

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO BỘ KIT REALTIME PCR ĐA MỖI PHÁT HIỆN MỘT SỐ TÁC NHÂN GÂY BỆNH LÂY TRUYỀN QUA ĐƯỜNG TÌNH DỤC THƯỜNG GẶP TẠI HÀ NỘI

Hoàng Hải Yến¹, Nguyễn Thị Thu Hương¹, Phạm Thế Vương¹,
Nguyễn Thị Vân Anh¹, Lê Thị Nga¹, Nguyễn Tuấn Quý¹,
Trần Khánh Chi², Trần Tuấn Anh³, Nguyễn Thị Sim¹, Nguyễn Mạnh Trí¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: 1) Xây dựng quy trình và chế tạo bộ kit Realtime PCR đa mỗ phát hiện một số tác nhân vi khuẩn, nấm gây bệnh lây truyền qua đường tình dục thường gặp ở quy mô phòng thí nghiệm từ dịch phết cổ tử cung. 2) Xác định tỷ lệ nhiễm một số tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục thường gặp ở phụ nữ khám phụ khoa tại Hà Nội. **Đối tượng:** 9 mẫu chuẩn từ Vircell; 135 mẫu đã được khẳng định kết quả xét nghiệm bằng bộ kit thương mại PANA RealTyperTM STD (Panagene) và careGeneTM STD-12 (Wellsbio); 200 mẫu bệnh phẩm dịch phết cổ tử cung của những phụ nữ viêm âm đạo đến khám tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội từ tháng 8/2023 đến tháng 5/2024. **Phương pháp:** Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm kết hợp mô tả cắt ngang. **Kết quả:** Giới hạn phát hiện (LOD) của bộ kit realtime PCR đa mỗ trong khoảng từ 1 – 88,81 bản sao/μl với độ chính xác đạt 100%. Khả năng phát hiện 9 tác nhân của bộ kit realtime PCR đa mỗ tương đồng với bộ kit thương mại PANA RealTyperTM STD và careGeneTM STD-12. Trong đó tác nhân *U. parvum* chiếm tỉ lệ cao nhất (41,5%), tiếp theo là *C. albicans* chiếm 19,5%. Các tác nhân còn lại chiếm tỉ lệ thấp hơn từ 12,0% đến 1,5%. **Kết luận:** Xây dựng thành công bộ kit realtime PCR đa mỗ có đủ điều kiện để phát hiện đồng thời 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục từ dịch phết cổ tử cung, với độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương với bộ sinh phẩm PANA RealTyperTM STD kit (Panagene) và careGeneTM STD-12 kit (Wellsbio) đạt chứng chỉ CE-IVD; giới hạn phát hiện từ 1-88,81 bản sao/μl.

Từ khóa: bệnh lây truyền qua đường tình dục, realtime PCR đa mỗ, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. pallidum*, *H. ducreyi*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*; *U. parvum*, *C. albicans*.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REALTIME PCR ASSAY FOR DETECTING COMMON SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES PATHOGENS IN HANOI

Objective: 1) To establish a procedure and

fabricate a multiplex realtime PCR kit for the detection of common sexually transmitted bacterial and fungal pathogens at the laboratory scale. 2) Determine the infection rate of selected sexually transmitted pathogens in women undergoing gynecological examinations in Hanoi. **Subjects:** 9 standard samples from Vircell; 135 samples previously confirmed using the commercial PANA RealTyperTM STD kit (Panagene) and careGeneTM STD-12 (Wellsbio); 200 cervical swab specimens from women with vaginal inflammation visiting the Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital between August 2023 and May 2024. **Methods:** Laboratory experimental combined with cross-sectional description study. **Results:** The limit of detection (LOD) of the multiplex realtime PCR kit ranged from 1 to 88,81 copies/μl with an accuracy of 100%. The detection capability of the multiplex Realtime PCR kit for 9 pathogens is comparable to the commercial PANA RealTyperTM STD kit (Panagene) and careGeneTM STD-12 (Wellsbio). Among these pathogens, *U. parvum* has the highest prevalence (41.5%), followed by *C. albicans* at 19.5%. The remaining pathogens account for lower proportions ranging from 12.0% to 1.5%. **Conclusion:** A multiplex realtime PCR kit was successfully developed and validated for the simultaneous detection of 9 sexually transmitted pathogens with sensitivity and specificity equivalent to the PANA RealTyperTM STD kit (Panagene) and careGeneTM STD-12 (Wellsbio) certified CE-IVD; detection limit ranges from 1-88.81 copies/μl. **Keywords:** multiplex realtime PCR, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. pallidum*, *H. ducreyi*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*; *U. parvum*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng các tác nhân lây truyền qua đường tình dục (STIs) là một trong những bệnh cấp tính phổ biến nhất trên thế giới. Năm 2020, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) ước tính có 374 triệu ca nhiễm mới với 1 trong 4 bệnh lây truyền qua đường tình dục gồm: Chlamydia trachomatis (129 triệu), Neisseria gonorrhoeae (82 triệu), Treponema pallidum (7,1 triệu) và Trichomonas vaginalis (156 triệu). Tại Việt Nam, theo số liệu thống kê của Viện Da liễu Trung ương, có hơn 300.000 ca mắc mới các bệnh lây truyền tình dục trong năm 2015, tuy nhiên con số thực tế có thể lên tới 1-2 triệu ca mỗi năm. Các bệnh STIs có thể gây ra các tình trạng cấp tính như viêm cổ tử cung, viêm niệu đạo, lở loét bộ phận sinh dục và dẫn đến các biến chứng nghiêm trọng và di

¹Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

²Đại học Y Hà Nội

³Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Hải Yến

Email: trangnhi0109@gmail.com

Ngày nhận bài: 9.5.2024

Ngày phản biện khoa học: 20.6.2024

Ngày duyệt bài: 25.7.2024

chứng lâu dài, bao gồm bệnh viêm vùng chậu, chửa ngoài tử cung, vô sinh, đau vùng chậu mãn tính, bệnh thần kinh và tim mạch ở người lớn, tử vong sơ sinh, đẻ non, mù lòa hoặc tàn tật nặng ở trẻ sơ sinh và tăng nguy cơ nhiễm và lây truyền HIV. Có trên 30 loại vi khuẩn, vi rút, nấm và ký sinh trùng khác nhau có thể lây truyền qua đường tình dục, điều này làm cho việc lựa chọn phương pháp xét nghiệm chẩn đoán là một nhiệm vụ vô cùng khó khăn. Hiện tại, các xét nghiệm chẩn đoán truyền thống như xét nghiệm phát hiện kháng nguyên và xét nghiệm nuôi cấy có độ nhạy thấp, thời gian trả kết quả kéo dài và yêu cầu các vi sinh vật còn sống, do đó điều kiện vận chuyển mẫu phải rất chặt chẽ nếu không sẽ dẫn tới mẫu hỏng và không ra kết quả chính xác. Vì vậy, nên lựa chọn một loại xét nghiệm có độ chính xác cao giúp đơn giản hóa quy trình chẩn đoán, rút ngắn thời gian trả kết quả và có thể phát hiện được nhiều loại vi sinh vật gây bệnh trong cùng một phản ứng là hết sức cần thiết. Xét nghiệm sinh học phân tử sử dụng phương pháp PCR đa môi cho phép khắc phục được các nhược điểm của phương pháp truyền thống. Tuy nhiên, việc sử dụng các bộ kit thương mại trên thị trường để chẩn đoán các bệnh STIs có một số hạn chế nhất định như giá thành cao, thiếu tính chủ động về nguồn cung và thiếu tính linh hoạt khi lựa chọn các tác nhân vi sinh vật phù hợp với mô hình nhiễm bệnh STIs ở Việt Nam.

Xuất phát từ lý do trên, chúng tôi tiến hành đề tài: "Nghiên cứu chế tạo bộ kit Realtime PCR đa môi phát hiện một số tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục thường gặp tại Hà Nội". Nghiên cứu nằm trong khuôn khổ nhiệm vụ khoa học công nghệ được UBND Thành phố Hà Nội phê duyệt ngày 28/7/2022; số quyết định 2633/QĐ-UBND.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu nghiên cứu: 9 chủng vi khuẩn & nấm (Vircell) và 135 mẫu DNA của vi khuẩn và nấm gây bệnh qua đường tình dục (Neisseria

gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Treponema pallidum, Haemophilus ducreyi, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum; Ureaplasma parvum và Candida albicans); 200 mẫu bệnh phẩm dịch phết cổ tử cung của những phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ bị viêm sinh dục.

- **Tiêu chuẩn lựa chọn:** Các chủng/DNA được xếp loại thuộc nhóm các tác nhân gây bệnh qua đường tình dục và được xác định bằng realtime PCR, giải trình tự và so sánh trình tự gen với ngân hàng gen; Mẫu bệnh phẩm từ phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ (18-49 tuổi), đồng ý tham gia nghiên cứu, đang bị viêm sinh dục hoặc có các triệu chứng nghi ngờ mắc bệnh lây truyền qua đường tình dục

- **Tiêu chuẩn loại trừ:** Phụ nữ không thuộc độ tuổi sinh đẻ; Không đồng ý tham gia nghiên cứu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 8/2023 đến tháng 5/2024

- Địa điểm tiến hành: Trung tâm Sàng lọc, Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội.

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm kết hợp nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.3. Các quy trình tiến hành trong nghiên cứu

- Thiết kế các cặp môi và các đầu dò đặc hiệu cho 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục

- Xây dựng quy trình realtime PCR đa môi phát hiện 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục

- Đánh giá giới hạn phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit realtime PCR đa môi phát hiện 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục. Đối chiếu kết quả với bộ kit PANA RealTyper™ STD Kit (Panagene) và careGene™ STD-12 (Wellsbio), Hàn Quốc đã đạt chứng nhận chẩn đoán In-Vitro của châu Âu (CE-IVD).

- Số liệu thu thập được xử lý trên phần mềm thống kê y sinh học SPSS 20.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xây dựng quy trình realtime PCR đa môi

Bảng 3.1. Các cặp môi và đầu dò phát hiện 9 tác nhân STIs thường gặp

Tên môi/đầu dò	Trình tự (5'-3')	Chiều dài (bp)	T _m (°C)	Hairpin (ΔG)	Self-dimer (ΔG)
Realtime PCR 1 (Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum)					
N. gonorrhoeae qF	GGTCTTGGTTTCCAACAGGT	20	60	-1,19	-3,07
N. gonorrhoeae qR	GAGCTGGACGACTTGAAACA	20	60	0,13	-1,94
N. gonorrhoeae qP	CAGAGAGCCGAAGCAGAGCG	20	66	-1,43	-3,61
C. trachomatis qF	ATCATCTTTGCGGTTGCGTG	20	56,5	-1,04	-5,16

C. trachomatis qR	AGTACAAACGCCTAGGGTGC	20	57,3	-0,14	-1,34
C. trachomatis qP	CCTGTGACCTTCATTATGTCGGAG	24	64,5	-0,27	-3,61
T. pallidum qF	GCAGGTCATTATCGTGGTGTAC	21	54	-0,68	-1,94
T. pallidum qR	TGCAATCCATCCGTTTACAATC	21	56,5	0	-3,61
T. pallidum qP	CCCTCTTCTACTGGGCCACTACCTTC	26	61,2	-0,5	-3,07
Realtime PCR 2 (Candida albicans, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis)					
C. albicans qF	TTTATTGCTGTGGTGGTTGG	20	53,5	1,2	-3,14
C. albicans qR	TTTTCTGAGTGTGGATGTGTCC	22	55	-0,85	-1,57
C. albicans qP	CTCGGACAAAGAAAGCAACCAACC	24	58,7	0,31	-1,6
M. genitalium qF	ATACTGCCTTTGGGCTTGTT	20	54,8	-2,83	-3,14
M. genitalium qR	ATCCCATGGTGGTTTCACTT	20	54,3	-1,18	-3,07
M. genitalium qP	TTGAGAACTACCCACCAAGCTGAAAAA	27	58,6	0,67	-3,9
M. hominis qF	GGCGCCACTAAAAGATGAGG	20	56,1	0,17	-3,14
M. hominis qR	CAATGTGGCCGTTTCACTCTC	20	56,3	1,34	-1,95
M. hominis qP	TCATAGTCTTGGTGGGCCATTACCTC	26	60	-0,89	-1,95
Realtime PCR 3 (Haemophilus ducreyi, Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum)					
H. ducreyi qF	GTAGCACGAAGGACTTGCTC	20	55,7	-1,66	-1,6
H. ducreyi qR	CCCCCTCCATAAGCCAGATT	20	56,7	0,82	-1,47
H. ducreyi qP	ACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATCT	25	60,1	0,59	-1,6
U. parvum qF	GCAGCTGAAGACTTATTGCACG	22	56,7	-0,62	-3,61
U. parvum qR	AACTTCGCCAATACGTCCCATA	22	56,3	-0,28	3,61
U. parvum qP	ATGGGTGCAATTTCAATTATGTCATCAGATACA	33	58,6	0,26	-3,05
U. urealyticum qF	GGAAGGTGTAGATAGAGGTTGG	24	55,3	-0,25	-1,95
U. urealyticum qR	TGTAAATTGGCTGTACAGAAA	24	54,8	-1,95	-1,94
U. urealyticum qP	TCCAAGTTGAAGTTACTTTCCAGATGGT	29	59,6	-0,23	-4,88

Nhận xét: Trình tự các cặp mồi và đầu dò được thiết kế trên dựa trên trình tự chuẩn từ GenBank (NCBI) có accession number tương ứng như sau: N. gonorrhoeae (CP003910.1), C. trachomatis (CP015307.1), T. pallidum (CP021113.1), C. albicans (AJ251858.1), M. genitalium (KP318806.1), M. hominis (AJ002269.1), H. ducreyi (NR_044741.1), U. parvum (AF085731.2), U. urealyticum (AF085720.2). Các đầu dò sử dụng tiêu chuẩn quencher phức hợp "ZEN/Iowa Black" của IDT. Chiều dài của các mồi từ 20 đến 24 nucleotide; Tm từ 53,5 đến 60. Chiều dài của đầu dò từ 20 đến 33 nucleotide; Tm từ 58,6 đến 66. Các chỉ số hairpin (ΔG) của cả mồi và đầu dò đều > -2 và self-dimer (ΔG) đa số đều > -5 .

3.2. Kết quả đánh giá quy trình realtime PCR đa mồi

Bảng 3.2. Kết quả đánh giá quy trình realtime PCR đa mồi và đối chiếu với bộ sinh phẩm PANA RealTyper™ STD (Panagene) và careGene™ STD-12 (Wellsbio) (n=135)

Tác nhân	Dương tính (n=55)		Âm tính (n=80)		Độ nhạy	Độ đặc hiệu
	A	B	A	B		
N. gonorrhoeae	15	15	80	80	100	100
C. trachomatis	19	19	80	80	100	100
T. pallidum	0	0	80	80	-	-
C. albicans	11	11	80	80	100	100

M. genitalium	8	8	80	80	100	100
M. hominis	4	4	80	80	100	100
H. ducreyi	0	0	80	80	-	-
U. parvum	17	17	80	80	100	100
U. urealyticum	2	2	80	80	100	100

Ghi chú: A: PANA RealTyper™ STD kit (Panagene) và careGene™ STD-12 (Wellsbio) đạt chứng chỉ CE-IVD; phát hiện 13 tác nhân nguy cơ cao lây bệnh đường sinh dục gồm: Neisseria gonorrhoea, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma genitalium, Treponema pallidum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, Trichomonas vaginalis, Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Haemophilus ducreyi, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2.

B: Kit Realtime PCR đa mồi.

Nhận xét: Độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình realtime PCR đa mồi được tính toán riêng cho từng tác nhân và được thực hiện trên 135 mẫu (55 mẫu dương tính ít nhất 1 tác nhân và 80 mẫu âm tính với cả 9 tác nhân). Kết quả được tính toán và đối chiếu song song với bộ kit thương mại PANA RealTyper™ STD kit - Panagene (Hàn Quốc) đạt chứng chỉ CE-IVD. Tỷ lệ phát hiện mẫu dương tính của bộ kit chế tạo tương đồng với bộ kit thương mại. Độ nhạy và độ đặc hiệu của 7 tác nhân: Neisseria gonorrhoea, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma parvum,

Mycoplasma hominis, Candida albicans đạt 100%. Hai tác nhân Treponema pallidum và Haemophilus ducreyi chưa có mẫu bệnh phẩm dương tính.

Bảng 3.3. Kết quả đánh giá giới hạn phát hiện (LOD)

Tác nhân	Số lần lặp lại mẫu chứng chuẩn				LOD (bản sao/ μ l)
	10 ³	10 ²	10	1	
N. gonorrhoeae	20/20	20/20	20/20	19/20	1
C. trachomatis	20/20	20/20	20/20	19/20	1
T. pallidum	20/20	20/20	19/20	10/20	9,801
C. albicans	20/20	20/20	19/20	4/20	9,994
M. genitalium	20/20	20/20	19/20	6/20	9,974
M. hominis	20/20	20/20	19/20	7/20	9,954
H. ducreyi	20/20	20/20	19/20	4/20	9,994
U. parvum	20/20	20/20	19/20	3/20	9,997
U. urealyticum	20/20	20/20	6/20	1/20	88,81

Nhận xét: Dải nồng độ mẫu chuẩn dương gồm: 10³, 10², 10 và 1 bản sao/ μ l của mỗi tác nhân được dùng làm khuôn cho phản ứng realtime PCR. Lặp lại phản ứng 20 lần đối với mỗi nồng độ. LOD tương ứng của mỗi tác nhân là: N. gonorrhoeae (1 bản sao/ μ l), C. trachomatis (1 bản sao/ μ l); T. pallidum (9,801 bản sao/ μ l), C. albicans (9,994 bản sao/ μ l), M. genitalium (9,974 bản sao/ μ l), M. hominis (9,954 bản sao/ μ l), H. ducreyi (9,994 bản sao/ μ l), U. parvum (9,997 bản sao/ μ l) và U. urealyticum (88,81 bản sao/ μ l).

3.3. Tỷ lệ nhiễm 9 tác nhân lây truyền qua đường tình dục

Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm các tác nhân của đối tượng nghiên cứu (n=200)

Tác nhân	Số lượng	
	n	%
N. gonorrhoeae	3	1,5
C. trachomatis	11	5,5
T. pallidum	0	0
C. albicans	39	19,5
M. genitalium	4	2
M. hominis	24	12
H. ducreyi	0	0
U. parvum	83	41,5
U. urealyticum	20	10

Nhận xét: Kết quả xét nghiệm 200 mẫu bệnh phẩm phát hiện 7 tác nhân có mẫu bệnh phẩm dương tính, 2 tác nhân còn lại là T. pallidum và H. ducreyi không có mẫu dương tính. Trong đó, nhiễm U. parvum chiếm tỉ lệ cao nhất (41,5%), tiếp theo là C. albicans chiếm 19,5%. Các tác nhân còn lại chiếm tỉ lệ thấp hơn: M. hominis (12%), U. urealyticum (10%), C. trachomatis (5,5%), M. genitalium (2%), N. gonorrhoeae (1,5%).

Bảng 3.5. Kết quả phân bố các tác nhân ở đối tượng nghiên cứu (n=200)

Kết quả	Tác nhân	Số lượng					
		n	%	n	%		
Âm tính		81	40,5	81	40,5		
	C. trachomatis	3	1,5	71	35,5		
	C. albicans	14	7				
	M. genitalium	1	0,5				
	M. hominis	8	4				
	U. parvum	42	21				
	U. urealyticum	3	1,5				
	C. albicans và U. parvum	15	7,5				
	C. albicans và U. urealyticum	1	0,5				
	C. trachomatis và M. genitalium	1	0,5				
	C. trachomatis và M. hominis	1	0,5				
	C. trachomatis và U. parvum	1	0,5				
	C. trachomatis và U. urealyticum	1	0,5				
	M. genitalium và U. urealyticum	1	0,5				
M. hominis và U. parvum	7	3,5					
M. hominis và U. urealyticum	1	0,5					
U. parvum và U. urealyticum	5	2,5					
Dương tính	C. albicans, M. hominis, U. parvum	2	1	34	17,0		
	C. albicans, M. hominis, U. urealyticum	1	0,5				
	N. gonorrhoeae, C. albicans, U. parvum	1	0,5				
	C. albicans, U. parvum, U. urealyticum	4	2				
	M. hominis, U. parvum, U. urealyticum	1	0,5				
	N. gonorrhoeae, C. trachomatis, U. parvum	2	1				
	M. genitalium, M. hominis, U. parvum	1	0,5				
	C. trachomatis, M. hominis, U. parvum, U. urealyticum	1	0,5				
	1	0,5	1			0,5	
	C. trachomatis, C. albicans, M. hominis, U. parvum, U. urealyticum	1	0,5			1	0,5
Dương tính				12	6		
	C. albicans, U. parvum, U. urealyticum	4	2				
	M. hominis, U. parvum, U. urealyticum	1	0,5				
	N. gonorrhoeae, C. trachomatis, U. parvum	2	1				
	M. genitalium, M. hominis, U. parvum	1	0,5				
	C. trachomatis, M. hominis, U. parvum, U. urealyticum	1	0,5				
	1	0,5	1			0,5	
	C. trachomatis, C. albicans, M. hominis, U. parvum, U. urealyticum	1	0,5			1	0,5

Nhận xét: 81 trường hợp âm tính với cả 9 tác nhân (40,5%), 71 trường hợp chỉ dương tính 1 tác nhân (35,5%), 34 trường hợp dương tính 2 tác nhân (17%), 12 trường hợp dương tính 3 tác nhân (6%), chỉ có 1 trường hợp dương tính 4 tác nhân (0,5%) và 1 trường hợp dương tính 5 tác nhân (0,5%).

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này là một trong những nhiệm vụ khoa học công nghệ quan trọng của UBND Thành phố Hà Nội, hướng đến việc tự chủ về mặt công nghệ trong chẩn đoán bệnh. Thông qua việc phát triển các bộ kit xét nghiệm các tác nhân gây bệnh qua đường tình dục thường gặp trên địa bàn Hà Nội. Nghiên cứu đã lựa chọn và thiết kế 3 quy trình realtime PCR đa mỗi để phát hiện 9 tác nhân lây truyền qua đường tình dục thường gặp. Cơ sở của việc thiết kế là trình tự gen tham chiếu chuẩn từ ngân hàng gen (GenBank-NCBI), hai ứng dụng thiết kế mỗi là Primer-BLAST được phát triển bởi NCBI và Primer3 được phát triển bởi Viện Y khoa Howard Hughes. Các môi và đầu dò thiết kế được đánh giá đặc tính vật lý bằng công cụ OligoAnalyzer (IDT). Các đầu dò trong nghiên cứu theo tiêu chuẩn quencher phức hợp "ZEN/Iowa Black" của IDT. Loại đầu dò này có ưu điểm vượt trội về việc tăng cường độ tín hiệu điểm cuối và giảm nhiễu huỳnh quang nền. Chiều dài, T_m, chỉ số hairpin (ΔG) của các môi và đầu dò đều đạt tiêu chuẩn đảm bảo các môi không kết cặp tạo cấu trúc kẹp tóc và bắt cặp chéo ảnh hưởng tiêu cực đến phản ứng realtime PCR [1]. Đối với một quy trình realtime PCR tiêu chuẩn với 40 chu kỳ phản ứng thì khoảng chu kỳ ngưỡng từ 16 đến 20 năm ở giai đoạn sớm, tín hiệu rõ ràng cho việc phát hiện và khẳng định tác nhân mục tiêu [2],[3]. Chu kỳ ngưỡng (Ct) của 9 tác nhân dao động từ 17 đến 20. Như vậy, có thể thấy Ct trong nghiên cứu khá lý tưởng cho một quy trình xét nghiệm dựa trên realtime PCR. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy hiệu quả sự phối hợp của nhiều môi, đầu dò trong một phản ứng realtime PCR; hiệu quả tăng cường độ tín hiệu điểm cuối và giảm nhiễu huỳnh quang nền của chuẩn đầu dò quencher phức hợp như đã đề cập ở trên.

Độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình realtime PCR đa mỗi được tính toán trên 135 mẫu và đối chiếu so sánh với bộ kit thương mại PANA RealTyper™ STD kit (Panagene) và careGene™ STD-12 (Wellsbio) đạt chứng chỉ CE-IVD. Kết quả cho thấy tỉ lệ phát hiện mẫu dương tính tương đồng so với bộ sinh phẩm thương mại với cả 9 tác nhân. Như vậy, khả năng phát hiện 9 tác nhân của bộ quy trình realtime PCR đa mỗi tương đương hoàn toàn với bộ sinh phẩm thương mại PANA RealTyper™ STD kit. Độ nhạy và độ đặc hiệu đối với 7 tác nhân *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Candida albicans* đạt 100%.

Hai tác nhân *Treponema pallidum* và *Haemophilus ducreyi* chưa có mẫu bệnh phẩm dương tính.

Một trong những thông số có ý nghĩa quan trọng luôn được cung cấp kèm theo bộ kit chẩn đoán bệnh là giới hạn phát hiện của bộ kit hay quy trình xét nghiệm. Hiểu một cách đơn giản thì giới hạn phát hiện là nồng độ thấp nhất mà phương pháp xét nghiệm có thể phát hiện ra nhưng không cần định lượng chính xác nồng độ. Nghiên cứu sử dụng hướng dẫn xác nhận giới hạn phát hiện với bộ công cụ tính Analyse-it (Analyse-it Software, Ltd). Theo tiêu chí này, thử nghiệm giới hạn phát hiện tiến hành với dải nồng độ mẫu chuẩn dương: 10³, 10², 10 và 1 bản sao/ μ l. Thực hiện lặp lại phản ứng 20 lần đối với mỗi nồng độ. Kết quả đánh giá giới hạn phát hiện của bộ kit realtime PCR đa mỗi tương đối khả quan với khả năng phát hiện tốt ở nồng độ 10 bản sao/ μ l cho cả 9 tác nhân. Đối với bộ sinh phẩm thương mại PANA RealTyper™ STD (CE-IVD, Panagene, Hàn Quốc), nhà sản xuất báo cáo ngưỡng phát hiện LOD đối với 13 tác nhân (trong đó có 9 tác nhân của bộ kit trong nghiên cứu này) là 5x10¹ bản sao/ μ l. Nghiên cứu của tác giả Bui HTV đã báo cáo quy trình realtime PCR đa mỗi có giá trị LOD đối với *N. gonorrhoeae* là 18,6; *C. trachomatis* là 37,2, *C. albicans* là 15,5, *M. genitalium* là 57,8 và *M. hominis* là 24,5 bản sao/phản ứng [5]. Năm 2019, Xiao-Mei Hu và cộng sự báo cáo giá trị LOD của 9 chủng vi khuẩn là 200 bản sao/phản ứng [6]. Như vậy có thể thấy rằng ngưỡng phát hiện của bộ kit realtime PCR đa mỗi tương đương so với một số báo cáo trước đây và với ngưỡng phát hiện của bộ sinh phẩm CE-IVD.

Bộ kit realtime PCR đa mỗi được áp dụng để khảo sát 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục ở 200 phụ nữ đến khám phụ khoa tại bệnh viện Phụ sản Hà Nội từ 8/2023 đến 5/2024. Kết quả cho thấy có 7/9 loại tác nhân được tìm thấy trong các mẫu nghiên cứu, với tỉ lệ nhiễm chung lên tới 59,5%. Trong đó, 35,5% mẫu nhiễm một loại tác nhân và 17% mẫu nhiễm đồng thời hai loại tác nhân, mẫu nhiễm đồng thời ba chiếm 6%; Các mẫu nhiễm đồng thời bốn và năm tác nhân chiếm tỉ lệ 1%. Trong đó, tỷ lệ nhiễm các tác nhân *U. parvum*, *M. hominis* và *C. albicans* là phổ biến hơn cả.

Năm 2015, Campos báo cáo nghiên cứu ở 302 phụ nữ Brazil, cho thấy tỉ lệ nhiễm các tác nhân tương ứng là: *M. hominis* (31,8%) và *M. genitalium* (28,1%), *N. gonorrhoeae* (42,4%) và *C. trachomatis* (1,7%) [7]. Trong một nghiên cứu hồi cứu khác của Sarier 2019, thực hiện trên 171 bệnh nhân Thổ Nhĩ Kỳ, sự phân bố của các

tác nhân như sau: *C. trachomatis* (22,9%), *N. gonorrhoeae* (21,7%), *M. genitalium* (10,5%), *M. hominis* (3,7%), *C. albicans* (1,8%); với 14% và 2,9% bệnh nhân nhiễm đồng thời hai và ba loại tác nhân [8].

Tỉ lệ nhiễm *Mycoplasma* trong nghiên cứu của chúng tôi tương đương với nghiên cứu của Bui HTV với tỉ lệ nhiễm *M. genitalium* là 0,94% và tỉ lệ nhiễm *M. hominis* là 10,28% [5]; cũng tương đương nghiên cứu của Sarier (2019) với tỉ lệ của hai vi khuẩn này lần lượt là *M. genitalium* (10,5%) và *M. hominis* (3,7%) [8]. Tỉ lệ này thấp hơn so với nghiên cứu của Campos (2015), cho thấy tỉ lệ nhiễm 2 chủng *Mycoplasma* là: *M. genitalium* (28,1%) và *M. hominis* (31,8%) [7]. Như vậy có thể thấy rằng, đặc điểm phân bố của các tác nhân trong nghiên cứu này cũng có những điểm tương đồng và khác biệt so với một số nghiên cứu đã công bố trước đây.

V. KẾT LUẬN

Xây dựng thành công bộ kit realtime PCR đa môi có đủ điều kiện để xét nghiệm phát hiện đồng thời 9 tác nhân lây truyền qua đường tình dục, với độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương với bộ sinh phẩm PANA RealTyper™ STD kit (Panagene, Hàn Quốc) đạt chứng chỉ CE-IVD; giới hạn phát hiện từ 1-88,81 bản sao/ μ l. Phát hiện 59,5% (119/200) trường hợp dương tính với 1-7 tác nhân, 40,5% (81/200) trường hợp âm tính. Tỷ lệ nhiễm *U. parvum* chiếm tỷ lệ cao

nhất là 41,5% (83/200), 35,5% (71/200) các trường hợp dương tính với 1 tác nhân. 2 tác nhân không phát hiện mẫu dương tính là *T. pallidum* và *H. ducreyi*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Real-time qPCR Guide:** Assay Design, Data Analysis, Troubleshooting IDT (2024).
2. **Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, et al.** Performance of the Abbott RealTime CT/NG for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3236-3243.
3. **Performance of the cobas CT/NG Test Compared to the Aptima AC2 and Viper CTQ/GCQ.** Assays for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Journal of Clinical Microbiology* (2024).
4. **qPCR Probes PrimeTime IDT.** Integrated DNA Technologies (2024).
5. **Bui HTV, Bui HT, Chu SV, et al** (2023). Simultaneous real-time PCR detection of nine prevalent sexually transmitted infections using a pre-designed double-quenched TaqMan probe panel. *PLoS One*, 18(3), e0282439.
6. **Hu XM, Xu JX, Jiang LX, et al** (2019). Design and Evaluation of a Novel Multiplex Real-Time PCR Melting Curve Assay for the Simultaneous Detection of Nine Sexually Transmitted Disease Pathogens in Genitourinary Secretions. *Front Cell Infect Microbiol.* 9, 382.
7. **Campos GB, Lobão TN, Selis NN, et al** (2015). Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in urogenital tract of Brazilian women. *BMC Infect Dis.* 15(1), 60.
8. **Sarier M** (2019). Prevalence of Polymicrobial Infection in Urethritis. *J Urol Surg.* 6(3), 180-183.

THỰC TRẠNG THIẾU KẼM Ở HỌC SINH TẠI MỘT SỐ TRƯỜNG THCS THÀNH PHỐ THÁI NGUYÊN, TỈNH THÁI NGUYÊN VÀ MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN

Lê Thị Hương Lan^{1,2}, Trần Thị Hồng Vân¹, Phạm Thanh Hải^{1,2}, Nguyễn Công Hoàng^{1,2}, Nguyễn Tiến Dũng^{1,2}, Nguyễn Thị Thanh Tâm¹, Đào Minh Nguyệt^{1,2}, Hoàng Văn Biên¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu mô tả cắt ngang đã được tiến hành trên 324 học sinh với mục tiêu: Mô tả thực trạng thiếu kẽm và một số yếu tố liên quan ở học sinh tại một số trường Trung học cơ sở tại thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên. **Kết quả:** Tỷ lệ thiếu kẽm chung ở

học sinh tại một số trường Trung học cơ sở là 71,6%. Có mối liên quan giữa giới tính đến tình trạng thiếu kẽm ở học sinh tại một số trường Trung học cơ sở, thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên. **Kết luận:** Tỷ lệ thiếu kẽm ở học sinh tại một số trường Trung học cơ sở trên địa bàn thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên ở mức cao.

Từ khóa: Học sinh Trung học cơ sở, thiếu kẽm, yếu tố liên quan, thành phố Thái Nguyên.

SUMMARY

THE SITUATION OF ZINC DEFICIENCY IN STUDENTS AT SOME SECONDARY SCHOOLS IN THAI NGUYEN CITY, THAI NGUYEN PROVINCE AND SOME RELATED FACTORS

¹Trường Đại học Y-Dược, Đại học Thái Nguyên

²Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên

Chịu trách nhiệm chính: Lê Thị Hương Lan

Email: lanhuong.bvtutn@gmail.com

Ngày nhận bài: 8.5.2024

Ngày phản biện khoa học: 19.6.2024

Ngày duyệt bài: 25.7.2024