

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Da Rosa BN, Furlanetto TS, Noll M, Sedrez JA, Schmit EFD, Candotti CT.** 4-year longitudinal study of the assessment of body posture, back pain, postural and life habits of schoolchildren. *Motricidade*. 2017;13(4):3-12.
2. **Acaroğlu E, Nordin M, Randhawa K, et al.** The Global Spine Care Initiative: a summary of guidelines on invasive interventions for the management of persistent and disabling spinal pain in low-and middle-income communities. *European Spine Journal*. 2018;27(6):870-878.
3. **Young JL, Walker D, Snyder S, Daly K.** Thoracic manipulation versus mobilization in patients with mechanical neck pain: a systematic review. *Journal of Manual & Manipulative Therapy*. 2014;22(3):141-153.
4. **Bikbov MM, Kazakbaeva GM, Zainullin RM, et al.** Prevalence of and factors associated with low Back pain, thoracic spine pain and neck pain in Bashkortostan, Russia: the Ural Eye and Medical Study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2020;21(1):64.
5. **Heneghan NR, Gormley S, Hallam C, Rushton A.** Management of thoracic spine pain and dysfunction: a survey of clinical practice in the UK. *Musculoskeletal Science and Practice*. 2019;39:58-66.
6. **Heneghan NR, Puentedura EJ, Arranz I, Rushton A.** Thoracic thrust joint manipulation: An international survey of current practice and knowledge in IFOMPT member countries. *Musculoskeletal Science and Practice*. 2020; 50: 102251.
7. **Yến HH.** Một Vài Nhận Xét Về Kỹ Thuật Viên Vật Lý Trị Liệu/ Phục Hồi Chức Năng Được Đào Tạo Từ Trường Cao Đẳng Kỹ Thuật Y Tế Đàng Lâm Việc Tại Các Cơ Sở Y Tế Tỉnh Hải Dương. *Y Học Thực Hành*. 2005;526:190-192.
8. **Heneghan NR, Davies SE, Puentedura EJ, Rushton A.** Knowledge and pre-thoracic spinal thrust manipulation examination: a survey of current practice in the UK. *Journal of Manual & Manipulative Therapy*. 2018;26(5):301-309.

XÂY DỰNG QUY TRÌNH KỸ THUẬT REAL-TIME PCR XÁC ĐỊNH BIẾN THỂ RS1801275 TRÊN GEN IL4-RA LIÊN QUAN BỆNH VIÊM DA CƠ ĐỊA

Lê Thị Thôi¹, Ngô Quốc Đạt¹,
Nguyễn Minh Hà², Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình real-time PCR SYBR chẩn đoán biến thể rs1801275 trên gen IL4-R α . **Phương pháp nghiên cứu:** Thiết kế các đoạn mã đặc hiệu alen phát hiện biến thể rs1801275 trên gen IL4-R α bằng công cụ primer-BLAST (NCBI, Hoa Kỳ). Đánh giá độ đặc hiệu, tối ưu hóa nồng độ và nhiệt độ bắt cặp của đoạn mã đã thiết kế. Thẩm định khả năng xác định kiểu gen của biến thể IL4-R α rs1801275 thông qua phản ứng real-time PCR với bộ DNA plasmid chứng giả lập các kiểu gen biến thể quan tâm bằng bộ sinh phẩm SensiFAST SYBR (Bioline). Áp dụng quy trình lên 113 mẫu đã được khẳng định kết quả kiểu gen biến thể bằng giải trình tự Sanger để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và độ xác thực của kỹ thuật. **Kết quả:** Xây dựng thành công quy trình kỹ thuật real-time PCR SYBR chẩn đoán biến thể IL4-R α rs1801275. Các đoạn mã đặc hiệu alen đạt độ đặc hiệu khi kiểm tra bằng điện di mao quản. Nồng độ tối ưu của các đoạn mã là 250 nM, với CV% giá trị Ct giữa các lần lặp phản ứng đều nhỏ hơn 10% và giá trị

Ct trung bình trong khoảng 28 ± 2 . Xác định được giá trị $|\Delta Ct|$ bằng 3 là điểm phân biệt các kiểu gen của biến thể (CV% nhỏ hơn 10%). Độ nhạy, độ đặc hiệu, độ xác thực của kỹ thuật lần lượt là 100%, 98,9% và 99,1%. **Kết luận:** Đã xây dựng thành công quy trình kỹ thuật real-time PCR SYBR để xác định biến thể rs1801275 trên gen IL4-R α . **Từ khóa:** Viêm da cơ địa, rs1801275, gen IL4-R α , real-time PCR, SYBR.

SUMMARY

ESTABLISHING A REAL-TIME PCR SYBR PROCEDURE FOR DETECTING rs1801275 VARIANT IN THE IL4-R α GENE ASSOCIATED WITH THE ATOPIC DERMATITIS

Objective: Establishing a real-time PCR SYBR procedure to detect rs1801275 variant in the IL4-R α gene. **Methods:** pairs of allele-specific oligonucleotide (ASO) primers were designed to detect rs1801275 variant in the IL4-R α gene. The designed primers were verified their specificity in practical laboratory condition and then were determined their optimal concentration and annealing temperature by conducting real-time PCR reactions with each genotype of the rs1801275. The genotype discriminability of the established procedure was validated through real-time PCR reactions with the rs1801275 recombinant DNA plasmids. Performing the real-time PCR SYBR procedure on 113 samples which the genotype results were confirmed by Sanger sequencing and then

¹Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn

Email: nhntuan@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 6.11.2023

Ngày phản biện khoa học: 22.12.2023

Ngày duyệt bài: 9.01.2024

evaluating the sensitivity, specificity and accuracy of the real-time PCR procedure by comparing the results from both methods. **Results:** Successfully developed the SYBR real-time PCR procedure to detect rs1801275 variant in the gene IL4-Ra. ASO primers were specifically designed by Primer-BLAST (NCBI). The optimal concentration of the ASO primers were 250 nM, with the CV% of the Ct values were less than 10% and the average Ct value was 28 ± 2 . The $|\Delta Ct| = 3$ were the point distinguishes each genotype of rs1801275 (CV% were less than 10%). The sensitivity, specificity, and accuracy of the technique were 100%, 98.9%, and 99.1%, respectively. **Conclusion:** The real-time PCR SYBR procedure to detect rs1801275 variant in the gene IL4-Ra has been established successfully. **Keywords:** Atopic dermatitis, rs1801275, IL4-Ra gene, real-time PCR, SYBR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm da cơ địa (VDCĐ) là bệnh viêm da mãn tính thường gặp, gây ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống người bệnh [1-2]. Biểu chứng của VDCĐ ít nghiêm trọng, bao gồm bội nhiễm do gãi, ảnh hưởng thẩm mỹ và tâm lý người bệnh. Bệnh gặp ở mọi lứa tuổi, không phân biệt giới tính, đặc biệt gặp ở nhiều trẻ nhỏ (chiếm 15-30%) [3]. Hiện nay, việc điều trị bệnh nhân VDCĐ còn nhiều khó khăn và thách thức. Cơ chế bệnh sinh của VDCĐ phức tạp, là sự tương tác giữa yếu tố di truyền và môi trường [4]. Sự gia tăng con đường truyền tín hiệu thông qua thụ thể IL-4R α là một cơ chế gây bệnh VDCĐ đã được tác giả Izuhara và cộng sự mô tả. Sự gia tăng luồng truyền tín hiệu thông qua IL-4R α làm tăng sinh quá mức IgE ở tế bào B, các tế bào mast, tế bào eosinophil dẫn đến các biểu hiện liên quan đến bệnh lý dị ứng cơ địa, trong đó có VDCĐ [5].

Nhiều biến thể di truyền trên gen IL-4R α mã hoá thụ thể cùng tên là IL-4R α (IL-4 receptor alpha) đã được báo cáo có liên quan đến rối loạn đường truyền tín hiệu nội bào, trong đó biến thể rs1801275 có nucleotide A bị biến đổi thành G, làm axit amin thứ 576 là glutamine chuyển đổi thành arginine (Q576R), gây khuếch đại quá mức đường truyền tín hiệu thông qua thụ thể IL-4R α [6]. Việc khảo sát đặc điểm kiểu gen của biến thể rs1801275 không chỉ giúp khảo sát một phần cơ chế bệnh sinh VDCĐ, còn là tiền đề cho việc định hướng cho các nghiên cứu cá thể hóa điều trị và điều trị trúng đích bằng kháng thể đơn dòng trong tương lai [7]. Chính thực tế trên đã đặt ra nhu cầu về sự cần thiết xây dựng một công cụ chẩn đoán có độ tin cậy cao và giá thành phù hợp nhằm mô tả đặc điểm biến thể nhằm tiến đến triển khai thường quy trên thực hành lâm sàng khi có nhu cầu, nhằm chẩn đoán

xác định biến thể di truyền trên gen IL-4R α , đặc biệt rs1801275. Đó là lý do nhóm nghiên cứu tiến hành thực hiện đề tài "*Xây dựng quy trình kỹ thuật real-time PCR xác định biến thể rs1801275 trên gen IL4-Ra liên quan bệnh lý viêm da cơ địa*".

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Các mẫu DNA bộ gen đã được xác định kiểu gen của biến thể rs1801275 gen IL4-Ra bằng phương pháp giải trình tự Sanger, được lưu trữ tại Đơn vị Phân tử, Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường ĐHYK Phạm Ngọc Thạch.

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm, tại phòng thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường ĐHYK Phạm Ngọc Thạch, qua các bước sau:

(1) Thiết kế cặp đoạn mỗi đặc hiệu alen giúp xác định biến thể rs1801275 bằng phương pháp SYBR với phần mềm primer-BLAST (NCBI, Hoa Kỳ). Trong đó, thiết kế 1 đoạn mỗi ngược dùng chung và 2 mỗi xuôi đặc hiệu cho từng alen A và alen G.

(2) Đánh giá độ đặc hiệu của đoạn mỗi bằng phản ứng real-time PCR SYBR khuếch đại vùng gen IL4-Ra trên DNA đã biết trước kiểu gen AA và GG biến thể rs1801275 (SensiFAST SYBR kit, Bioline trên hệ thống QuantStudio 5, Applied Biosystems). Nồng độ mỗi 500 nM; 2,5 ng DNA bộ gen người, nhiệt độ bắt cặp 60°C 15 giây, 35 chu kỳ. Sản phẩm được đánh giá bằng phương pháp điện di mao quản (LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer, PerkinElmer). Đoạn mỗi đặc hiệu khi phản ứng real-time PCR chỉ xuất hiện duy nhất một sản phẩm có độ dài tương đương với độ dài ước tính khuếch đại.

(3) Xác định nhiệt độ bắt cặp tối ưu của đoạn mỗi thiết kế ở mức 60°C, 65°C và 70°C. Nhiệt độ bắt cặp tối ưu là mức nhiệt độ mà ở đó kết quả real-time PCR có giá trị Ct 28 ± 2 . và có khả năng phân biệt tốt ba loại kiểu gen của biến thể quan tâm. Nhóm nghiên cứu quy ước: x là Ct của phản ứng real-time PCR với cặp mỗi đặc hiệu cho alen A; y là Ct của phản ứng real-time PCR với cặp mỗi đặc hiệu cho alen G. Xác định đặc điểm chẩn đoán dựa trên công thức: $\Delta Ct = x - y$. Xác định kiểu gen biến thể rs1801275 theo bảng 1.

(4) Xác định nồng độ đoạn mỗi tối ưu lần lượt ở mức 250 nM và 500 nM. Phản ứng lặp lại 3 lần/mẻ cho mỗi kiểu gen AA và GG và trên 3 mẻ độc lập. Nồng độ được chọn là mức nồng độ mà ở đó kết quả real-time PCR có giá trị Ct trong khoảng 28 ± 2 ; CV dưới 10%. Đồng thời, dựa vào giá trị Ct có thể xác định được kiểu gen biết

trước (theo bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm xác định kiểu biến thể rs1801275 gen IL4-Ra

$\Delta Ct = x - y$	Hiệu số giá trị Ct	Kiểu gen
$ \Delta Ct < 3$	Không áp dụng	AG
$ \Delta Ct \geq 3$	$x - y < 0$	AA
	$x - y > 0$	GG

(5) Tạo dòng DNA plasmid chứng mang alen A và alen G của biến thể rs1801275: bằng cách khuếch đại vùng gen IL4-Ra của người có kiểu gen GA của biến thể rs1801275, từ đó chèn vào vector plasmid pCR2.1-TOPO (TOPO TA cloning kit, Invitrogen). Vector sau tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào E.coli bằng phương pháp sốc nhiệt (One Shot TOP10F⁺ Chemically Competent, Invitrogen). Sàng lọc khuẩn chứa vector tái tổ hợp mong muốn bằng phương pháp colony PCR. Kết quả tạo dòng DNA plasmid chứng được khẳng định lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger. DNA plasmid chứng được sử dụng làm chứng dương kiểm soát chất lượng quy trình

real-time PCR xây dựng.

(6) Thẩm định khả năng xác định kiểu gen biến thể rs1801275 thông qua khả năng dự đoán kiểu gen bằng ΔCt . Bằng cách thực hiện phản ứng real-time PCR với bộ DNA plasmid chứng giả lập 3 kiểu gen biến thể quan tâm. Thực hiện lặp lại 3 lần/mẻ và 3 mẻ độc lập. Nồng độ được chọn là mức nồng độ mà ở đó kết quả real-time PCR có giá trị Ct trong khoảng 28 ± 2 ; CV dưới 10%. Đồng thời, dựa vào giá trị Ct có thể xác định được kiểu gen biết trước (theo bảng 1).

(7) Xác định độ nhạy (SE), độ đặc hiệu (SP) và độ xác thực (AC) bằng phản ứng real-time PCR vừa xây dựng với 113 mẫu DNA đã biết trước kiểu gen (giải trình tự Sanger) được sắp xếp ngẫu nhiên tạo thành bộ mẫu giả lập. Kỹ thuật được xem là đạt khi có AC, SE và SP đều $\geq 95\%$.

Xử lý và phân tích số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel. Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức Đại học Y Dược TP.HCM số 771/HĐĐĐ-ĐHYD ngày 24/10/2022.

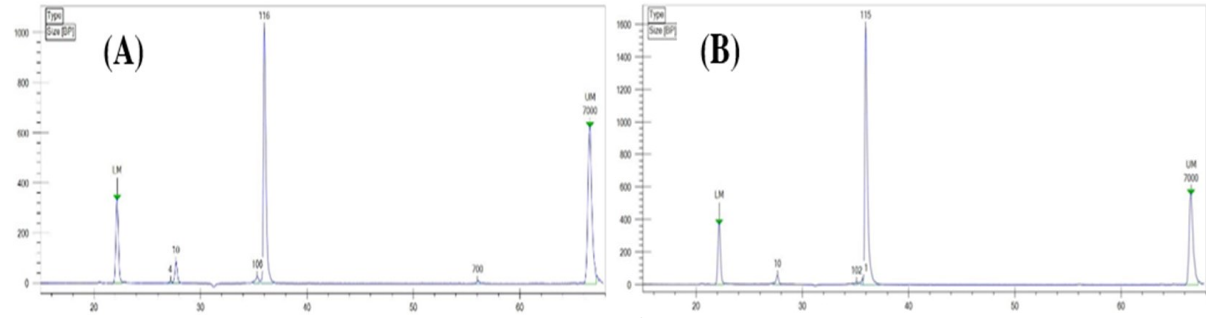
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Thiết kế và đánh giá độ đặc hiệu cặp đoạn mỗi đặc hiệu alen

Bảng 2. Thông tin đoạn mỗi đặc hiệu alen biến thể rs1801275 gen IL4-Ra

Tên	Trình tự (5' - 3')	Độ dài (nucleotide)	Tm (°C)	GC%	Độ dài sản phẩm (bp)
Mũi xuôi A	CCCCACAGTGGCTATCA*	18	56,9	61,1	106
Mũi xuôi G	CCCCACAGTGGCTATCG*	18	58	66,7	
Mũi ngược	GCCTTGTAAACAGCCTCTCC	20	60,4	60,0	

*: Trình tự nucleotide trên đoạn mỗi được thiết kế đặc hiệu từng loại alen của biến thể rs1801275

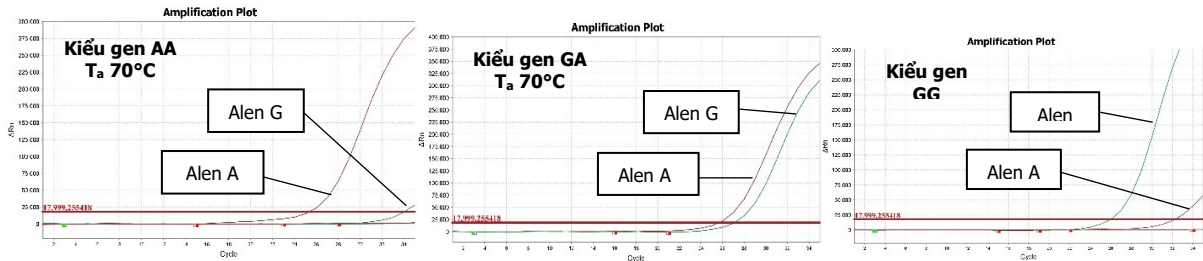


Hình 1. Kết quả điện di mao quản sản phẩm real-time PCR khuếch đại vùng gen IL4-Ra đặc hiệu kiểu gen AA (A) và kiểu gen GG (B) biến thể rs1801275

Kết quả điện di mao quản sản phẩm real-time PCR cho thấy chỉ xuất hiện một đỉnh tín hiệu đặc hiệu, với kích thước lần lượt là 115 bp (GG) và 116 bp (AA). Kết quả này nằm trong sai số cho phép của nhà sản xuất ($\pm 10\%$), cho thấy đoạn mỗi được thiết kế là đặc hiệu khi đánh giá trong điều kiện thực nghiệm.

Tối ưu nhiệt độ bắt cặp đoạn mỗi đặc hiệu. Kết quả thực hiện phản ứng real-time PCR

cho thấy, tại mức nhiệt độ 60°C và 65°C, không có sự khác biệt rõ ràng về đường cong khuếch đại cũng như giá trị Ct thoả tiêu chí xác định kiểu gen tại bảng 1. Tại mức nhiệt độ 70°C, có sự tách biệt rõ ràng về hình ảnh đường cong khuếch đại và giá trị Ct thoả tiêu chí xác định kiểu gen tại bảng 1 (Hình 2). Nhiệt độ bắt cặp tối ưu được chọn là 70°C.



Hình 2. Kết quả tối ưu hoá nhiệt độ bắt cặp tại 70°C phản ứng real-time PCR khuếch đại vùng gen IL4-Ra chứa các kiểu gen biến thể rs1801275

Tối ưu nồng độ cặp đoạn môi đặc hiệu.
 Kết quả từ bảng 3 cho thấy tất cả các mẻ thí nghiệm đều có CV% < 10%. ΔCt của kiểu gen đồng hợp tử AA và GG tại 2 mức nồng độ 500 nM và 250 nM đều thoả quy ước và không có sự khác

biệt. Kết quả từ bảng 3 cho thấy tất cả các mẻ thí nghiệm đều có CV% ≤ 3% chứng tỏ đạt độ lặp và độ tái lặp tốt. Do đó, nồng độ 250 nM được lựa chọn là mức nồng độ tối ưu nhằm tiết kiệm lượng mỗi sử dụng cho phản ứng real-time PCR.

Bảng 3. Kết quả real-time PCR ở nồng độ 250 nM và 500 nM

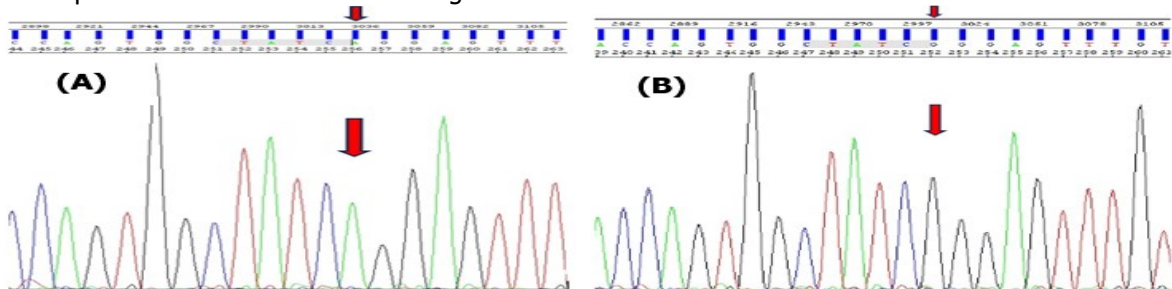
Nồng độ (nM)	Kiểu gen	Đoạn môi đặc hiệu alen A			Đoạn môi đặc hiệu alen G			ΔCt
		Ct	Ct _{mean}	CV%	Ct	Ct _{mean}	CV%	
500	AA	29,2	29,1	0,5	32,4	32,5	0,4	3,4
		29,0						
		29,0						
	GG	33,9	34,0	0,5	29,0	29,0	0,2	
		34,2						
		Không tín hiệu						
250	AA	29,4	29,3	0,4	33,4	33,2	1,0	3,9
		29,2						
		29,4						
	GG	34,3	34,3	0,0	28,9	29,0	1,0	
		Không tín hiệu						
		Không tín hiệu						

Bảng 4. Kết quả Ct trung bình ở mức nồng độ 250 nM ở cả 3 mẻ

Mẻ	Kiểu gen AA	Kiểu gen GG
1	Ct _{mean} 26,8; CV 2%	Ct _{mean} 25,9; CV 1%
2	Ct _{mean} 26,6; CV 3%	Ct _{mean} 25,5; CV 0,5%
3	Ct _{mean} 27,2; CV 3%	Ct _{mean} 25,6; CV 0,5%
	Ct_{mean} 26,8 CV 1%	Ct_{mean} 25,7 CV 1%

Tạo dòng DNA plasmid chứng mang alen A mang alen G của biến thể rs1801275

Plasmid sau khi được tạo ra, được xác định kiểu gen bằng giải trình tự Sanger. Hình 3 cho thấy tại vị trí biến thể quan tâm, có thể dễ dàng định danh chính xác loại alen; chiều cao tín hiệu nhiễu nền thấp hơn so với chiều cao đỉnh sóng chính.



Hình 3. Kết quả giải trình tự Sanger DNA plasmid mang alen A (A) và alen (B)

Thẩm định khả năng xác định kiểu gen biến thể rs1801275

Kết quả từ bảng 5 cho thấy CV% giá trị Ct từng mẻ và cả 3 mẻ đều < 10% chứng tỏ các phản ứng có độ lặp và độ tái lặp tốt. Kết quả xác định kiểu gen dựa trên quy ước xây dựng phù hợp hoàn toàn trùng khớp với kết quả kiểu gen biến thể rs1801275 gen IL4-Ra đã biết.

Bảng 5. Kết quả real-time PCR xác định kiểu gen chẩn đoán biến thể rs1801275

Mẻ	Kiểu gen	Môi đặc hiệu alen A ($C_{t_{mean}} = x$)	Môi đặc hiệu alen G ($C_{t_{mean}} = y$)	$\Delta C_{t_{mean}}$ ($\Delta C_{t_{mean}} = x - y$)	Kiểu gen xác định dựa vào $\Delta C_{t_{mean}}$
1	AA	$C_{t_{mean}}$ 26,8; CV 2%	$C_{t_{mean}}$ 33,7; CV 2%	-6,9	AA
	AG	$C_{t_{mean}}$ 28,3; CV 0,2%	$C_{t_{mean}}$ 27,0; CV 1%	1,3	AG
	GG	$C_{t_{mean}}$ 34,2; CV 0%	$C_{t_{mean}}$ 25,9; CV 1%	8,2	GG
2	AA	$C_{t_{mean}}$ 26,6; CV 3%	$C_{t_{mean}}$ 33,1; CV 2%	-6,4	AA
	AG	$C_{t_{mean}}$ 28,0; CV 1%	$C_{t_{mean}}$ 27,2; CV 1%	0,8	AG
	GG	$C_{t_{mean}}$ 34,4; CV 0,2%	$C_{t_{mean}}$ 25,5; CV 0,5%	8,9	GG
3	AA	$C_{t_{mean}}$ 27,2; CV 2%	$C_{t_{mean}}$ 34,1; CV 2%	-6,9	AA
	AG	$C_{t_{mean}}$ 28,6; CV 2%	$C_{t_{mean}}$ 27,6; CV 1%	1,0	AG
	GG	Không tín hiệu; CV 0%	$C_{t_{mean}}$ 25,6; CV 0,5%	>> 0	AA

Ghi chú: Khi phản ứng không có tín hiệu, C_t có thể xem như rất lớn (tiến về $+\infty$).

Độ nhạy, độ đặc hiệu, độ xác thực của kỹ thuật. Kết quả xác định kiểu gen của bộ mẫu giả lập gồm 113 mẫu DNA đã biết kiểu gen theo phương pháp Sanger cho thấy độ nhạy, độ đặc hiệu, độ xác thực của phương pháp lần lượt là 100%, 98,9% và 99,1%.

Bảng 6. Phân phối số liệu kết quả real-time PCR và giải trình tự Sanger

		Kết quả bằng giải trình tự Sanger		Tổng
		Có alen G	Không có alen G	
Kết quả bằng real-time PCR SYBR	Có alen G	39	2	41
	Không có alen G	0	185	185
Tổng alen		39	187	226

IV. BÀN LUẬN

Phương pháp giải trình tự Sanger được xem là "tiêu chuẩn vàng" trong việc xác định các biến thể di truyền đơn nucleotide, tuy nhiên do phương pháp đòi hỏi nhiều về nguồn lực thực hiện nên hiện nay giải trình tự Sanger chưa thể áp dụng rộng rãi trên thực hành lâm sàng cũng như các nghiên cứu cộng đồng tại Việt Nam. Phương pháp real-time PCR sử dụng đoạn môi đặc hiệu alen và chất huỳnh quang SYBR là phương pháp đơn giản, không đòi hỏi nhiều về nguồn lực và đã được áp dụng rộng rãi trong nghiên cứu cộng đồng. Việc xây dựng thành công quy trình real-time PCR sử dụng đoạn môi đặc hiệu alen là bước đầu tiên, cần thiết và quan trọng giúp xác định biến thể rs1801275 gen IL4-Ra ở Việt Nam.

Phương pháp real-time PCR sử dụng chất huỳnh quang SYBR và đoạn môi đặc hiệu alen dù đã được triển khai nhiều trong các nghiên cứu xác định biến thể di truyền, tuy nhiên, khuyết điểm của phương pháp là hiện tượng dương tính giả do sự có mặt sản phẩm thứ cấp

(prime-dimer). Để hạn chế hiện tượng này, sản phẩm phản ứng real-time PCR đã được thẩm định bằng phương pháp điện di mao quản. Kết quả thực nghiệm chứng minh được không có sự hiện diện của sản phẩm thứ cấp trong quá trình phản ứng real-time PCR xảy ra. Do phương pháp real-time PCR sử dụng đoạn môi đặc hiệu dựa trên nguyên lý sự chênh lệch hiệu suất phản ứng giữa các đoạn môi đặc hiệu alen và loại alen của biến thể quan tâm, từ đó dẫn đến sự chênh lệch khoảng giá trị C_t . Chính vì vậy sự phân tách giá trị C_t hay ΔC_t đóng vai trò quan trọng trong việc xác định loại kiểu gen biến thể quan tâm. Trong thực hành tại Đơn vị Phân tử của Trung tâm nghiên cứu y sinh là nơi thực hiện thí nghiệm, %CV của phản ứng real-time PCR trong khoảng 3%. Với thiết kế phản ứng real-time PCR như trong phạm vi nghiên cứu, giá trị C_t trong khoảng 28, tương ứng với SD giá trị C_t là $\pm 0,84$. Nhóm nghiên cứu đề xuất mức ΔC_t là 3 (trong khoảng $\pm 3SD$) để phân biệt tốt nhất hai loại alen. Giá trị ΔC_t thực tế đã được xác định khi so sánh C_t thu được từ các thí nghiệm trên plasmid mang các alen cần phân biệt.

Trong nghiên cứu này, việc xác định nhiệt độ bắt cặp phù hợp là yếu tố tiên quyết trong quá trình xây dựng quy trình sinh học phân tử sử dụng real-time PCR sử dụng đoạn môi đặc hiệu alen. Mặc dù nhiệt độ bắt cặp của từng đoạn môi đã được ước tính dựa vào nhiệt độ nóng chảy của đoạn môi bởi phần mềm Primer-BLAST (NCBI), tuy nhiên, sự khác biệt giữa các loại sinh phẩm, bao gồm loại enzyme Taq DNA polymerase, nồng độ Mg^{2+} , nồng độ dNTP sẽ dẫn đến sự khác biệt đáng kể trong phản ứng real-time PCR. Trong nghiên cứu này, mặc dù các đoạn môi thiết kế có nhiệt độ nóng chảy dao động khoảng $60^\circ C$, đồng thời nhiệt độ bắt cặp khuyến cáo của bộ sinh phẩm SensiFAST SYBR (Bioline) là $60-65^\circ C$ nhưng các mức nhiệt độ nêu trên chưa thể làm tách biệt rõ ràng khả năng phản ứng của đoạn môi đặc hiệu alen, dẫn đến

kết quả xác định kiểu gen dựa vào $|\Delta Ct|$ là chưa đạt kì vọng như mong muốn (như ở mức 70°C).

Trong phạm vi nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác của quy trình xây dựng được cùng với 113 mẫu DNA đã biết trước kiểu gen bằng giải trình tự Sanger. Kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác lần lượt là 100%, 98,9% và 99,1%. Kết quả trên đã chứng minh độ tin cậy cao của kết quả xác định kiểu gen của quy trình xác định biến thể rs1801275 gen IL4-Ra đã xây dựng. Do những hạn chế về nguồn lực của nghiên cứu và tình hình ngoại kiểm tại nước ta hiện tại, quy trình vừa xây dựng chưa tham gia ngoại kiểm (EQA) hoặc tham gia so sánh liên phòng.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình kỹ thuật real-time PCR sử dụng chất phát huỳnh quang SYBR phát hiện biến thể rs1801275 trên gen IL4-Ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sonya Kahn M, Rind D, Chapman R, Kumar

- V, Kahn S, Carlson J. Economic evaluation of dupilumab for moderate-to-severe atopic dermatitis: a cost-utility analysis. 2018;17(7):750-756.
2. Zink AG, Arents B, Fink-Wagner A, et al. Out-of-pocket costs for individuals with atopic eczema: a cross-sectional study in nine European countries. 2019;99(3):263-267.
3. Bộ Y Tế. Cảnh giác với biến chứng do viêm da cơ địa. 2019; https://moh.gov.vn/chuong-trinh-muc-tieu-quoc-gia/-/asset_publisher/7ng11fEWgASC/content/canh-giac-voi-bien-chung-do-viem-da-co-ia?inheritRedirect=false. Accessed July 20, 2022.
4. Roduit C, Frei R, Depner M, Karvonen A M, et al. Phenotypes of atopic dermatitis depending on the timing of onset and progression in childhood, JAMA pediatrics, 2017; 171 (7), pp. 655-662.
5. Izuhara K, Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy, International Journal of Molecular Medicine, 1999; 3 (1), pp. 3-13.
6. Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, et al. Variation in the interleukin 4-receptor α gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. 2000;66(2):517-526.
7. Thibodeaux Q, Smith MP, Ly K, et al. A review of dupilumab in the treatment of atopic diseases. 2019;15(9):2129-2139.

KHẢO SÁT MỨC ĐỘ NHẠY CẢM KHÁNG SINH CEFTAZIDIME/AVIBACTAM CỦA KLEBSIELLA PNEUMONIAE Ở BỆNH NHÂN KHOA HỒI SỨC CẤP CỨU BỆNH VIỆN CHỢ RẪY

Nguyễn Ngọc Châu¹, Võ Nguyên Trung², Trần Thanh Linh³,
Lê Phạm Mỹ Dạ³, Trương Thiên Phú³

TÓM TẮT

Giới thiệu: Hiện trên thế giới đã báo cáo các trường hợp sử dụng kháng sinh kết hợp mới như ceftazidime/avibactam - là một chất ức chế β -lactam/ β -lactamase có hoạt tính chống lại vi khuẩn Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae) kháng carbapenem và kết quả ban đầu cho thấy rất khả quan. Tại Việt Nam, ceftazidime/avibactam đã được sử dụng nhưng chưa có nhiều nghiên cứu về tính nhạy cảm của thuốc. Để cung cấp thêm dữ kiện cho ý kiến về hiệu quả của loại kháng sinh mới này, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: "Khảo sát mức độ nhạy cảm kháng sinh ceftazidime/avibactam của Klebsiella pneumoniae ở bệnh nhân khoa Hồi sức cấp cứu Bệnh viện Chợ Rẫy".

Mục tiêu: 1. Xác định đặc điểm và tỷ lệ đề kháng kháng sinh của K. pneumoniae ở bệnh nhân khoa Hồi sức cấp cứu Bệnh viện Chợ Rẫy. 2. Xác định tỷ lệ nhạy cảm kháng sinh ceftazidime/avibactam của K. pneumoniae ở bệnh nhân khoa Hồi sức cấp cứu Bệnh viện Chợ Rẫy. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu cắt ngang mô tả, thực hiện từ 12/2022 đến 9/2023. Đối tượng là các trường hợp khoa Hồi sức cấp cứu có mẫu cấy bệnh phẩm dương tính được định danh là K. pneumoniae và thực hiện kháng sinh đồ tại Khoa Vi sinh. **Kết quả:** Tổng 75 mẫu đưa vào nghiên cứu, cho kết quả K. pneumoniae kháng hoàn toàn với các kháng sinh piperacillin/tazobactam, cefuroxime, ceftazidime, ciprofloxacin, cefotaxime, hoặc chỉ còn nhạy cảm ở tỷ lệ thấp (<10%) với kháng sinh ceftriaxone, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacin, levofloxacin. Một số kháng sinh như gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole và tigecycline còn nhạy ở tỷ lệ từ 17,3% đến 60,0%. Tỷ lệ đề kháng với ceftazidime/avibactam của K. pneumoniae là 58,7% và MIC > 256 μ g/ml là 58,7%. **Kết luận:** Trong quá trình điều trị, xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn đối với các loại kháng sinh, đặc biệt với kháng sinh mới

¹Bệnh viện huyện Bình Chánh

²Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

³Bệnh viện Chợ Rẫy

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Ngọc Châu

Email: ngocchau030883@gmail.com

Ngày nhận bài: 6.11.2023

Ngày phản biện khoa học: 18.12.2023

Ngày duyệt bài: 9.01.2024