14	13	Kelch 13 (pfk13)	Artemisinin	Các đột biến trong miền propeller liên quan đến kháng artemisinin.
15	13	Exonuclease (Exo)	Artemisinin	Liên quan đến kháng qua cơ chế sửa chữa DNA và ổn định bộ gen của KST
16	14	Plasmodium falciparum plasmepsin 2/3 (plasmepsin 2/3)	Piperaquine	Tăng cường sự khuếch đại gen liên quan đến kháng piperaquine.

Danh sách các trình tự gen tham chiếu phù hợp nhất từ ngân hàng gen ký sinh trùng MalariaGEN được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Danh sách trình tự tham chiếu phù hợp với các gen kháng thuốc

TT	Tên gen	Gen tham chiếu	TT	Tên gen	Gen tham chiếu
1	Pfmrp1	Pf3D7-0112200	9	Eps15	Pf3D7-1025000
2	ubp-1	Pf3D7-014300	10	Pfatp6	Pf3D7-1235400
3	dhfr	Pf3D7-0417200	11	Pfgch1	PF3D7_1213900
4	Pfmdr1	Pf3D7-0523000	12	ap2-mu	Pf3D7-1218300
5	Pfmdt	Pf3D7-0516500	13	coronin	Pf3D7-1251200
6	pfcr1	Pf3D7-0709000	14	Pfk13	Pf3D7-1343700
7	KIC7	Pf3D7-08108000	15	Exonuclease (Exo)	Pf3D7-1362500
8	Pfdhps	Pf3D7-0813000	16	Plasmepsin 2/3	Pf3D7-1408000

Sử dụng phần mềm SWGA (Selective Whole Genome Amplification) để thiết kế 2 bộ mồi (Primer set) đảm bảo để khuếch đại đoạn gen có chiều dài khoảng 3,5 Mb bao phủ toàn bộ các gen mã hóa tính kháng thuốc ở trên.

Hai sét mồi được gộp (pool) và cân bằng nồng độ để đảm bảo khuếch đại các đoạn gen theo nguyên lý: Các cặp mồi trong một sét mồi để tạo ra các sản phẩm PCR có kích thước tương tự. Độ dài của các cặp mồi từ 20 - 25 nucleotide. Nhiệt độ nóng chảy (T_m) đồng đều, dao động từ 55°C đến 65°C. Tránh các cấu trúc bậc hai như kẹp tóc hoặc tương tác mồi chéo, đặc hiệu cao đối với vùng gen mục tiêu không có vùng giàu GC hoặc giàu AT đảm bảo liên kết ổn định và đồng đều trong quá trình PCR. Mỗi cặp mồi đều có độ dài đoạn ULSO (Upstream Ligation Site Oligonucleotide – mồi liên kết phía trên) và DLSO (Downstream Ligation Site Oligonucleotide – mồi liên kết phía dưới) tương đương để cân bằng hiệu quả khuếch đại. Không chứa các đoạn poly-nucleotide dài (như AAAA hoặc GGGG), Tránh sự tương tác chéo giữa các mồi trong cùng một sét mồi.



Hình 1. Vị trí khuếch đại của các sét mồi được thiết kế khi khuếch đại hệ gen

Kết quả đã tạo ra 175 cặp mồi chia làm 02 sét với số lượng các cặp mồi tương ứng cho mỗi gen như sau

Bảng 3. Số mồi đã được thiết kế cho các gen kháng thuốc với *P. falciparum*

STT	Gen	Số lượng cặp mồi trong mỗi sét mồi		STT	Gen	Số lượng cặp mồi trong mỗi sét mồi	
		Sét mồi 1	Sét mồi 2			Sét mồi 1	Sét mồi 2
1	ubp1	16	12	9	plasmepsin2_CNV	5	3
2	pfmrp1	13	12	10	EPS15_Formin2	7	7
3	pf dhfr	4	4	11	pf coronin	6	4
4	KIC7	4	4	12	Pfk13	7	5
5	pf crt	8	7	13	pf ama1	6	4
6	pf atp6	3	2	14	pf hrp2	5	3
7	pf mdr1	10	8	15	mdr2	1	1
8	pf ap2-mu	5	3	Tổng cộng		100	75

Tối ưu hóa quy trình nhiệt để thực hiện phản ứng PCR khuếch đại chọn lọc các đoạn gen kháng thuốc với các set mồi đã được xây dựng thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Chu trình thực hiện phản ứng PCR tối ưu hóa với các sét mồi được thiết kế

Số chu kỳ	Nhiệt độ	Thời gian
1X	99°C	2 phút
21X	99°C	15 giây
	60°C	8 phút
Giữ	10°C	Tối đa 24 giờ

Với chu trình trên hiệu suất khuếch đại của các sét mồi đạt 89 đến 95%.

3.2. Chuẩn hóa quy trình xử lý mẫu ban đầu và tách chiết ADN từ mẫu máu khô trên giấy thấm bằng phương pháp cột lọc, tối ưu hóa lượng ADN khuôn trước khi tạo thư viện.

Quá trình xử lý mẫu để tạo thư viện giải trình tự theo các bước như sau:

+ Thu thập mẫu máu → lấy một lượng mẫu nhất định được định lượng → Tách chiết ADN

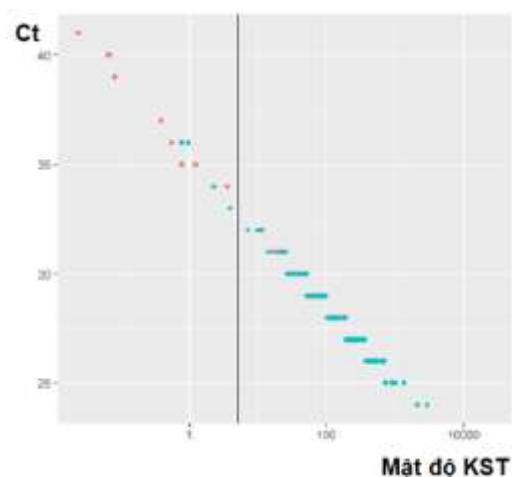
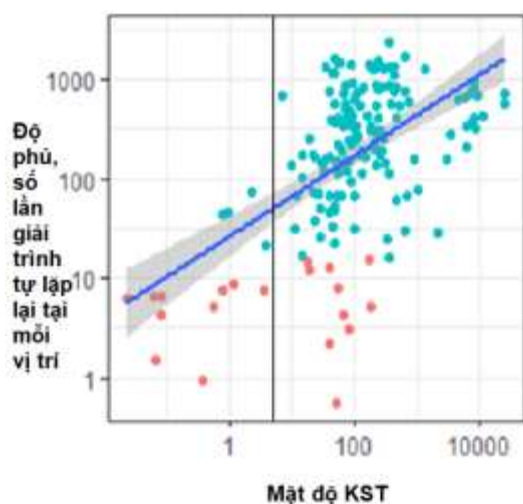
Mục tiêu quan trọng nhất là tối ưu hóa được nồng độ ADN *P. falciparum* đưa vào để chuẩn bị thư viện cho quá trình giải trình tự các đoạn gen mục tiêu.

Theo yêu cầu của bộ kit AmpliSeq library kit sử dụng để xây dựng thư viện lượng ADN đầu vào từ 1-100 ng trong đó 1 ng tương đương 300 bản copy hệ gen, trong đó lượng ADN tối ưu theo gợi ý là 10 ng, trong nghiên cứu của chúng tôi ADN đầu vào bao gồm cả ADN của KSTSR và ADN của người. Lượng ADN tối ưu trong mẫu cần đạt: 20-50 ng cho

một phản ứng và không vượt quá 100ng/1. Đánh giá nồng độ ADN ban đầu dựa trên kết quả đo trên Qubit và Nanodrop. Sau quá trình khuếch đại thì đánh giá lượng ADN đặc trưng của KST bằng kỹ thuật qPCR dựa vào giá trị Ct.

Chúng tôi tiến hành quá trình tối ưu hóa, nhằm tạo ra một quy trình chuẩn chung cho quá trình tạo mẫu ban đầu cho chuẩn bị thư viện giải trình tự bao gồm các nước dò nồng độ ADN trên các mẫu nuôi cấy và lâm sàng.

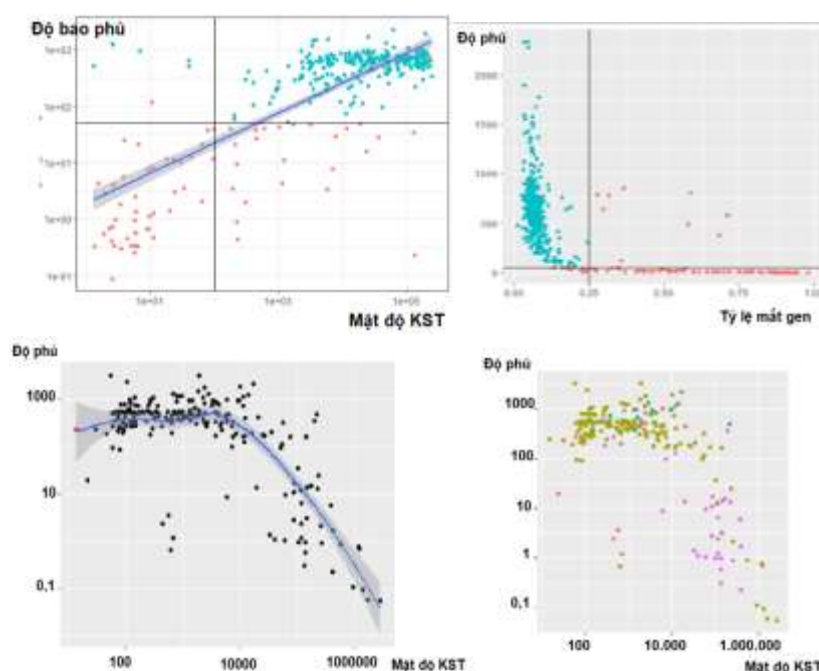
Thực hiện phản ứng real-time PCR định lượng trên các mẫu nuôi cấy với các nồng độ khác nhau, và giải trình tự theo quy trình chuẩn. Đánh giá các mẫu sau giải trình tự với tiêu chuẩn là độ phủ >15 và ít hơn 50% vị trí bị mất dữ liệu kiểu gen. Nhận thấy ở mật độ dưới 5 KST/ μ l, độ phủ bắt đầu giảm ở mật độ từ 100 KST/ μ l thì độ phủ luôn tốt tương ứng với giá trị Ct của mẫu khoảng 32,5 (có thể giao động đến 33 hoặc 34), để chuẩn bị thư viện thành công với đủ số lượt đọc.



Chấm đỏ: Giải trình tự không đạt yêu cầu

Chấm xanh: Giải trình tự đạt yêu cầu

Hình 2. Biểu đồ mối tương quan giữa mật độ KST với độ bao phủ và giá trị Ct của phản ứng real-time PCR



Hình 4. Biểu đồ mối tương quan giữa mật độ KST với độ bao phủ (tăng từ 15 lên 50) và độ mất gen giảm (50 xuống 25%)

Nếu giới hạn độ phủ tăng lên 50 thay vì 15 và tỷ lệ dữ liệu mất gen giảm xuống 25% thay vì 50 thì giới hạn mật độ cũng cao hơn một chút ở mức 100 KST/ μ L tương đương với Ct ở mức 31.

Mật độ quá thấp và quá cao đều ảnh hưởng đến quá trình giải trình tự, độ bao phủ bị giảm xuống. Dựa trên biểu đồ nhận thấy, quá trình giải trình tự hoạt động tốt nhất với mật độ ký sinh trùng trong khoảng từ 10 đến 10.000 KST/phản ứng. Nếu mật độ rất cao cần pha loãng xuống mức khoảng 1-10 ng/ μ L. Lượng mẫu ADN đầu vào của phản ứng khuếch đại với sét mồi đã được thiết kế ở trên là 7,5 μ L, không được vượt quá 100 ng/mẫu ADN tinh khiết. Dựa trên quá trình xác nhận, pha loãng các mẫu xuống còn 6,1 ng/ μ L để thu được khoảng 46 ng vật liệu đầu vào để có kết quả tốt nhất. Độ tinh khiết của ADN sau tách chiết có ảnh hưởng rất lớn đến kết quả của phản ứng giải trình tự.

Bảng 5. Kết quả giải trình tự so sánh với chất lượng AND mẫu sau tách chiết

Mẫu	Giá trị đo		Tỷ lệ A260/A280	Mật độ KST/ μ L	Số lần đọc - độ phủ	Tỷ lệ đọc mất gen (%)
	Qubit	Nanodrop				
p09	7,87	8,62	1,863	1134556	140	20
p11	12,8	15,55	1,965	298856	556	30
p12	5,42	6,54	1,981	1494	314274	35
p13	2,99	4,54	2,396	52837	6692	58
p14	4,07	5,98	2,122	153887	1408	55
p15	7,2	8,76	1,887	621796	462	32
p16	1,47	2,7	3,021	65951	7300	60
p17	5,62	7,87	1,978	169122	606	42
p19	3,78	5,56	1,887	23871	62178	40
p20	4,69	6,52	1,725	66704	3106	35
p21	34,1	32,73	1,851	303796	656	32

Mẫu	Giá trị đo		Tỷ lệ	Mật độ	Số lần đọc -	Tỷ lệ đọc mất
p22	5,03	4,17	1,734	157578	940	30
p23	2,64	13,97	3,343	225189	538	60
p24	8,07	23,36	2,94	6809	91562	65
p25	6,03	17,87	2,563	484154	654	62

Qua bảng 5 nhận thấy ở những mẫu có tỷ lệ A20/A280 lớn hơn 2 mẫu có sự tạp nhiễm tỷ lệ đọc mất gen thường trên 50% (55 % đến 65%). Thiết kế các set môi để khuếch đại các gen quan tâm và chuẩn hóa quá trình cũng như nồng độ ADN đầu vào để khuếch đại và chuẩn bị thư viện giải trình tự là các bước quan trọng nhất để thực hiện giải trình tự hệ gen của các đối tượng quan tâm. Các bước sau như pha thư viện ADN đến nồng độ thích hợp. Biến tính thư viện bằng hỗn hợp NaOH/EB. Pha loãng thư viện với dung dịch đệm lai HT1. Chuẩn bị thuốc thử, thêm môi iPCR và thư viện đã biến tính vào hộp thuốc thử. Tiến hành chạy máy giải trình tự được thực hiện theo các hướng dẫn của nhà sản xuất

3.3. Đánh giá quy trình giải trình tự trên 10 mẫu lâm sàng nhiễm đơn KST Plamosdium

Thực hiện giải trình tự với các thông số thí nghiệm tối ưu đã xác định để phân tích 15 gen kháng thuốc quan tâm.

Bảng 6. Kết quả giải trình tự trên 10 mẫu lâm sàng bằng quy trình đã tối ưu

Mẫu	Chất lượng chuỗi theo từng vị trí nucleotide (PQ)	Chất lượng tổng thể của các chuỗi	Tỷ lệ GC	Tỷ lệ đoạn adapter	Các chuỗi được lặp lại nhiều lần	Mức độ trùng lặp chuỗi	Kết quả đánh giá
Pf1	Trung bình: 32	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	5%	Tốt
Pf2	Trung bình: 33	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	4%	Tốt
Pf3	Trung bình: 31	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	6%	Tốt
Pf4	Trung bình: 32	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	5%	Tốt
Pf5	Trung bình: 18	< 50% có chất lượng cao	Phân bố không đều	5%	10%	20%	Không tốt
Pf6	Trung bình: 32	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	5%	Tốt
Pf7	Trung bình: 33	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	4%	Tốt
Pf8	Trung bình: 31	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	6%	Tốt
Pf9	Trung bình: 32	> 95% có chất lượng cao	Phân bố chuẩn	0%	0%	5%	Tốt
Pf10	Trung bình: 19	< 50% có chất lượng cao	Phân bố không đều	5%	8%	18%	Không tốt

Quy trình chuẩn hóa sau khi áp dụng lên các mẫu lâm sàng giải trình tự đạt tới 80% các mẫu có kết quả tốt. Đạt tiêu chuẩn đánh giá theo quy định.

IV. BÀN LUẬN

Thiết kế bộ mồi và lựa chọn pool mồi là những yếu tố quan trọng trong khuếch đại ADN đặc trưng của *P. falciparum*. Việc lựa chọn các mồi chính xác và pool mồi thích hợp đảm bảo rằng chỉ có ADN của *P. falciparum* được khuếch đại, ngay cả khi có sự hiện diện của ADN người. Điều này giúp tăng cường độ đặc hiệu và giảm nhiễu chéo trong quá trình giải trình tự. Các mồi được thiết kế sao cho chúng gắn kết chính xác với các vùng gen mục tiêu, trong khi pool mồi giúp tăng hiệu suất khuếch đại cho nhiều mẫu đồng thời [1], [2]. Nồng độ ADN cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình khuếch đại và giải trình tự. Một nồng độ ADN phù hợp giúp tối ưu hóa quá trình khuếch đại và đảm bảo rằng có đủ vật liệu di truyền để thực hiện các bước tiếp theo trong quy trình giải trình tự. Việc duy trì tỷ lệ ADN KST/ADN người ở mức thích hợp là cần thiết để đảm bảo kết quả giải trình tự chính xác và tin cậy [3].

Giải trình tự toàn bộ hệ gen của *P. falciparum* hiện nay đóng vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu và xây dựng chính sách loại trừ loài ký sinh trùng này. Thông qua giải trình tự toàn bộ hệ gen, các nhà nghiên cứu có thể phát hiện các biến thể di truyền liên quan đến kháng thuốc, hiểu rõ hơn về sự đa dạng di truyền của các quần thể ký sinh trùng, và đánh giá hiệu quả của các biện pháp phòng ngừa và điều trị hiện tại. Những thông tin này giúp định hình các chiến lược kiểm soát và loại trừ *Pl. falciparum* hiệu quả hơn trong tương lai [4], [5], [6].

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng và tối ưu quy trình giải trình tự toàn bộ hệ gen tập trung vào việc xây dựng 2 sét mồi, một set có 100 cặp mồi và một set 75 cặp mồi để khuếch đại 265 đoạn

gen có kích thước 200-300 bp với tổng chiều dài khoảng 3,5 Mb liên quan đến 15 gen kháng thuốc của *Plasmodium falciparum* trên máy Miseq của hãng Illumina. Áp dụng quy trình trên 10 mẫu lâm sàng đạt yêu cầu về chất lượng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Malaria Journal.** (2018). Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification. Retrieved from <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2374-3>
2. **Malaria Journal.** (2020). Optimization of whole-genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from low-density dried blood spot samples. Retrieved from <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-020-03510-w>
3. **Malaria Journal.** (2021). Direct whole-genome sequencing of *Plasmodium falciparum* specimens from dried erythrocyte spots. Retrieved from <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-021-03794-w>
4. **Genome Medicine.** (2019). Strains used in whole organism *Plasmodium falciparum* vaccine trials differ in genome structure, sequence, and immunogenic potential. Retrieved from <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-019-0677-2>
5. **BMC Medical Genomics.** (2021). Genome-wide association studies of severe *P. falciparum* malaria susceptibility: progress, pitfalls and prospects. Retrieved from <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-021-01046-3>
6. **bioRxiv.** (2022). Flexible and cost-effective genomic surveillance of *P. falciparum*

malaria with targeted nanopore sequencing. Retrieved from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.28.482397v1>

7. **Parasitology Research.** (2018). Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. Retrieved from

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-018-5931-4>

8. **Springer.** (2018). Plasmodium falciparum genetic diversity and malaria control. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-018-5874-9>

PHÂN TÍCH TÌNH HÌNH SỬ DỤNG KHÁNG SINH COLISTIN TẠI BỆNH VIỆN HỮU NGHỊ ĐA KHOA NGHỆ AN NĂM 2023

Đặng Thị Soa¹, Nguyễn Thu Hằng¹, Nguyễn Thị Thúy Ngân¹,
Vũ Thị Thủy¹, Hoàng Thị Thu Hiền¹

TÓM TẮT.

Mục tiêu: Khảo sát và phân tích tính hợp lý trong việc sử dụng kháng sinh colistin tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An năm 2023.

Phương pháp: Nghiên cứu dựa trên 124 hồ sơ bệnh án của bệnh nhân nội trú có sử dụng colistin từ ngày 01/01/2023 đến 31/12/2023. **Kết quả:** Bệnh nhân điều trị tại Khoa Hồi sức Tích cực chiếm tỷ lệ sử dụng colistin cao nhất (22,6%). Loại nhiễm khuẩn phổ biến nhất là nhiễm khuẩn hô hấp kết hợp với nhiễm khuẩn huyết (21%), kế đến là nhiễm khuẩn hô hấp đơn thuần (16,1%). Tất cả bệnh nhân đều sử dụng colistin như liệu pháp thay thế, với phác đồ phối hợp colistin và meropenem chiếm 70,3%. Liều nạp được sử dụng trong 67,7% trường hợp, chủ yếu là 3.000.000 IU (46%). Liều duy trì thường là 2.000.000 IU x 2 lần/ngày (39,5%). 100% bệnh nhân dùng colistin qua đường tĩnh mạch, trong đó có 2 trường hợp kết hợp tiêm tĩnh mạch và khí dung. 94 bệnh nhân được điều trị theo vi khuẩn gây bệnh. Chỉ định và

liều dùng colistin đều tuân theo hướng dẫn. **Kết luận:** Colistin chủ yếu được sử dụng như liệu pháp thay thế và phối hợp với các kháng sinh khác, thường được dùng liều nạp, và phù hợp với hướng dẫn điều trị theo vi khuẩn gây bệnh.

Từ khóa: colistin, kháng sinh

SUMMARY

ANALYSIS OF THE SITUATION OF COLISTIN ANTIBIOTIC USE AT NGHE AN FRIENDSHIP GENERAL HOSPITAL IN 2023

Objective: To investigate and analyze the rationality of colistin antibiotic use at Nghe An General Friendship Hospital in 2023. **Methodology:** The study was based on 124 inpatient medical records involving the use of colistin from January 1, 2023, to December 31, 2023. **Results:** Patients in the Intensive Care Unit had the highest rate of colistin use (22.6%). The most common infections were respiratory infections combined with sepsis (21%), followed by isolated respiratory infections (16.1%). All patients received colistin as an alternative therapy, with the combination of colistin and meropenem accounting for 70.3%. A loading dose was used in 67.7% of cases, primarily at 3,000,000 IU (46%). The maintenance dose was typically 2,000,000 IU twice daily (39.5%). All patients were administered colistin intravenously,

¹Trường Đại Học Y Khoa Vinh

Chịu trách nhiệm chính: Đặng Thị Soa

SĐT: 0367783294

Email: dangsoa@vmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 28/8/2024

Ngày phản biện khoa học: 20/9/2024

Ngày duyệt bài: 02/10/2024