

khối viêm, rửa ổ bụng và đặt dẫn lưu ổ bụng sau mổ. Có 01 trường hợp phải chuyển mổ mở do tiểu khung viêm dính nặng, dính ruột, trực tràng vào tử cung, khi phẫu thuật nội soi gỡ dính có tổn thương trực tràng. Phải chuyển mổ mở để gỡ dính, khâu vết rách trực tràng, cắt hai phần phụ, lấy khối viêm, rửa ổ bụng, đặt dẫn lưu ổ bụng. Trường hợp này quá trình hậu phẫu người bệnh diễn biến thuận lợi không có biến chứng sau mổ.

Chúng tôi khảo sát tại thời điểm nghiên cứu bằng cách gọi điện trực tiếp cho người bệnh. Chúng tôi ghi nhận 11 trường hợp người bệnh còn triệu chứng đau bụng chiếm 10,5%, có 12,4% người bệnh có triệu chứng rối loạn kinh nguyệt và 9,5% người bệnh có triệu chứng ra khí hư bất thường. Không có người bệnh nào rối loạn đại tiểu tiện và không có trường hợp nào có biến chứng sau mổ. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hà, có 17 trường hợp người bệnh còn triệu chứng đau bụng, chiếm 10,7%, người bệnh có triệu chứng rối loạn kinh nguyệt chiếm 12,6%, người bệnh có triệu chứng ra khí hư bất thường chiếm 24,0% [1]. Nghiên cứu của Lê Kiều Trang, các triệu chứng sau phẫu thuật: ra khí hư bất thường 20%, rối loạn kinh nguyệt 12,3%, đau bụng 9,2% [2]. Tỷ lệ này ở nghiên cứu của Nguyễn Lê Minh là ra khí hư bất thường 3,8%, rối loạn kinh nguyệt 3,8%, đau bụng 9,6% [6].

V. KẾT LUẬN

Tổn thương hay gặp nhất là dính tiểu khung

(84,8%). Các hình thái tổn thương VTC cũng có tỷ lệ cao: viêm dính (85,7%), giãn (83,8%), úm (52,4%). Can thiệp gặp nhiều nhất gỡ dính 100,0%, có 81,0% các trường hợp phải dẫn lưu ổ bụng sau mổ. Cắt 2 VTC là can thiệp hay gặp nhất trên VTC chiếm 60,0%. Thời gian phẫu thuật trung bình là $78,36 \pm 28,69$ phút. Thời gian hậu phẫu trung bình $6,28 \pm 1,82$ ngày. Nhóm dùng phối hợp 2 kháng sinh chiếm tỷ lệ cao nhất là 55,2%, phối hợp 1 kháng sinh chiếm 28,6% và phối hợp 3 kháng sinh chiếm 16,2%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Hà (2019), Đánh giá kết quả nội soi viêm phần phụ tại bệnh viện phụ sản Trung ương trong 3 năm 2016-2018, Luận văn Thạc sĩ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội.
2. Lê Kiều Trang (2020), Nghiên cứu kết quả phẫu thuật viêm phần phụ tại khoa phụ sản bệnh viện Bạch Mai, Luận văn Thạc sĩ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội.
3. Sokalska A., Timmerman D., Testa A.C., et al. (2009). Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound examination for assigning a specific diagnosis to adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 34(4), 462–470.
4. Bontis J.N., Theodoridis T.D. (2006). Laparoscopic Management of Hydrosalpinx. *Ann N Y Acad Sci*, 1092(1), 199–210.
5. Zarei A., Al-Ghafri W., Tulandi T. (2009). Tubal Surgery. *Clin Obstet Gynecol*, 52(3), 344.
6. Nguyễn Lê Minh (2011), Đánh giá kết quả điều trị viêm phần phụ bằng phẫu thuật nội soi tại bệnh viện Phụ sản trung ương trong 4 năm 2007-2010, Luận văn tốt nghiệp bác sĩ nội trú Bệnh viện. Trường Đại học Y Hà Nội.

XÂY DỰNG KỸ THUẬT QPCR DÙNG CHẤT HUỖNH QUANG SYBR GREEN ĐỊNH LƯỢNG DNA EBV

Nguyễn Văn Thống², Ngô Quốc Đạt²,
Nguyễn Hưng Thịnh¹, Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn¹

TÓM TẮT

Giới thiệu: Định lượng nồng độ DNA của EBV trong huyết tương có thể được xem như là một dấu hiệu quan trọng giúp tiên lượng tình trạng bệnh tại từng thời điểm khác nhau trong quá trình điều trị. Hiện nay kỹ thuật qPCR có độ nhạy cao nhằm định lượng DNA EBV được ứng dụng phổ biến trong lâm

sàng. Nghiên cứu xây dựng quy trình kỹ thuật qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR GREEN định lượng DNA EBV nhằm tăng thêm sự lựa chọn cho các bác sĩ lâm sàng áp dụng phù hợp vào mục đích ứng dụng và điều kiện kinh tế. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình kỹ thuật qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR GREEN định lượng DNA EBV. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Xây dựng plasmid chứa đoạn gen BamHI-W của EBV bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp. Tối ưu hóa phản ứng qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR GREEN định lượng DNA EBV. Điều kiện phản ứng liên quan đến thể tích phản ứng, nồng độ đoạn mồi được được giảm đi so với khuyến cáo. Áp dụng quy trình kỹ thuật qPCR vừa xây dựng trên mẫu giả lập phòng thí nghiệm, ghi nhận về các chỉ số kỹ thuật của phản ứng qPCR, độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu. **Kết**

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn

Email: nhntuan@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 15.11.2023

Ngày phản biện khoa học: 19.12.2023

Ngày duyệt bài: 15.01.2024

quả: Tạo thành công plasmid chứa đoạn gen BamHI-W của EBV được xác nhận bằng giải trình tự Sanger. Xây dựng thành công quy trình kỹ thuật qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR GREEN bao gồm: Phản ứng qPCR ở thể tích phản ứng 10 μ L với nồng độ đoạn mỗi 500nM thỏa các tiêu chí kỹ thuật của phản ứng PCR. Độ chính xác cao với CV trong một ngày và ba ngày nhỏ hơn 11%, hiệu suất phản ứng E% là 95,67%, giá trị slope là -3.432, hệ số tương quan R² là 0,999; Ngưỡng giới hạn phát hiện (LOD) của kỹ thuật qPCR là 2.10⁴ copy/ μ L. Trong thí nghiệm giả lập trên mẫu plasmid ghi nhận độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%. **Kết luận:** Xây dựng thành công quy trình quy trình kỹ thuật qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR GREEN định lượng DNA EBV. **Từ khoá:** qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR GREEN, BamHI-W, DNA EBV,

SUMMARY

ESTABLISHMENT OF SYBR GREEN-BASED qPCR ASSAY FOR QUANTIFICATION EPSTEIN-BARR VIRUS

Introduction: Quantification of high levels of EBV DNA in plasma can be considered an important marker of primary disease at different times during treatment. Currently, qPCR technique has a high level of sensitivity for quantitatively targeting EBV DNA and can be commonly applied in clinical practice. Research has been conducted to develop a qPCR technical process using SYBR DNA fluorescence to quantify EBV, which would increase options for clinicians willing to apply it appropriately to the target application and economic conditions. **Objective:** Establishment of SYBR GREEN-BASED qPCR to help quantitative Epstein – Barr Virus. **Method:** Construction of a plasmid containing the BamHI-W gene fragment of EBV by recombinant DNA technique. Optimization of qPCR reaction using SYBR GREEN fluorescence quantification of EBV DNA. Reaction conditions related to reaction volume, primer, concentrations were reduced compared to the recommended. Applying the qPCR technical process just built on the laboratory simulation sample, recording the technical criteria of the qPCR reaction, accuracy, sensitivity, and specificity. **Result:** Successfully generated a plasmid containing the BamHI-W gene fragment of EBV identified by Sanger decoding. Successfully built a qPCR technique using SYBR GREEN fluorescent agent, including a qPCR reaction at a reaction volume of 10 μ L with primer concentrations 500nM which was contrary to the technical specifications of the reaction. The PCR reaction had high accuracy with one-day and three-day CVs of less than 11%, an E% response efficiency of 95,67%, a value slope of -3.432, and a correlation coefficient R² of 0,999. The limit of detection (LOD) of qPCR was 2.10⁴ copies/ μ L. In a simulated test on a definite precision recorded plasmid sample, the sensitivity and specificity were 100%. **Conclusion:** Successfully built a qPCR technical process using SYBR Green fluorescence to quantify EBV DNA. **Keywords:** qPCR, SYBR Green fluorescent, DNA EBV

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một số nghiên cứu đã chứng minh ung thư

vòm họng liên quan mật thiết với tình trạng nhiễm vi rút Epstein-Barr (EBV), hệ gen của vi rút này đã được xác định trong hầu hết các tế bào của khối u của ung thư vòm mũi họng¹⁻³. Định lượng nồng độ DNA của EBV trong huyết tương có thể được xem như là một dấu hiệu quan trọng giúp tiên lượng tình trạng bệnh tại từng thời điểm khác nhau trong quá trình điều trị. Hiện nay kỹ thuật qPCR có độ nhạy cao nhằm định lượng DNA EBV được ứng dụng phổ biến trong lâm sàng cũng như nghiên cứu với đoạn mỗi nhằm mục tiêu các vùng gen khác nhau của EBV. Trên bộ gen của EBV có các vùng gen khác nhau để các nhà nghiên cứu nhằm đến định lượng DNA EBV. Tuy nhiên khi sử dụng vùng gen BamHI -W có ưu điểm hơn là vì số lần lặp trên vùng gen này trên một vi rút tương đối là từ 5 - 11 copy nhiều hơn vùng gen khác như Bxf1, LMP2 chỉ có 1 copy.⁴

Trong bối cảnh ứng dụng các nhà lâm sàng cần một phương pháp định lượng có thể xác định những thay đổi nồng độ DNA EBV trong máu của bệnh nhân có nhiều ưu điểm như: dễ thực hiện và đòi hỏi ít thuốc thử, có thể tránh được sai số do các dung dịch pha loãng chuẩn khi tạo đường chuẩn do đó chi phí để thực hiện xét nghiệm cũng thấp hơn⁵.

Từ những lý do trên, nhóm nghiên cứu chúng tôi quyết định thực hiện đề tài "Xây dựng kỹ thuật qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR GREEN định lượng DNA EBV". Nghiên cứu này được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm bước đầu mong muốn xây dựng phương pháp có thể ứng dụng xa hơn trong lâm sàng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu mô tả thực nghiệm, được tiến hành từ tháng 11/2022 đến tháng 8/2023, trên các mẫu DNA EBV được tái tổ hợp vào plasmid bằng bộ sinh phẩm TOPO TA Cloning. Các bước tiến hành nghiên cứu:

Tạo plasmid chứa đoạn gen EBV quan tâm: Đoạn mỗi BamHI-W được tham khảo từ nghiên cứu của tác giả Wen-Jie Chen và cộng sự², được tổng hợp bởi công ty Integrated DNA Technologies (IDT), Hoa Kỳ. Nhóm nghiên cứu sử dụng nguồn DNA EBV đã được xác định bằng kỹ thuật FISH nhuộm EBER, Roche Diagnostics đang lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch. Plasmid chứa gen BamHI-W được xây dựng làm chứng dương cho phản ứng qPCR bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp (TOPO TA Cloning, ThermoFisher, Mỹ). Đoạn gen quan tâm (insert) là sản

phẩm PCR vào plasmid vector pCR™2.1 và biến nạp vào tế bào khả nạp là vi khuẩn TOP10F' E.coli bằng cách sốc nhiệt. Chọn khuẩn lạc màu trắng mọc đơn lẻ trên thạch LB chứa kháng sinh làm phản ứng PCR đánh giá sự hiện diện của insert trong plasmid (MyTaq™ Red Mix, Bioline, Anh Quốc). Tách chiết DNA plasmid (EZ – 10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps, Bioline, Anh Quốc) và đánh giá độ tinh sạch bằng phương pháp quang phổ hấp thụ ở bước sóng OD_{260nm} và OD_{280nm} (Spectra Quickdrop, Molecular Devices, Hoa Kỳ). Giải trình tự và phân tích trình tự insert (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Hoa Kỳ) trên hệ thống phân tích DNA Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Hoa Kỳ).

Tối ưu hóa và thẩm định phản ứng qPCR dùng chất huỳnh quang SYBR: Phản ứng qPCR được thực hiện trên máy Quanstudio 5 (SensiFAST™ SYBR kit, Thermo Fisher) với chu trình nhiệt gồm: hoạt hóa: 95°C – 2 phút; biến tính: 95°C – 5 giây; bắt cặp đặc hiệu và kéo dài chuỗi: 60°C – 15 giây. Thể tích phản ứng 10µL, 5µL master mix SensiFAST™ SYBR (2X); 1µL mỗi xuôi; 1µL mỗi ngược với các nồng độ mỗi 150nM – 500nM; 1µL nước tinh sạch và 1µL DNA plasmid pha loãng hệ số 10. Mỗi mức nồng độ pha loãng plasmid thực hiện 03 lần/ mẻ. Thực hiện lặp lại 3 mẻ trong 1 ngày, tính hệ số biến thiên (CV%). Lấy chu kỳ ngưỡng (Ct) trung bình. Chọn nồng độ mỗi tối ưu cho phản ứng. Đường tương quan giữa giá trị Ct và các nồng độ DNA mục tiêu. Từ giá trị slope của đường tương quan, hiệu quả khuếch đại của phản ứng. Hiệu quả khuếch đại chấp nhận trong khoảng 90–110 %, tương ứng với giá trị slope của đường tương quan nằm trong khoảng -3,6 đến -3,1 và hệ số tương quan R² ≥ 0,98.

Xác định ngưỡng giới hạn phát hiện LoD của phản ứng qPCR bằng cách tiến hành phản ứng qPCR trong thể tích 10µL với nồng độ đoạn mỗi đã được chọn tối ưu trên các mẫu plasmid pha loãng với nồng độ ban đầu 10⁻¹ ng/µL, và các nồng độ lần lượt tiếp theo như sau 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ ng/µL. Dựa vào nồng độ và chiều dài đoạn DNA, số bản copy được tính theo công thức sau:

$$\text{Số copies} = \frac{x \times 6,022 \times 10^{23}}{y \times 10^9 \times 650} \text{ (bản sao)}$$

Trong đó: 6,022 × 10²³ phân tử/mol: số Avogadro's; x: nồng độ DNA plasmid (ng/µl); y: kích thước của plasmid gồm cả đoạn chèn (bp).

Áp dụng qui trình kỹ thuật qPCR vừa xây dựng trên mẫu giả lập phòng thí nghiệm: Bộ

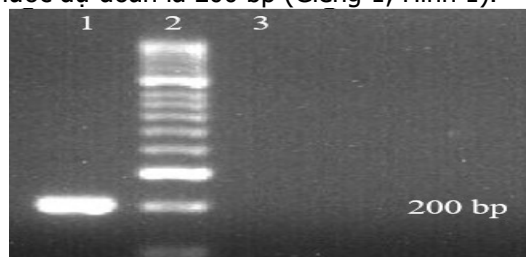
mẫu giả lập được chuẩn bị mù đối với nghiên cứu viên từ bộ mẫu plasmid sắp xếp ngẫu nhiên. Ghi nhận kết quả Ct và tính toán độ chính xác (AC%), độ đặc hiệu (SP%), độ nhạy (SE%). Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê STATA 14.2, phần mềm QuantStudio™ Design and Analysis Software 2.6.0 của Thermo Fisher.

Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh học Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh số: 859/ HĐĐĐ-ĐHYD ngày 11/11/2022.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Theo công bố của Armen Sanosyan và cộng sự trong nghiên cứu tác động của việc nhắm mục tiêu các chuỗi lặp lại BamHI-W trong định lượng DNA EBV cho thấy đoạn gen BamHI-W được chứng minh là có độ nhạy cao hơn do có số lần lặp lại nhiều hơn so với các đoạn gen khác điển hình như đoạn LMP2 nằm trong bộ gen của EBV⁴. Để có nguồn mẫu dương dồi dào và tiết kiệm chi phí cũng như có thể tái sử dụng nhiều lần cho quá trình xây dựng qui trình qPCR định lượng DNA EBV⁶. Vì vậy, nhóm nghiên cứu chúng tôi tiến hành xây dựng plasmid chứa đoạn gen mong muốn bằng phương pháp DNA tái tổ hợp với bộ sinh phẩm thương mại là TOPO TA Cloning (Thermo Fisher).

Kết quả sàng lọc khuẩn lạc trên thạch LB chứa kháng sinh Ampicilin: Kết quả ở hình 1 cho thấy sản phẩm PCR khuẩn lạc của thể biến nạp bằng cặp mỗi đặc hiệu BamHI-W, điện di trên gel agarose 2,5% cho sản phẩm đặc hiệu ở vạch nằm ở khoảng 200 bp của thang chuẩn, chứng âm không xuất hiện sản phẩm. Theo kết quả trong thí nghiệm trên, các khuẩn lạc E.coli được nuôi cấy trên thạch LB đã chứa thành công plasmid có chứa đoạn insert mong muốn, chỉ những thể biến nạp nào nhận plasmid mới có khả năng kháng Ampicilin và hình thành khuẩn lạc màu trắng trên môi trường LB có chứa kháng sinh. Tiến hành PCR khuẩn lạc điện di sản phẩm trên gel agarose có kết quả phù hợp với kích thước dự đoán là 200 bp (Giếng 1; Hình 1).

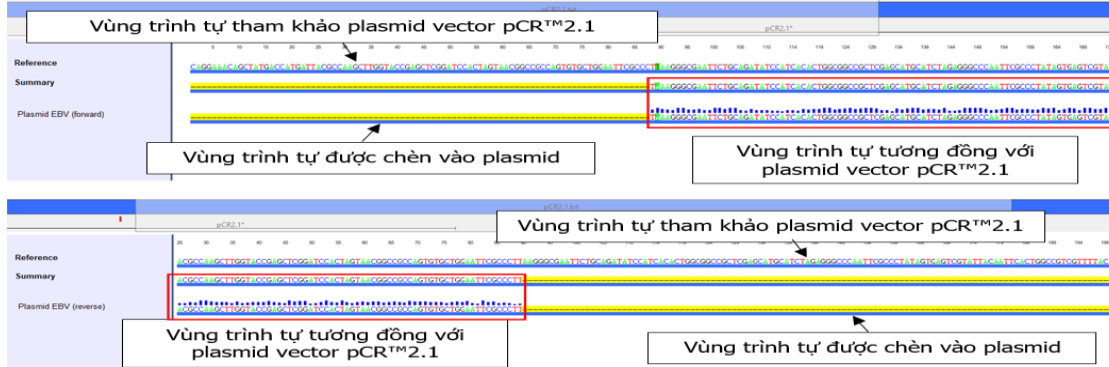


Hình 1. Kết quả PCR khuếch đại từ khuẩn lạc trên thạch LB

Giếng 1: Khuẩn lạc từ thạch LB.
Giếng 2: Thang chuẩn DNA HyperLadder 50 bp
Giếng 3: Chứng âm

Kết quả giải trình tự plasmid chứa gen mục tiêu: Những plasmid có đoạn insert từ kết quả sàng lọc sẽ được giải trình tự 2 chiều xuôi,

ngược để kiểm tra độ chính xác về trình tự đoạn insert. Kết quả nhận được khẳng định sự hiện diện của plasmid plasmid vector pCR™2.1 có chứa đoạn insert được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Plasmid này sẽ được làm chứng dương cho quy trình qPCR.



Hình 2. Hình ảnh kết quả trình phân tích trên phần mềm Variant Reporter Software v2.0 (Applied Biosystems, Hoa Kỳ)

Kết quả xác định nồng độ mỗi tối ưu cho phản ứng qPCR: Theo khuyến cáo của nhà sản xuất bộ sinh phẩm SensiFAST™ SYBR (Bioline, Anh Quốc) nồng độ đoạn mỗi 400 nM cho hầu hết các phản ứng sử dụng SYBR. Tuy nhiên, mức nồng độ này nên được tối ưu cho từng xét nghiệm từ 100 nM đến 1000 nM. Nhóm nghiên cứu đã thực hiện trên 3 nồng độ mỗi khác nhau từ 150nM, 250nM và 500nM cho thấy hiệu suất phản ứng trung bình của các mẻ ở từng nồng độ mỗi đều trên 90% (Bảng 1). Tuy nhiên, ở nồng độ mỗi 500nM cho thấy đạt hiệu suất cao nhất là 93,40% có độ dao động là ± 1,56 và độ biến thiên CV% là 1,67%. Vì vậy, mức nồng độ mỗi nhóm nghiên chọn ra cho phản ứng qPCR là 500 nM nồng độ mỗi tối ưu cho phương pháp.

Bảng 10. Độ lệch chuẩn và CV% trong 3 mẻ của giá trị E% ở thể tích 10 µL với các nồng độ mỗi tối ưu

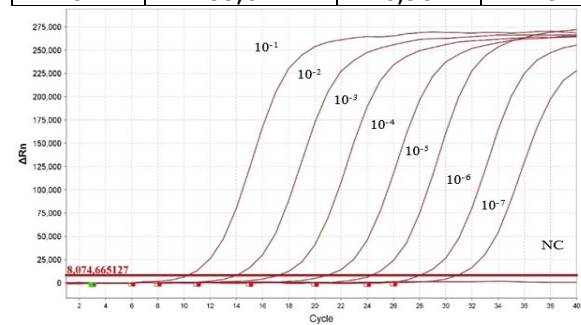
Nồng độ mỗi	Hiệu suất phản ứng trung bình	Độ lệch chuẩn trung bình (SD)	Độ biến thiên trung bình (CV%)
150 nM	91,86%	0,87	0,95
250 nM	90,77%	1,14	1,25
500 nM	93,40%	1,56	1,67

Xác định ngưỡng giới hạn phát hiện LoD và xây dựng đường chuẩn: Kết quả trong bảng 2 và đường biểu diễn phản ứng qPCR giữa nồng độ plasmid và chu kỳ ngưỡng tương ứng (hình 4) cho thấy tín hiệu huỳnh quang vượt lên tín hiệu nền từ chu kỳ 11 tương ứng 2.10⁶ copy với chu kỳ ngưỡng tăng dần đến chu kỳ 33 tương ứng 2.10⁰ copy. Như vậy, ngưỡng giới hạn

phát hiện LoD của phương pháp qPCR ghi nhận 2.10⁰ copies/µL. Giá trị Ct trung bình trung bình của các nồng độ pha loãng dao động từ 11,84 ± 0,76 (2.10⁶ copy) đến 33,04 ± 0,98 (2.10⁰ copy).

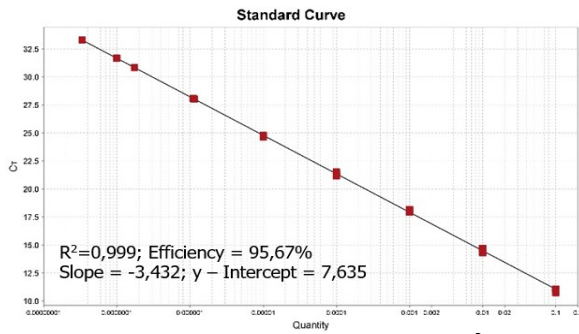
Bảng 11. Số copies trong phản ứng qPCR và số trung bình chu kỳ ngưỡng của plasmid

Nồng độ (ng/µL)	Trung bình chu kỳ ngưỡng (Ct)	Độ lệch chuẩn (SD)	Số copies
10 ⁻¹	11,84	0,76	2.10 ³
10 ⁻²	15,39	0,73	2.10 ⁵
10 ⁻³	19,04	0,90	2.10 ⁴
10 ⁻⁴	22,41	0,97	2.10 ³
10 ⁻⁵	25,71	0,95	2.10 ²
10 ⁻⁶	29,44	1,10	2.10 ¹
10 ⁻⁷	33,04	0,98	2.10 ⁰



Hình 3. Sơ đồ huỳnh quang biểu thị sự khuếch đại của sản phẩm PCR qua mỗi chu kỳ phát hiện bằng SYBR Green

Tương ứng với 10⁻¹ ng/µL (2.10⁶ copy), 10⁻² ng/µL (2.10⁵ copy), 10⁻³ ng/µL (2.10⁴ copy), 10⁻⁴ ng/µL (2.10³copy), 10⁻⁵ ng/µL (2.10² copy), 10⁻⁶ ng/µL (2.10¹ copy), 10⁻⁷ ng/µL (2.10⁰ copy).



Hình 4. Phương trình đường chuẩn phản ứng qPCR có trong các plasmid pha loãng và chu kỳ ngưỡng tương ứng

Từ giá trị threshold dựng đường chuẩn biểu thị hiệu quả khuếch đại trên đồ thị phương trình đường chuẩn (hình 2) với trục tung Ct (Cycle threshold) phản ánh số chu kỳ để huỳnh quang phát ra vượt giá trị T, trục hoành là nồng độ pha loãng plasmid. Hệ số tương quan thu được rất cao ($R^2 = 0,999$) chứng tỏ mối tương quan giữa nồng độ (trục X) và Ct (trục Y) rất chặt và tuân theo phương trình $y = -3,432x + 7,635$. (Hình 2) với độ dốc là -3,432 và hiệu suất đạt 95,67%. Như vậy đường chuẩn của phản ứng qPCR trong nghiên cứu đáng tin cậy.

Độ chính xác, độ xác thực, độ nhạy và độ đặc hiệu trên các mẫu plasmid: Các thông số kỹ thuật cần đạt được để xác nhận giá trị sử dụng của một kỹ thuật chẩn đoán theo tiêu chí của phòng xét nghiệm ISO 15189:2012 bao gồm: độ chính xác trong ngày và giữa các ngày với độ dao động (CV%) phải nhỏ hơn mức độ cho phép của hãng sản xuất⁷. Hệ thống máy Quant Studio 5 của hãng ThermoFisher thì mức độ CV chấp nhận là dưới 11%; độ xác thực trên 90%, độ nhạy trên 90% và độ đặc hiệu trên 90%⁸. Độ chính xác của phản ứng qPCR trên thể tích 10µL được thể hiện qua giá trị CV% qua bảng 4, cho thấy giá trị CV% trong 1 ngày và 3 ngày đều dưới tiêu chí 11% (Bảng 3).

Bảng 12. Độ lệch chuẩn và CV% trong 1 ngày và 3 ngày của giá trị Ct ở thể tích 10 µL với nồng độ mỗi 500nM đã tối ưu

	Độ lệch chuẩn (SD)	Độ biến thiên (CV%)
Trong 1 ngày	0,91	4,37
Trong 3 ngày	0,38	2,17

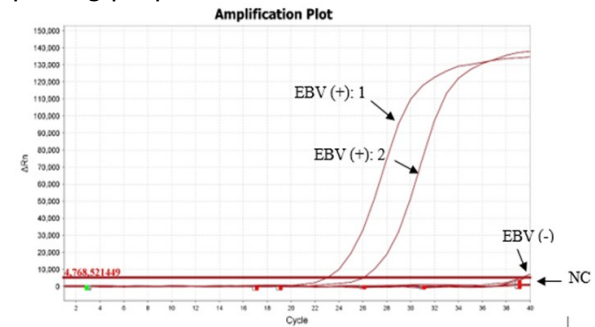
Áp dụng qui trình kỹ thuật qPCR vừa xây dựng trên mẫu giả lập phòng thí nghiệm, độ nhạy và độ đặc hiệu dựa trên kết quả chẩn đoán của các mẫu giả lập từ plasmid có nồng độ khác nhau, bao gồm 47 mẫu dương và 48 mẫu âm cho bộ sinh phẩm SensiFAST™ SYBR. Độ nhạy

và độ đặc hiệu trong điều kiện phản ứng khảo sát là 100% (Bảng 5).

Bảng 13. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng qPCR với thể tích 10 µL

SensiFAST™ SYBR		Mẫu giả lập		
		Dương tính	Âm tính	
Kết quả qPCR	Dương tính	47	0	Độ nhạy: 100%
	Âm tính	0	48	Độ đặc hiệu: 100%

Phân tích thực tế: Ngoài ra, nhóm nghiên cứu áp dụng thực hiện phương pháp qPCR trên các mẫu DNA một số DNA ly trích từ các mẫu mô EBV (+) và EBV (-) đã được xác định bằng kỹ thuật FISH nhuộm EBER (Roche Diagnostics). Tương ứng: Ct trên 2 mẫu EBV (+) lần lượt là 22,99 và 25,94, Ct trên mẫu 2 mẫu EBV (-) lần lượt là 39,13 và dưới ngưỡng phát hiện (Hình 6). Trên các mẫu EBV dương tính và âm tính đã được xác định bằng các phương pháp thương mại sau khi áp dụng qPCR đã xây dựng lên các mẫu này đều thấy phù hợp với các kết quả trước đây. Điều này cho thấy độ đặc hiệu của phương pháp đã xây dựng có độ tương đồng so với các phương pháp khác.



Hình 5. Sơ đồ huỳnh quang biểu thị sự khuếch đại của sản phẩm PCR một số DNA ly trích từ các mẫu mô EBV+ và EBV- (xác định bằng kỹ thuật FISH nhuộm EBER, Roche Diagnostics)

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định lượng DNA EBV bằng kỹ thuật qPCR. Phương pháp có độ nhạy tốt với giới hạn định lượng 2 bản sao, độ nhạy và độ đặc hiệu kỹ thuật đều là 100%. Đối với đường cong chuẩn được xây dựng bằng các chu kỳ ngưỡng (Ct) so với các nồng độ pha loãng của plasmid thể hiện tương quan tuyến tính ($R^2=0,999$, độ dốc = -3,432). Độ biến thiên trung bình (CV%) trong 1 ngày và trong 3 ngày lần lượt là 4,37% và 2,17%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chen YP, Chan ATC, Le QT, Blanchard P, Sun Y and Ma J.** Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*. 2019; 394(10192):64-80. 10.1016/s0140-6736(19)30956-0.
2. **Lam WKJ, Chan KCA and Lo YMD.** Plasma Epstein-Barr virus DNA as an archetypal circulating tumour DNA marker. *J Pathol*. 2019; 247(5):641-649. 10.1002/path.5249.
3. **Thọ HH, Nguyệt TT, Anh ĐT, et al.** Vai trò của dấu ấn DNA tự do của virus Epstein-Barr trong kiểm soát bệnh ung thư vòm mũi họng. 2018:127-131.
4. **Sanosyan A, Fayd'herbe De Maudave A, Bollore K, et al.** The impact of targeting repetitive BamHI-W sequences on the sensitivity and precision of EBV DNA quantification. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0183856. 10.1371/journal.pone.0183856.
5. **Rao X, Huang X, Zhou Z and Lin X.** An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013; 3(3):71-85.
6. **Kim KY, Le QT, Yom SS, et al.** Current State of PCR-Based Epstein-Barr Virus DNA Testing for Nasopharyngeal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017; 109(4). 10.1093/jnci/djx007.
7. **Shen C-H, Shen C-H, eds.** *Diagnostic Molecular Biology (Second Edition)*. Academic Press;2023: 521-541.
8. **Fisher T. Precision in qPCR.** 20 September, 2023. <https://www.thermofisher.com>

KHẢO SÁT GIÁ TRỊ THANG ĐIỂM ABIC (AGE BILIRUBIN INR CREATININE) TRONG TIỀN LƯỢNG BỆNH GAN MẠN DO RƯỢU

Ngô Thùy Dung¹, Dương Thị Mai Chi²,
Trần Ngọc Ánh¹, Nguyễn Trường Sơn³

TÓM TẮT

Mở đầu: Bệnh gan do rượu bao gồm nhiều rối loạn lâm sàng: gan nhiễm mỡ do rượu, viêm gan do rượu (Alcoholic hepatitis - AH) các mức độ, xơ gan do rượu (Alcoholic cirrhosis - AC) đi kèm các biến chứng của nó và viêm gan rượu cấp tính biểu hiện như đợt cấp suy gan mạn, gây nên bởi việc sử dụng rượu kéo dài¹. Có rất nhiều các chỉ số để đánh giá tiên lượng bệnh nhân bệnh gan do rượu, trong đó thang điểm ABIC được sử dụng ngày càng rộng rãi. **Mục tiêu:** Khảo sát giá trị thang điểm ABIC trong tiên lượng bệnh gan mạn do rượu. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu hồi cứu và tiền cứu. 62 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh gan mạn do rượu theo hướng dẫn chẩn đoán của Hội Tiêu hóa Hoa Kỳ (ACG) 2018 điều trị tại khoa Nội tổng hợp Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 1/2022 đến tháng 1/2023. **Kết quả và kết luận:** Có 62 bệnh nhân thỏa mãn tiêu chuẩn. Tuổi trung bình của các đối tượng là 53.9 ± 9.4. Điểm ABIC trung bình là 7.28 ± 1.17, cao nhất là 10.06, thấp nhất là 4.42. Có mối liên quan giữa thang điểm ABIC và tiên lượng tử vong sau 30 ngày của bệnh gan mạn do rượu với giá trị cut-off 8.26, AUROC 0.884, p = 0.002 < 0.05, độ nhạy Se (Sensitivity) là 83.3% và độ đặc hiệu Sp (Specificity) là 89.3%. **Từ khóa:** ABIC, bệnh gan mạn do rượu.

SUMMARY

SURVEY THE VALUE OF THE ABIC (AGE BILIRUBIN INR CREATININE) SCORE IN PREDICTING ALCOHOLIC CHRONIC LIVER DISEASE

Introduction: Alcoholic liver disease includes many clinical disorders: alcoholic fatty liver, alcoholic hepatitis (AH) of various degrees, alcoholic cirrhosis (AC) with its complications and acute alcoholic hepatitis manifest as acute exacerbations of chronic liver failure, caused by prolonged alcohol use. There are many indicators to evaluate the prognosis of patients with alcoholic liver disease, including the ABIC score is used more and more widely. **Objects:** Survey the value of the ABIC score in predicting alcoholic chronic liver disease. **Study subjects and methods:** Retrospective and prospective study. 62 patients diagnosed with alcoholic chronic liver disease according to the 2018 American College of Gastroenterology (ACG) diagnostic guidelines were treated at the Department of General Internal Medicine, Hanoi Medical University Hospital from January 2022 to January 2023. **Results and conclusions:** There were 62 patients who met the criteria. The average age of the subjects was 53.9 ± 9.4 years. The average ABIC score is 7.28 ± 1.17, the highest is 10.06, the lowest is 4.42. There is a relationship between ABIC score and 30-day mortality prognosis of alcoholic chronic liver disease with cut-off value 8.26, AUROC 0.884, p = 0.002 < 0.05, Sensitivity Se is 83.3% and Specificity Sp is 89.3%.

Keywords: ABIC, alcoholic chronic liver disease.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh gan mạn tính (Chronic Liver Disease - CLD) là tình trạng suy giảm chức năng gan tiến

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

³Bệnh viện Bạch Mai

Chịu trách nhiệm chính: Ngô Thùy Dung

Email: hnthuydung29@gmail.com

Ngày nhận bài: 8.11.2023

Ngày phản biện khoa học: 18.12.2023

Ngày duyệt bài: 11.01.2024