

XÂY DỰNG QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ SANGER CHẨN ĐOÁN CÁC BIẾN THỂ DI TRUYỀN TRÊN GEN DPYD LIÊN QUAN ĐẾN TÍCH LŨY ĐỘC TÍNH THUỐC FLUOROPYRIMIDINES

Nguyễn Ước Nguyễn¹, Nguyễn Đăng Khoa¹, Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn¹

TÓM TẮT

Giới thiệu: Một số biến thể di truyền trên gen DPYD đã được chứng minh làm suy giảm hoặc mất hoàn toàn hoạt tính enzym dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), qua đó làm tăng đáng kể nguy cơ ngộ độc nghiêm trọng, thậm chí tử vong ở bệnh nhân ung thư điều trị bằng fluoropyrimidines. Các biến thể này phân bố trải rộng ở nhiều vùng gen khác nhau, khiến quy trình xét nghiệm phải tiến hành nhiều phản ứng PCR riêng lẻ trước khi giải trình tự gen. Nghiên cứu này đề xuất giải pháp Multiplex PCR kết hợp giải trình tự Sanger nhằm phát hiện đồng thời các biến thể quan trọng trên gen. Cách tiếp cận này giúp rút gọn số bước thao tác, rút ngắn thời gian trả kết quả, mang lại hiệu quả kinh tế và đặc biệt hỗ trợ ra quyết định lâm sàng kịp thời, đảm bảo an toàn cho người bệnh. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình giải trình tự Sanger chẩn đoán các biến thể di truyền trên gen DPYD liên quan đến tích lũy độc tính thuốc fluoropyrimidines. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** (I) Nghiên cứu thực nghiệm các bước thiết kế 4 cặp đoạn mỗi đặc hiệu và tối ưu hóa điều kiện phản ứng Multiplex PCR khuếch đại 04 vùng trình tự khác nhau trên gen DPYD có chứa các biến thể di truyền quan tâm: rs3918290 (DPYD*2A), rs55886062 (DPYD*13), rs67376798 (c.2846A>T) và rs56038477 (c.1236G>A); (II) tối ưu hóa lượng sản phẩm Multiplex PCR cho quá trình giải trình tự Sanger; (III) toàn bộ các bước kỹ thuật được áp dụng trên 05 mẫu DNA bộ gen người tình nguyện nhằm đánh giá chất lượng quy trình. **Kết quả:** Đã thiết kế thành công 04 cặp đoạn mỗi đặc hiệu giúp khuếch đại 4 biến thể quan tâm. Phản ứng Multiplex PCR được tối ưu hóa trong thể tích 25 µL như sau: Q5® High-Fidelity Master Mix (1X), DNA khuôn 50 ng, và cặp mỗi với nồng độ tối ưu lần lượt là HaploB3: 0,125 µM; DPYD2A: 0,25 µM; DPYD13: 0,5 µM; D949V: 0,125 µM; thêm nước tinh sạch không chứa nuclease đến đủ thể tích. Chu trình nhiệt: 1 chu kỳ (98 °C 30 s); 35 chu kỳ (98°C 10 s, 58°C 15 s, 72°C 30 s); 1 chu kỳ (72 °C 60 s). Lượng sản phẩm Multiplex PCR tối thiểu từ 20 ng đảm bảo việc giải trình tự Sanger đạt chất lượng. Tất cả 05/05 mẫu DNA bộ gen người tình nguyện có kết quả giải trình tự đạt chất lượng theo khuyến cáo nhà sản xuất và vị trí biến thể quan tâm đều có kết quả QV20+, cho phép dễ dàng kết luận kiểu gen. **Kết luận:** Đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình giải trình tự Sanger để xác định bốn

biến thể quan trọng trên gen DPYD. **Từ khóa:** DPYD, rs3918290, rs55886062, rs67376798, rs56038477, Multiplex PCR, Giải trình tự Sanger.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A SANGER SEQUENCING PROTOCOL FOR DETECTING DPYD GENE VARIANTS ASSOCIATED WITH FLUOROPYRIMIDINE-INDUCED TOXICITY

Introduction: Several genetic variants in the DPYD gene have been shown to reduce or completely eliminate the activity of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), markedly increasing the risk of severe, and sometimes fatal, toxicity in cancer patients treated with fluoropyrimidines. These variants are distributed across multiple regions of the gene, requiring numerous individual PCR reactions prior to Sanger sequencing. This study proposes a Multiplex PCR combined with Sanger sequencing approach to simultaneously detect key DPYD variants. This strategy simplifies the workflow, shortens turnaround time, reduces overall cost, and provides timely clinical information to ensure patient safety. **Objective:** To establish a Sanger sequencing protocol for the detection of DPYD gene variants associated with fluoropyrimidine-induced toxicity. **Materials and Methods:** (i) Experimental optimization of four pairs of specific primers and development of a Multiplex PCR reaction amplifying four DPYD regions harboring clinically relevant variants: rs3918290 (DPYD 2A), rs55886062 (DPYD 13), rs67376798 (c.2846A>T), and rs56038477 (c.1236G>A); (ii) optimization of PCR product quantity for high-quality Sanger sequencing; (iii) application of the complete protocol to five genomic DNA samples from healthy volunteers for validation. **Results:** Four specific primer pairs were successfully designed to amplify the target DPYD regions containing the variants of interest. The optimized 25 µL Multiplex PCR reaction consisted of: Q5® High-Fidelity Master Mix (1×), 50 ng genomic DNA template, and primer concentrations as follows: HaploB3, 0.125 µM; DPYD2A, 0.25 µM; DPYD13, 0.5 µM; D949V, 0.125 µM; with nuclease-free water added to final volume. The thermal cycling conditions were: initial denaturation at 98°C for 30 s; 35 cycles of 98°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 30s; followed by a final extension at 72°C for 60s. A minimum of 20 ng Multiplex PCR product was sufficient to achieve high-quality Sanger sequencing results. All five volunteer samples produced sequencing chromatograms meeting manufacturer quality standards, with variant positions achieving QV20+ scores, enabling unambiguous genotype determination. **Conclusion:** A Sanger sequencing workflow was successfully established and optimized for the detection of four clinically significant DPYD

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn

Email: nhntuan@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 3.10.2025

Ngày phản biện khoa học: 13.11.2025

Ngày duyệt bài: 4.12.2025

variants. This method offers a practical and efficient approach for preemptive pharmacogenetic testing in fluoropyrimidine therapy. **Keywords:** DPYD, rs3918290, rs55886062, rs67376798, rs56038477, Multiplex PCR, Sanger sequencing.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một số biến thể di truyền trên gen DPYD như rs3918290 (DPYD*2A), rs55886062 (DPYD*13), rs67376798 (c.2846A>T) và rs56038477 (c.1236G>A) đã được chứng minh làm suy giảm hoặc mất hoàn toàn hoạt tính enzym dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), qua đó làm tăng đáng kể nguy cơ ngộ độc nghiêm trọng thậm chí tử vong ở bệnh nhân ung thư điều trị bằng fluoropyrimidines [1, 2]. Các hướng dẫn quốc tế về Dược – Di truyền học đã nhấn mạnh vai trò việc xét nghiệm biến thể di truyền DPYD trong cá thể hóa phác đồ điều trị, giảm biến chứng do ngộ độc và nâng cao tính an toàn khi sử dụng thuốc fluoropyrimidines [3,4]. Trong thực hành lâm sàng, giải trình tự Sanger vẫn được coi là “tiêu chuẩn vàng” nhờ độ chính xác cao. Tuy nhiên, việc các biến thể di truyền có ý nghĩa lâm sàng trên gen DPYD phân bố trải rộng, khiến việc phân tích phải tiến hành nhiều phản ứng PCR riêng lẻ trước khi giải trình tự gen, làm gia tăng gánh nặng chi phí và kéo dài thời gian phân tích. Vì vậy, việc phát triển quy trình Multiplex PCR cho phép khuếch đại đồng thời các vùng gen mang biến thể trước khi giải trình tự Sanger, góp phần rút ngắn quy trình, tối ưu chi phí và đặc biệt mở rộng khả năng ứng dụng trong lâm sàng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Từ tháng 01- 08/2025, tại Trung tâm Nghiên cứu Y sinh (TTNCYS), Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch (Trường ĐHYKPNT).

Phương pháp nghiên cứu: Vật liệu nghiên cứu: DNA bộ gen người tình nguyện nồng độ khoảng 10 ng/μL với độ tinh sạch OD_{260nm}/OD_{280nm} trong khoảng 1,8-2,0. Đối tượng nghiên cứu: Các đặc điểm kỹ thuật của quy trình bao gồm: (i) Đặc điểm các đoạn môi; (ii) Chương

trình nhiệt và thành phần phản ứng Multiplex PCR; (iii) Lượng sản phẩm Multiplex PCR đầu vào thích hợp để tham gia phản ứng giải trình tự chuỗi; (iv) Các chỉ số nội kiểm tra chất lượng kỹ thuật giải trình tự Sanger và đặc điểm điện di đồ tại vùng gen chứa biến thể. Các bước tiến hành:

- DNA bộ gen được ly trích từ máu tĩnh mạch bằng bộ TopPure Blood DNA Extraction Kit (ABT), chấp nhận mẫu có nồng độ ≥ 10,0 ng/μL và OD₂₆₀/280 = 1,8–2,0.

- Các đoạn môi đặc hiệu khuếch đại vùng chứa biến thể rs3918290, rs55886062, rs67376798 và rs56038477 trên gen DPYD (GRCh38) được thiết kế bằng Primer-BLAST và kiểm tra bằng OligoAnalyzer và BLAST. Tiêu chí lựa chọn: độ dài 18–25 bp, Tm 58–62°C (ΔTm ≤2°C), GC 40–60%, không hình thành cấu trúc thứ cấp mạnh hoặc lai chéo ở 3’OH.

- Phản ứng Multiplex PCR được tối ưu bằng Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NEB) trên Mastercycler X50 (Eppendorf) nhằm tạo 4 sản phẩm đặc hiệu, rõ ràng, không có băng phụ khi điện di agarose 1,5%

- Sản phẩm được tinh sạch bằng ExoSAP-IT (Thermo) và chuẩn bị ở các mức 20–80 ng để xác định lượng tối ưu cho giải trình tự.

- Giải trình tự hai chiều được thực hiện bằng BigDye Terminator v3.1 Kit (ThermoFisher) và phân tích trên Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) sau tinh sạch ethanol và hòa tan trong Hi-Di™ Formamide.

- Dữ liệu được xử lý bằng Sequencing Analysis v6.0 và Variant Reporter v2.0 (Applied Biosystems); tiêu chí chấp nhận gồm QV20+ ≥90%, LOR ≥90%, Trace Score >40, đồ thị tín hiệu tại vị trí biến thể rõ và nhất quán giữa hai chiều, phù hợp trình tự chuẩn DPYD.

- Quy trình được lặp lại trên 5 mẫu DNA khác, do kỹ thuật viên độc lập thực hiện để đánh giá tính ổn định.

Đạo đức trong nghiên cứu: Chứng nhận chấp thuận đạo đức trong nghiên cứu y sinh, số 1184/TĐHYKPNT-HĐĐĐ ngày 22/10/2024 của Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Trình tự các đoạn môi được thiết kế

Bảng 1. Thông tin đoạn môi thiết kế cho phản ứng Multiplex PCR

TT	Biến thể	Tên đoạn môi	Trình tự môi (5’-3’)	Độ dài (Nu)	Nhiệt độ nóng chảy	%GC	Độ dài sản phẩm (bp)
1	rs56038477	HaploB3 (F)	TGGTAACTGAACTCAGGTTTGG	23	58,8	43,5	703
		HaploB3 (R)	CTGTTCCAACACTCTGCCTCAT	23	60,1	47,8	
2	rs3918290	DPYD*2A (F)	TACCAGCCACATACAGTG	18	58,4	50,0	580

		DPYD*2A (R)	AATGTGAGAAGGGACCTC	18	58,1	50,0	
3	rs55886062	DPYD*13 (F)	ATGGGACAGAAAGGAAGG	18	58,5	50,0	474
		DPYD*13 (R)	GGATGCTGTGTTGAAGTG	18	58,2	50,0	
4	rs67376798	D949V (F)	CCAGTCTCCCAAGTTAATATAATGC	25	57,6	40,0	380
		D949V (R)	AGAGCAATATTTGGCACCCTG	22	59,2	45,4	

Chú thích: F: Mỗi xuôi (forward); R: Mỗi ngược (reverse)

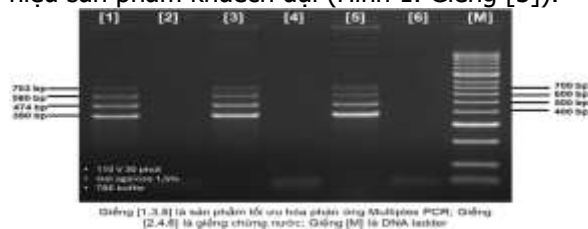
3.2. Điều kiện phản ứng Multiplex PCR.

Quy trình tối ưu hóa phản ứng Multiplex PCR được thực hiện dựa trên điều kiện chuẩn của cặp mỗi DPYD2A (58°C, 0,5 µM) đã được nhóm nghiên cứu công bố trước đó [5]. Các cặp mỗi còn lại (Bảng 1) được khảo sát ở các nồng độ 0,5; 0,25; 0,125 µM. Kết quả Simplex PCR cho thấy HaploB3 (0,125 µM), DPYD13 (0,5 µM) và D949V (0,125 µM) tạo sản phẩm đặc hiệu, không xuất hiện băng phụ (dữ liệu không trình bày).



Hình 1. Kết quả tối ưu hóa nồng độ đoạn mỗi DPYD2A trong phản ứng Multiplex PCR

Phản ứng Multiplex PCR ban đầu được thiết lập trong 25 µL, gồm Q5® High-Fidelity Master Mix (1X), 20 ng DNA khuôn và các mỗi ở nồng độ ban đầu: HaploB3 0,125 µM; DPYD2A 0,5 µM; DPYD13 0,5 µM; D949V 0,125 µM. Chu trình nhiệt: 98°C 30 s; 35 chu kỳ (98°C 10s, 58°C 15s, 72°C 30 s); 72°C 60s. Phản ứng cho sản phẩm đặc hiệu nhưng tín hiệu HaploB3 yếu, trong khi DPYD2A khuếch đại mạnh (Hình 1. Giếng [1]). Sau khi giảm nồng độ mỗi DPYD2A xuống 0,25 µM, các băng đạt tín hiệu cân bằng (Hình 1. Giếng [2]). Ở mức 0,125 µM, không ghi nhận tín hiệu sản phẩm khuếch đại (Hình 1. Giếng [3]).



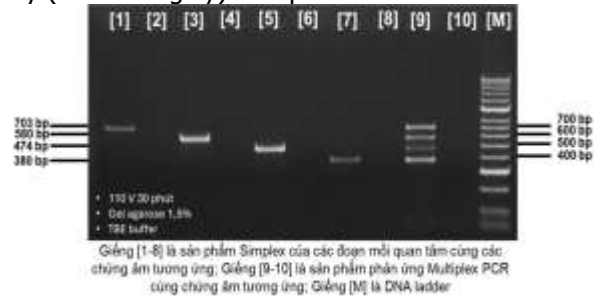
Bảng 2. Kết quả thực hiện giải trình tự Sanger ở mức sản phẩm Multiplex PCR

Biến thể	Đoạn mỗi	Kiểu gen	Mức 20 ng (%LOR, %QV20+, Tracescore)	Mức 40 ng (%LOR, %QV20+, Tracescore)	Mức 80 ng (%LOR, %QV20+, Tracescore)
rs56038477	HapB3 (F)	G/G	89,0%; 91,0%; 48	83,9%; 87,2%; 39	91,5%; 85,0%; 42
	HapB3 (R)		96,0%; 93,0%; 48	86,3%; 89,5%; 46	91,0%; 93,0%; 47
rs3918290	DPYD*2A (F)	G/G	89,0%; 87,5%; 49	60,3%; 65,0%; 41	57,0%; 79,0%; 31

Hình 2. Kết quả tối ưu hóa lượng DNA mạch khuôn trong phản ứng Multiplex PCR

Lượng DNA khuôn được tối ưu ở 50 ng, 100 ng và 200 ng (lần lượt tại giếng [1,3,5]), trong đó mức 50 ng cho tín hiệu rõ, đồng đều và tiết kiệm mẫu (Hình 2).

Như vậy, lặp lại phản ứng Multiplex PCR trong thể tích 25 µL, bao gồm Q5® High-Fidelity Master Mix (1x), 50 ng DNA khuôn, và nồng độ mỗi: HaploB3 0,125 µM; DPYD2A 0,25 µM; DPYD13 0,5 µM; D949V 0,125 µM. Chu trình nhiệt gồm: 98 °C trong 30 giây; 35 chu kỳ (98 °C 10 giây, 58 °C 15 giây, 72 °C 30 giây); 1 chu kỳ (72 °C 60 giây) kết quả như Hình 3 sau:



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm Simplex PCR và Multiplex PCR khuếch đại các vùng gen DPYD quan tâm

Nhận xét: Kết quả điện di trên gel agarose 1,5% (110 V, 30 phút) cho thấy các phản ứng simplex PCR và multiplex PCR đều tạo sản phẩm đặc hiệu với kích thước đúng thiết kế (Bảng 1). Giếng chứng âm không xuất hiện băng, loại trừ nguy cơ nhiễm chéo. Phản ứng Multiplex PCR cho bốn băng khuếch đại rõ ràng, không có băng phụ hay primer-dimer, với nồng độ sản phẩm trung bình trước tinh sạch đạt 26,5 ± 1,8 ng/µL. Như vậy, quy trình Multiplex PCR khuếch đại đồng thời bốn vùng gen DPYD quan tâm đã được tối ưu thành công, sẵn sàng cho bước giải trình tự Sanger.

3.3. Tối ưu lượng DNA đầu vào phản ứng giải trình tự chuỗi sản phẩm PCR

	DPYD*2A (R)		91,0%; 91,0%; 47	72,9%; 82,9%; 47	68,0%; 85,1%; 43
rs55886062	DPYD*13 (F)	T/T	88,0%; 90,2%; 48	88,2%; 85,9%; 43	71,0%; 87,0%; 47
	DPYD*13 (R)		96,0%; 89,9%; 41	85,2%; 85,9%; 43	77,0%; 85,0%; 43
rs67376798	D949V (F)	A/A	83,0%; 89,0%; 41	83,7%; 87,8%; 44	82,0%; 82,0%; 47
	D949V (R)		90,0%; 87,0%; 48	85,5%; 90,0%; 48	81,0%; 87,0%; 41

Nhận xét: Lượng sản phẩm Multiplex PCR sau khi tinh sạch với ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo) cho kết quả khoảng 23 (\pm 2,2) ng/ μ L. Kết quả phân tích cho thấy các kiểu gen xác định được từ cả hai chiều đọc đều trùng khớp và nhất quán là dạng wild-type. Trong đó, kết quả giải trình tự rs56038477 và rs67376798 duy trì tín hiệu ổn định ở cả ba mức DNA, trong khi kết quả rs55886062 có xu hướng giảm chất lượng tại 80 ng, gợi ý khả năng gây nhiễu khi nồng độ cao. Kết quả rs3918290 dao động lớn nhất, đặc biệt ở chiều xuôi suy giảm rõ rệt khi tăng DNA, cho thấy mức 20 ng phù hợp hơn cho biến thể này. Tuy nhiên, nhìn chung, cả ba mức DNA đều cho phép xác định chính xác kiểu gen. Như vậy, nhóm nghiên cứu lựa chọn mức sản phẩm Multiplex PCR tối thiểu cần sử dụng là 20 ng.

3.4. Đánh giá quy trình giải trình tự Sanger trên 05 mẫu DNA người tình nguyện. Kết quả Multiplex PCR và giải trình tự Sanger trên 05 mẫu DNA người tình nguyện như sau:



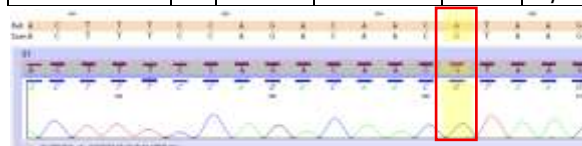
Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm Multiplex PCR của 05 người tình nguyện trên gel agarose 1,5% ở điều kiện 110V trong 30 phút

Nhận xét: Giếng chứng âm [6] không xuất hiện băng, loại trừ nguy cơ nhiễm chéo. Sản phẩm Multiplex PCR [1-5] đều cho sản phẩm đặc hiệu với kích thước đúng thiết kế

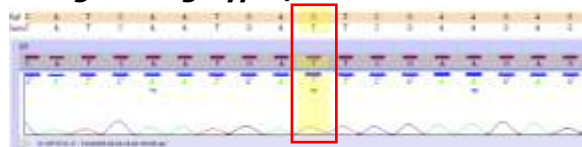
Bảng 3. Kết quả giải trình tự Sanger trên 05 mẫu DNA người tình nguyện

Biến thể	TT	%LOR	%QV20+	Trace score	Kiểu gen
rs56038477	1	97%	90%	45	G/G
	2	96.7%	93%	48	G/G
	3	96.5%	94%	47	G/G
	4	96.7%	90%	46	G/G
	5	92.6%	91%	46	G/G
rs3918290	1	96.5%	89.5%	49	G/G
	2	94%	87.5%	49	G/G

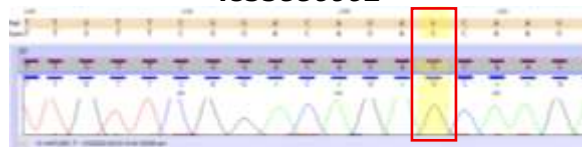
rs55886062	3	92.7%	92.6%	50	G/G
	4	93%	92.2%	50	G/G
	5	95.5%	91.9%	50	G/G
	1	86.5%	87%	45	T/T
	2	95%	89.8%	41	T/T
rs67376798	3	93.8%	89.9%	47	T/T
	4	94.3	89.5%	41	T/T
	5	94.5%	86.8%	33	T/T
	1	72%	92.3%	44	A/A
	2	92.1%	91.7%	48	A/A
rs67376798	3	94.5%	87.7%	47	A/A
	4	89%	92.0%	46	A/A
	5	94%	88.8%	47	A/A



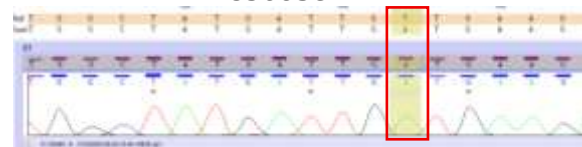
Hình 5: Kết quả giải trình tự Sanger cho kiểu gen đồng hợp G/G biến thể rs3918290



Hình 6: Kết quả giải trình tự Sanger cho kiểu gen đồng hợp T/T biến thể rs55886062



Hình 7: Kết quả giải trình tự Sanger cho kiểu gen đồng hợp G/G biến thể rs56038477



Hình 8: Kết quả giải trình tự Sanger cho kiểu gen đồng hợp A/A biến thể rs67376798

Nhận xét: Kết quả giải trình tự Sanger trên 05 mẫu DNA tình nguyện đều đạt tiêu chí chất lượng (bảng 3) với hình ảnh điện di đồ rõ ràng, không có hoặc ít sóng nhiễu. Điều này khẳng

định quy trình Multiplex PCR kết hợp Sanger ổn định, khả thi và có thể lặp lại trên nhiều mẫu cũng như giữa các kỹ thuật viên khác nhau với độ chính xác và tin cậy cao. Tất cả tình nguyện viên đều có kết quả kiểu gen wild-type biến thể di truyền quan tâm.

IV. BÀN LUẬN

So với phương pháp Simplex PCR khuếch đại riêng lẻ từng biến thể, việc triển khai Multiplex PCR trong nghiên cứu này cho phép khuếch đại đồng thời bốn vùng trình tự đích của gen DPYD trong cùng một phản ứng duy nhất, qua đó khắc phục hạn chế của giải trình tự Sanger – vốn chỉ đọc chính xác các đoạn DNA ngắn dưới 1.000 bp. Yếu tố kỹ thuật cốt lõi của Multiplex PCR nằm ở khả năng phối hợp hài hòa giữa các cặp mồi trong cùng một hệ phản ứng, nhằm duy trì trạng thái cân bằng động học khuếch đại các amplicon. Nếu chỉ một cặp mồi có nhiệt độ bắt cặp hoặc nồng độ lệch đáng kể, hoặc hình thành cấu trúc thứ cấp hay lai chéo, phản ứng có thể bị suy giảm hiệu suất và gây mất cân bằng giữa các sản phẩm PCR. Do đó, mồi cần được thiết kế với nhiệt độ Tm tương đồng, tránh lai chéo tại đầu 3'OH, đồng thời được đánh giá in silico để sàng lọc các "xung đột" tiềm ẩn trước khi thực nghiệm. Các công cụ như Primer3, OligoAnalyzer giúp phân tích giá trị ΔG , Tm, tương tác chéo và tính đặc hiệu của từng mồi, hỗ trợ tối ưu thiết kế ban đầu.

Tuy nhiên, do phản ứng PCR vẫn chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như nồng độ Mg^{2+} , hoạt tính enzyme và chất lượng DNA khuôn, việc thẩm định in vitro vẫn là bước bắt buộc để kiểm chứng khả năng khuếch đại đặc hiệu và độ cân bằng sản phẩm. Giai đoạn hiệu chỉnh này giúp tinh chỉnh nồng độ mồi, điều kiện phản ứng và xác lập ngưỡng tối ưu, tạo nên chu trình tối ưu hóa hai bước – kết hợp giữa thiết kế in silico và thực nghiệm in vitro – nhằm rút ngắn thời gian thử nghiệm, giảm chi phí hóa chất, đồng thời nâng cao độ đặc hiệu và độ tin cậy của phản ứng Multiplex PCR.

Khi bốn phản ứng Simplex PCR được tích hợp thành một phản ứng Multiplex duy nhất, lượng hóa chất và vật tư tiêu thụ giảm trung bình khoảng 75%, thời gian thao tác được rút ngắn khoảng 17% do giảm số lần chuẩn bị và xử lý mẫu. Việc cắt giảm đáng kể thao tác pipet giúp giảm sai số tích lũy và tăng tính nhất quán giữa các kỹ thuật viên. Dù số phản ứng giải trình tự Sanger vẫn giữ nguyên (bốn phản ứng cho bốn vùng gen), tổng chi phí xét nghiệm giảm khoảng 35–40% so với quy trình Simplex PCR

truyền thống nhờ tiết kiệm công chuẩn bị, tinh sạch và quản lý mẫu. Bên cạnh lợi ích kinh tế, quy trình Multiplex PCR còn góp phần nâng cao hiệu quả vận hành phòng xét nghiệm, đặc biệt phù hợp với các cơ sở y tế có nguồn lực hạn chế, nơi cần tối ưu chi phí mà vẫn đảm bảo độ tin cậy và chất lượng kết quả.

Độ chính xác của quy trình được khẳng định qua kết quả giải trình tự hai chiều trùng khớp hoàn toàn với trình tự tham chiếu, cùng các chỉ số %LOR, %QV20+ và Trace score ổn định trong khoảng 20–80 ng DNA đầu vào. Quy trình cho thấy khả năng tái lập tốt giữa các lần chạy và giữa các kỹ thuật viên khác nhau, phản ánh mức độ chuẩn hóa cao. Dẫu vậy, nghiên cứu hiện mới được tiến hành trên DNA người tình nguyện khỏe mạnh với quy mô mẫu còn hạn chế; việc mở rộng đánh giá trên bệnh nhân điều trị fluoropyrimidines, kết hợp với các nền tảng hiện đại như NGS hoặc microarray, cùng việc tham gia chương trình ngoại kiểm, là hướng cần thiết để xác thực giá trị ứng dụng lâm sàng. Tổng thể, Multiplex PCR kết hợp Sanger là giải pháp kỹ thuật khả thi, tiết kiệm và có độ tin cậy cao, góp phần nội địa hóa công nghệ dược – di truyền tại Việt Nam, hướng đến mục tiêu cá thể hóa điều trị ung thư và nâng cao chất lượng chăm sóc bệnh nhân trong kỷ nguyên y học chính xác.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng và tối ưu quy trình giải trình tự Sanger để xác định biến thể rs3918290, rs55886062, rs67376798 và rs56038477 trên gen DPYD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Gmeiner, W. H.** (2021). A narrative review of genetic factors affecting fluoropyrimidine toxicity. *Precision cancer medicine*, 4, 38.
2. **Díaz-Villamarín, X., Martínez-Pérez, M., Nieto-Sánchez, et al** (2024). Novel Genetic Variants Explaining Severe Adverse Drug Events after Clinical Implementation of DPYD Genotype-Guided Therapy with Fluoropyrimidines: An Observational Study. *Pharmaceutics*, 16(7), 956.
3. **Amstutz, U., Henricks, L. M., Offer, S. M., Barbarino, et al** (2018). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 103(2), 210-216.
4. **Henricks, L. M., Lunenburg, C. A., de Man, F. M., Meulendijks, et al** (2018). DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *The Lancet Oncology*, 19(11), 1459-1467.

5. Nguyễn Ước Nguyễn, Nguyễn Minh Hà, Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn và cộng sự (2024). Xây dựng quy trình real-time PCR High Resolution Melting xác định biến thể DPYD*2A trên gen DYPD liên quan chuyển hoá thuốc Fluoropyrimidines. Tạp Chí Y học Việt Nam, 534(1). <https://doi.org/10.51298/vmj.v534i1.8093>
6. Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in ecology and evolution*, 3(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x>
7. Babu, L., Reddy, P., Murali, H.S. et al. Optimization and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of prominent foodborne pathogens of Enterobacteriaceae. *Ann Microbiol* 63, 1591–1599 (2013). <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0622-0>.
8. Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*, 16(1), 47–51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>.

THỰC TRẠNG KIẾN THỨC, THỰC HÀNH LIỆU PHÁP TẬP THỞ Ở NGƯỜI BỆNH CHẤN THƯƠNG LỒNG NGỰC CÓ DẪN LƯU KHOANG MÀNG PHỔI TẠI HAI BỆNH VIỆN HẠNG I- TP HẢI PHÒNG NĂM 2025

Nguyễn Thị Huế¹, Đỗ Thị Thu Hiền¹

WITH CHEST TRAUMA UNDERGOING CHEST DRAINAGE IN TWO TIER-1 HOSPITALS IN HAI PHONG CITY, 2025

Objective: To assess the knowledge and practice of breathing therapy among patients with chest trauma and pleural drainage at two Grade I hospitals in Hai Phong City in 2025. **Subjects and Methods:** A cross-sectional descriptive study was conducted on 78 patients with chest trauma and pleural drainage at the Department of Cardiothoracic Surgery, Viet Tiep Friendship Hospital, and the Department of Neurosurgery, Thoracic-Vascular-Spine Surgery, Hai Duong General Hospital from January to May 2025. Patients' knowledge was measured using 10 questions related to breathing therapy, with each correct answer scoring 1 point. Practice was evaluated based on three breathing exercises: pursed-lip breathing, diaphragmatic breathing, and balloon-blowing exercises. Knowledge and practice levels were classified as "good" if the total score was $\geq 70\%$, and "not good" if $< 70\%$. **Results:** The majority of patients were male (78.2%), with an average age of 51.24 ± 11.6 years. The proportion of patients with good knowledge of breathing therapy was 46.7%, while those with good practice in all three breathing techniques accounted for 33.3%. **Conclusion:** The proportion of patients with good knowledge and practice of breathing therapy remains low. There is a need to strengthen health education and guidance on breathing exercises to prevent complications following pleural drainage surgery. **Keywords:** Knowledge, practice, breathing therapy, patients, pleural drainage, Level I hospital located in Hai Phong City, Vietnam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chấn thương lồng ngực là một nhóm các cấp cứu ngoại khoa thường gặp, chiếm khoảng 5-6% trong cấp cứu ngoại [1]. Ở người bệnh (NB) chấn thương ngực thường có các nguy cơ, tổn thương mà nếu không có biện pháp theo dõi, điều trị và chăm sóc tốt có thể gây nguy hiểm

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát kiến thức, thực hành liệu pháp tập thở ở người bệnh chấn thương lồng ngực có dẫn lưu khoang màng phổi tại hai bệnh viện hạng I-TP Hải Phòng năm 2025. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 78 người bệnh chấn thương lồng ngực có dẫn lưu khoang màng phổi tại khoa Phẫu thuật Lồng ngực Tim mạch - Bệnh viện Hữu Nghị Việt Tiệp và khoa Phẫu thuật Thần kinh Lồng ngực Mạch máu và Cột sống Bệnh viện Đa khoa Hải Dương từ tháng 1 năm 2025 đến tháng 5 năm 2025. Kiến thức của người bệnh được đo lường qua 10 câu hỏi về liệu pháp tập thở, mỗi câu trả lời đúng được tính 1 điểm. Thực hành được đánh giá qua 3 thang tập thở gồm tập thở chúm môi, tập thở cơ hoành và tập thở thổi bóng. Kiến thức, thực hành liệu pháp tập thở được chia thành 2 loại: Kiến thức, thực hành tốt khi tổng điểm $\geq 70\%$. Kiến thức, thực hành chưa tốt khi tổng điểm $< 70\%$. **Kết quả:** Đa số người bệnh là nam giới, chiếm 78,2%. Tuổi trung bình của người bệnh là $51,24 \pm 11,6$. Tỷ lệ người bệnh có kiến thức tốt về liệu pháp tập thở là 46,7%. Tỷ lệ người bệnh có thực hành tốt về cả 3 liệu pháp tập thở là 33,3%. **Kết luận:** Tỷ lệ người bệnh có kiến thức và thực hành tốt về liệu pháp tập thở chưa cao. Cần tăng cường tư vấn giáo dục sức khỏe và hướng dẫn người bệnh tập thở để phòng tránh biến chứng sau phẫu thuật dẫn lưu khoang màng phổi. **Từ khóa:** Kiến thức, thực hành, liệu pháp tập thở, người bệnh, dẫn lưu khoang màng phổi, Bệnh viện hạng I- TP Hải Phòng.

SUMMARY

THE STATUS OF KNOWLEDGE AND PRACTICE OF BREATHING EXERCISES IN PATIENTS

¹Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương
Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Huế
Email: huenguyennguyen89@gmail.com
Ngày nhận bài: 25.9.2025
Ngày phản biện khoa học: 20.10.2025
Ngày duyệt bài: 28.11.2025