

sau phẫu thuật chiếm cao nhất trong tuần đầu chiếm 27%, sau 6 tháng tỉ lệ biến chứng là 0%. Điều trị sau mổ: 63% điều trị I¹³¹, 37% theo dõi đơn thuần.

Thời gian theo dõi trung bình 35 tháng, 100% bệnh nhân theo dõi vẫn còn sống đến thời điểm kết thúc nghiên cứu, sống thêm không bệnh 5 năm đạt 85,1%. Thời gian sống thêm không bệnh 5 năm ngắn hơn ở nhóm có xâm lấn so với nhóm không xâm lấn, nhóm > 45 tuổi so với nhóm < 45 tuổi, nhóm kháng I¹³¹ so với nhóm không kháng I¹³¹.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR.** A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comment]. *Cancer*. 1998;83(12):2638-2648.
2. **Edga SB BD,** Compton CC *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th Ed. Springer. 2010:1 - 646.
3. **David SC.** Management of thyroid disease. Chapter 5 (Thyroid Nodule and multinodular goiter). Informa Healthcare USA, New York; 2008.
4. **Lang BH, Lee GC, Ng CP, Wong KP, Wan KY, Lo CY.** Evaluating the morbidity and efficacy of reoperative surgery in the central compartment for persistent/recurrent papillary thyroid carcinoma. *World journal of surgery*. 2013;37(12):2853-2859.
5. **Schuff KG, Weber SM, Givi B, Samuels MH, Andersen PE, Cohen JI.** Efficacy of nodal dissection for treatment of persistent/recurrent papillary thyroid cancer. *The Laryngoscope*. 2008;118(5):768-775.
6. **Tufano RP, Bishop J, Wu G.** Reoperative central compartment dissection for patients with recurrent/persistent papillary thyroid cancer: efficacy, safety, and the association of the BRAF mutation. *The Laryngoscope*. 2012;122(7):1634-1640.
7. **Trần Ngọc Hải.** Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị của bệnh ung thư giáp trạng tái phát tại bệnh viện K. Đại học Y Hà Nội, Hà Nội. 2008.
8. **Mazzaferri EL, Jhiang SM.** Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American journal of medicine*. 1994;97(5):418-428.
9. **Nixon IJ, Whitcher MM, Palmer FL, et al.** The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2012;22(9):884-889.

NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ THU HỒI DNA PHÔI THAI TỰ DO CỦA HAI BỘ TÁCH CHIẾT DNA THƯƠNG MẠI

Đặng Tiến Trường¹, Quãn Ngọc Hà¹,
Phạm Văn Quyết¹, Nguyễn Duy Bắc¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá hiệu quả thu hồi DNA tự do phôi thai (cffDNA) của 2 bộ kit thương mại QIAamp Circulating Nucleic Acid và MagMAX Circulating DNA. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** mẫu huyết tương của thai phụ mang thai nam. Nghiên cứu so sánh hiệu quả thu hồi cfDNA của 2 quy trình tách chiết dựa trên tỷ lệ fetal fraction (FF) bằng phương pháp định lượng realtime PCR. **Kết quả:** Tỷ lệ FF trung bình của bộ kit QIAamp là 7,93%; FF trung bình của bộ kit MagMAX là 6,23%. Tỷ lệ FF trung bình của QIAamp cao gấp 1,27 lần so với MagMAX, nhưng sự khác biệt có không có ý nghĩa ($p=0,33$). Không có sự khác nhau về hiệu quả thu hồi cffDNA của bộ kit QIAamp và bộ kit MagMAX.

Từ khóa: cfDNA, cffDNA, MagMAX và QIAamp.

SUMMARY

RESEARCH ON EFFICIENCY RECOVERY OF CFFDNA OF TWO COMMERCIAL DNA KITS

¹Học Viện Quân y

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Duy Bắc

Email: Nguyenduybac76@gmail.com

Ngày nhận bài: 3.01.2022

Ngày phản biện khoa học: 28.2.2022

Ngày duyệt bài: 3.3.2022

Objective: To evaluate the efficiency of cell free fetal DNA (cffDNA) recovery of 2 commercial kits QIAamp Circulating Nucleic Acid and MagMAX Circulating DNA. **Subjects and research methods:** plasma samples of pregnant women with male fetuses. The study compared the efficiency of cfDNA recovery of two extraction procedures based on fetal fraction (FF) by quantitative real-time PCR. **Result:** The average FF of the QIAamp kit was 7.93%; The average FF of the MagMAX kit was 6.23%. The mean FF of QIAamp was 1.27 times higher than that of MagMAX, but the difference was not significant ($p=0.33$). **Conclusion:** There was no difference in the cffDNA recovery of the QIAamp kit and the MagMAX kit.

Keywords: cfDNA, cffDNA, MagMAX and QIAamp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm lấn NIPT là một trong những phương pháp phổ biến hiện nay trong phát hiện những bất thường di truyền bộ nhiễm sắc thể thai nhi. So với các phương pháp khác, NIPT ưu việt hơn do tính chính xác đến 99% với độ an toàn cao khi sử dụng cffDNA trong máu mẹ.

NIPT phân tích cffDNA trong huyết tương mẹ dựa trên phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (NGS). Tuy nhiên hàm lượng cffDNA trong

huyết tương lại rất thấp, chỉ chiếm từ 2% - 20% [2]. Tỷ lệ DNA tự do phôi thai trên DNA tự do trong huyết tương mẹ gọi là fetal fraction (FF). Để áp dụng NIPT, tỷ lệ FF phải trên 4% [3], tỷ lệ này quá thấp dẫn đến kết quả âm tính giả, từ đó phải thu mẫu và xét nghiệm lại. FF phụ thuộc vào nhiều yếu tố như tuổi thai, tuổi mẹ, chỉ số BMI,... Tuy nhiên, sinh phẩm phục vụ tách chiết cfDNA là một trong yếu tố quan trọng nhất. Hai nhóm công nghệ chính được sử dụng phổ biến hiện nay là cột lọc và hạt từ. Công nghệ cột lọc như của QIAamp được sử dụng phổ biến bởi độ tin cậy và hiệu quả tuy nhiên giá thành cao. Công nghệ hạt từ (bộ kit MagMAX) đang dần trở nên phổ biến do chi phí thấp hơn. Việc sử dụng bộ sinh phẩm có chi phí thấp, qui trình đơn giản hơn mà vẫn đảm bảo được hiệu quả thu hồi giúp đơn giản hóa qui trình NIPT, giảm giá thành và phù hợp với yêu cầu thực tiễn. Vì vậy, nghiên cứu nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả thu hồi cfDNA của 2 bộ kit thương mại QIAamp và MagMAX.

II. ĐỐI TƯỢNG, HÓA CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. 10 mẫu huyết tương của các thai phụ mang thai nam, tuổi thai từ 8 tuần tuổi đến 13 tuần tuổi. Mẫu huyết tương được tách sau đó được bảo quản ở - 80°C cho đến khi sử dụng. Các mẫu được thu thập tại Học viện Quân y.

2.2. Hóa chất nghiên cứu

Hóa chất tách chiết cfDNA: 2 bộ kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) và MagMAX Circulating DNA Kit (Thermo).

Hóa chất cho realtime PCR: 2X Quantitect Probe PCR Kit, QIAGEN, mỗi xuôi, mỗi ngược, probe của đoạn gen SRY và HBB (Integrated ADN Technologies (IDT)).

Thiết bị và máy móc: Realtime PCR Rotor - Gene Q (QIAGEN - Đức), hệ thống QIAvac 24 Plus (QIAGEN); giá từ SERVAMag (SERVA); bể ổn nhiệt (FAITHFUL); máy ly tâm lạnh Mikro 220R (Hettich); máy ủ (BOYN).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Bảng 1: Nồng độ cfDNA thu được từ 2 bộ kit

Bộ Kit	Nồng độ trung bình (ng/ μ L)	Nồng độ thấp nhất (ng/ μ L)	Nồng độ cao nhất (ng/ μ L)	p
QIAamp	23,69 \pm 15,5	6,45	52,12	p = 0,047
MagPure	10,57 \pm 2,1	6,38	12,95	

Kết quả nồng độ cfDNA thu được sau khi tách chiết 10 mẫu huyết tương cho thấy nồng độ cfDNA thu được từ các 2 bộ kit có sự khác biệt

Tách chiết mẫu huyết tương: 10 mẫu huyết tương được tách chiết lần lượt với 2 bộ kit mại QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) và MagMAX Circulating DNA Kit. Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cả 2 phương pháp đều sử dụng lượng mẫu đầu vào là 1mL huyết tương. Thể tích dung dịch đệm sử dụng thu hồi cfDNA là 50 μ L.

Phản ứng realtime PCR: Phản ứng realtime PCR nhằm khuếch đại 2 đoạn gen là SRY nằm trên NST Y (định lượng cffDNA) và đoạn gen nằm trên gen HBB (định lượng cfDNA).

Trình tự mỗi và probe gen SRY: Mỗi xuôi SRY-F: 5' - TCC TCA AAA GAA ACC

GTG CAT - 3'; mỗi ngược SRY-R: 5'- AGA TTA ATG GTT GCT AAG GAC TGG AT - 3'; probe: 5'-(FAM) CAC CAG CAG TAA CTC CCC ACA ACC TCT TT (TAMRA) - 3'.

Trình tự mỗi và probe gen HBB: Mỗi xuôi HBB - F: 5' - GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A - 3'; mỗi ngược HBB - R: 5' - CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG -3'; probe: 5' - (FAM) AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG (TAMRA) - 3'.

Quá trình realtime PCR được thực hiện theo chu trình như sau: Phản ứng PCR với tổng thể tích phản ứng là 25 μ L trong đó master mix: 12,5 μ L, mỗi SRY (xuôi, mỗi ngược, probe): (1:1:0,5) μ L và mỗi HBB (xuôi, mỗi, probe): (1:1:0,5) μ L; nước: 5 μ L; DNA tách chiết: 5 μ L. Chu trình nhiệt 1 chu kỳ: 95°C trong 15 phút, 50 chu kỳ: 94 °C - 15 giây, 60 °C - 1 phút.

Xử lý số liệu bằng phần mềm chuyên dụng của máy chạy realtime - PCR RotorGen Q - QIAGEN đã tích hợp sẵn và các thuật toán thống kê trên phần mềm số liệu Excel Microsoft Office.

Tính toán FF: FF được tính theo công thức sau: $FF = 2 \times C_{SRY} / C_{HBB}$ [1]. Trong đó, C_{SRY} là nồng độ cffDNA và C_{HBB} là nồng độ cfDNA trong huyết tương thai phụ.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

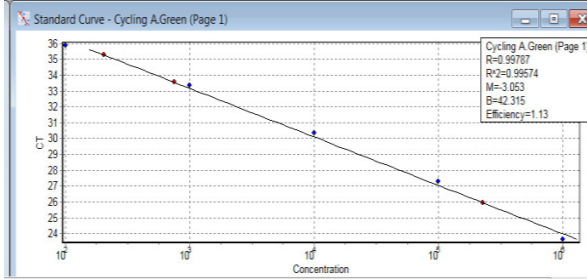
3.1. Kết quả tách chiết cfDNA. Sản phẩm DNA thu được sau khi tách chiết được xác định nồng độ bằng phương pháp đo NanoDrop. Nồng độ cfDNA thu được từ 2 bộ kit khác nhau được tóm tắt trong bảng 1.

lớn. Nồng độ cfDNA trung bình thu được từ bộ kit QIAamp là 23,69 ng/ μ L với dao động từ 6,45 - 52,12 ng/ μ L. Trong khi đó, bộ kit MagMAX cho

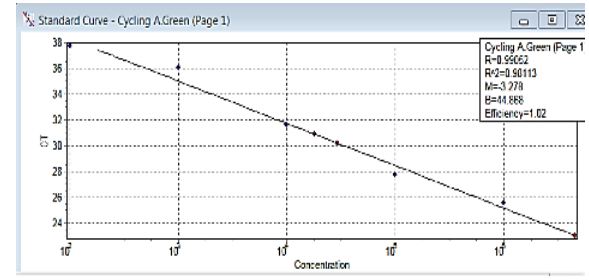
nồng độ cfDNA trung bình là 10,57 ng/μL, khoảng dao động từ 6,38 – 12,95 ng/μL. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,047. Như vậy, nồng độ cfDNA trung bình thu được từ bộ kit QIAamp cao hơn 2,24 lần so với bộ kit MagMAX.

3.2. Kết quả Realtime PCR

3.2.1. Đường chuẩn trong Realtime PCR.



A. gen SRY (NIS)- SD1



B. gen HBB(BG)- SD1

Hình 1: Hình ảnh kết quả tối ưu đường chuẩn của phản ứng RT-PCR

Đường chuẩn của cả 2 môi SRY và HBB đều cho tín hiệu tốt với kết quả hiệu suất PCR E = 113% (SRY) và E = 102 % (HBB). Hai hiệu suất này đều nằm trong khoảng chấp nhận được đối với mục đích nghiên cứu. Ngoài ra, hệ số tương quan R² của 2 môi cũng cho kết quả tuyến tính tốt với hệ số tương quan R² = 0,99 với mỗi SRY, so với mỗi HBB có R² = 0,9 thì độ tuyến tính là cao hơn. Sự chênh lệch này có thể là do trong quá trình pha loãng đường chuẩn, thao tác pipet của người làm thí nghiệm chưa chuẩn hoặc trong quá trình thực hiện phản ứng realtime PCR, người làm chưa cho đủ thể tích mẫu chuẩn nên R² không đạt được hiệu suất ≥ 0.99. Tuy nhiên, kết quả hệ số tương quan trên của cả 2 môi SRY và HBB là chấp nhận được.

3.2.2. Định lượng nồng độ gen SRY trong huyết tương thai phụ. Kết quả xác định số bản copies của gen SRY bằng hai bộ kit tách chiết được trình bày trong Bảng 2.

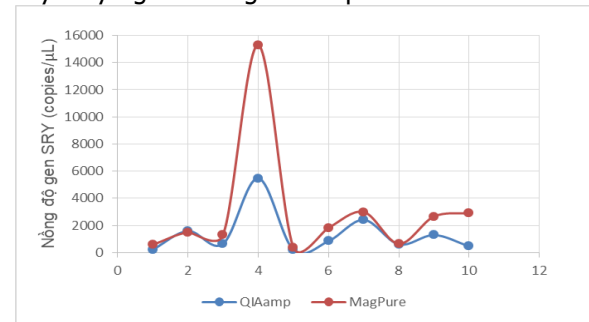
Bảng 2. Nồng độ SRY 10 mẫu của 2 bộ kit

Mẫu	Nồng độ SRY QIAamp (copies/μL)	Nồng độ SRY MagMAX (copies/ μL)	p
1	209	569	0,09
2	1590	1490	
3	641	1290	
4	5480	15300	
5	205	390	
6	842	1830	
7	2410	2990	
8	604	646	
9	1290	2660	
10	463	2910	

Nồng độ trung bình gen SRY của bộ kit

Sau khi tiến hành kiểm tra độ tinh khiết và nồng độ DNA, tiến hành thực hiện phản ứng realtime PCR theo chu trình đã được tối ưu với đường chuẩn là các các mẫu DNA chuẩn được pha loãng có nồng độ từ 10² đến 10⁶. Kết quả đường chuẩn được thể hiện dưới đây:

QIAamp 1373,4 copies/μL (SD = 1596,9), dao động từ 209 – 5480 copies/μL, thấp hơn kit MagMAX với 3007,50 copies/μL (SD = 4425,3), dao động từ 390 – 15300 copies/μL. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p = 0.009.



Hình 2. Phân bố nồng độ gen SRY của 10 mẫu DNA tách chiết bởi bộ 2 kit

3.3. So sánh tỷ lệ FF giữa 2 bộ kit MagMAX và QIAamp

Bảng 3. Tỷ lệ FF trung bình giữa 2 bộ kit

Bộ kit	Tỷ lệ FF			p
	N	\bar{X}	Khoảng dao động	
QIAamp	10	7,93%	3,24% - 20,78%	0,33
MagMAX	10	6,23%	1,39% - 13,73%	

Kết quả FF thu được sau khi thực hiện realtime PCR được trình bày ở Bảng 3.

Tỷ lệ FF trung bình của bộ kit QIAamp là 7,93% với độ dao động 3,24% - 20,78%. Trong khi đó, bộ kit MagMAX cho thấy tỷ lệ FF trung bình thấp hơn với 6,23% và khoảng dao động 1,39% - 13,73%. Tỷ lệ FF QIAamp cao gấp 1,27 lần so với MagPure nhưng không có ý nghĩa

thống kê. Điều đó cho thấy hiệu quả thu hồi của 2 bộ kit không có sự khác biệt. Kết quả nghiên cứu này có sự khác biệt với kết quả của Lương Bắc An năm 2018, nghiên cứu so sánh hiệu quả 3 quy trình tách chiết gồm công nghệ hạt từ, sử dụng bộ kit MagMAX circulating DNA và 2 phương pháp sử dụng công nghệ cột lọc gồm QIAamp Curculating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) và Quick-cfDNATMSerum & Plasma (Zymo Research). Kết quả cho thấy hàm lượng cfDNA thu được với bộ kit Zymo là thấp nhất, tiếp theo là hàm lượng cfDNA tách bằng bộ kit QIA và cao nhất là cfDNA được tách bằng kit MagMAX. Bộ kit Zymo có màng lọc chỉ giữ lại được các đoạn cfDNA có kích thước lớn hơn 100bp, do đó hiệu suất thu nhận cfDNA chưa thật tối ưu, đặc biệt là các đoạn cffDNA có kích thước ngắn <150 bp. Trong khi đó, bộ kit QIA có khả năng thu được các cfDNA có kích thước lớn hơn 75bp và có bổ sung RNA-carrier, do đó cfDNA giữ lại được nhiều hơn. Tuy nhiên, phân tích kích thước cfDNA cho thấy các đoạn có kích thước lớn 300bp được thu nhận khá nhiều, đây hầu hết là DNA genome của người mẹ, không có giá trị trong phân tích bất thường DNA thai. Sự tồn tại của cfDNA có kích thước lớn hơn 300bp có thể sẽ làm cho hàm lượng cffDNA thấp bất thường, tác động lớn tới kết quả phân tích. Ngoài ra, RNA Carrier được xem là một nhân tố ức chế hoạt tính một số enzym trong các phản ứng phân tích. Bên cạnh đó, phương pháp đánh giá của chúng

tôi tập chung vào các đoạn DNA đặc hiệu của thai nhi là SRY nên kết quả đánh giá cffDNA sẽ trung thực hơn so với phương pháp của nhóm tác giả nghiên cứu [4], [5].

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ FF trung bình kit QIAamp là 7,93%; của bộ kit MagMAX là 6,23%. Tỷ lệ FF trung bình của QIAamp cao gấp 1,27 lần so với MagMAX, nhưng sự khác biệt có không có ý nghĩa ($p=0,33$). Kết quả cho thấy không có sự khác nhau về hiệu quả thu hồi cffDNA của bộ kit QIAamp và bộ kit MagMAX.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Davalieva, Katarina, et al. (2006), "Non-invasive fetal sex determination using real-time PCR", The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 19(6), pp. 337-342.
2. Scott, Fergus Perry, et al. (2018), "Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy", The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 31(14), pp. 1865-1872.
3. Fiorentino, Francesco, et al. (2016), "The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods", Prenatal diagnosis. 36(4), pp. 304-311.
4. Sorber, L., et al., A comparison of cell-free DNA isolation kits: isolation and quantification of cell-free DNA in plasma. The journal of molecular diagnostics, 2017. 19(1): p. 162-168.
5. Lương Bắc An, Quách Thị Hoàng Oanh, Nguyễn Khắc Hán Hoan và cs (2018), So sánh hiệu quả thu nhận DNA tự do từ huyết tương thai phụ, Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh, tập 22, số 5.

NGHIÊN CỨU TÍNH KHÁNG KHÁNG SINH CỦA MỘT SỐ LOÀI VI KHUẨN GÂY BỆNH PHÂN LẬP ĐƯỢC TẠI BỆNH VIỆN SẢN NHI NGHỆ AN NĂM 2021

Tăng Xuân Hải*, Trần Minh Long*,
Nguyễn Văn Hùng*, Nguyễn Văn Tuấn**

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ phân bố các loại vi khuẩn gây bệnh phân lập được và đánh giá mức độ đề kháng kháng sinh của các vi khuẩn thường gặp. **Phương pháp:** Thiết kế nghiên cứu hồi cứu mô tả cắt ngang tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được từ các loại bệnh phẩm của bệnh nhân điều trị từ ngày 01/01/2021 đến ngày 30/09/2021 tại khoa Vi sinh và

các khoa lâm sàng của bệnh viện Sản Nhi Nghệ An. **Kết quả:** Tỷ lệ phân lập được vi khuẩn chung toàn viện là 11,4% với 25 chủng vi khuẩn gây bệnh. Tỷ lệ mẫu âm tính chiếm phần lớn 88,6%. Trong đó H. influenzae (29%) và S. aureus (26,8%) là 2 tác nhân thường gặp nhất chiếm hơn 50% số chủng vi khuẩn phân lập được tại bệnh viện. Bên cạnh đó, S. pneumoniae chiếm 12,5% và một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp khác là Klebsiella spp. (8,7%) (gồm chủ yếu là K. pneumoniae), Streptococcus agalactiae (5,4%), E. coli (5,3%), P. aeruginosa (3,8%), Candida spp. (2,7%). Các vi khuẩn H.influenzae, S. aureus, S. pneumoniae, Klebsiella spp., E. coli có tình trạng đề kháng kháng sinh cao trong khi P.aeruginosa còn nhạy cảm rất tốt với nhiều kháng sinh. **Kết luận:** Tác nhân thường gặp nhất là H.influenzae, S. aureus, S. pneumoniae, Klebsiella spp., E. coli và P.aeruginosa.

*Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An

**Trường Đại học Y khoa Vinh

Chịu trách nhiệm chính: Tăng Xuân Hải

Email: tuanminh1975@gmail.com

Ngày nhận bài: 4.01.2022

Ngày phản biện khoa học: 28.2.2022

Ngày duyệt bài: 4.3.2022