



XQ sau bột 3 tháng



Lâm sàng sau bột 3 tháng (chức năng các khớp tốt)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Phạm Phan Địch** (2004), "Mô liên kết chính thức-mô sụn-mô xương", *Mô học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr 142-188.
2. "The History and Function of Plaster of Paris in Surgery". Smith and Nephew.
3. **Schmidt, V.E.; Somerset, J.H.; Porter, R.E.** (1973). "Mechanical Properties of Orthopaedic Plaster Bandages". *Journal of Biomechanics*. Elsevier. 6 (2): 173–185. doi:10.1016/0021-9290(73)90086-9. PMID 4693147.
4. **Adkins, Lisa M** (July–August 1997). "Cast changes: synthetic versus plaster". *Pediatric Nursing*. 23 (4): 422, 425–7. PMID 9282058.
5. Infantile scoliosis outreach program: What is Mehta's Growth Guidance Casting?
6. "Do You Know How to Safely Remove a Cast Easily?". about.com. Retrieved 14 April 2018.

7. H. Salesnick. "Waterproof Cast Liners Break Tradition".

8. **Halanski, Matthew A.** (June 2016). "How to Avoid Cast Saw Complications". *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 36: S1–S5. doi:10.1097/BPO.0000000000000756. ISSN 0271-6798. PMID 27152901.

9. US 2602224, McKay, Neil, "Plaster cast cutting shears", published 28 August 1950, issued 8 July 1952

10. **John., Ebnezar** (2009). *Practical orthopedics*. New Delhi: I.K. International Pub. House.p. 406. ISBN 9789380026275. OCLC 8712 42240.

11. **L.F. Peltier** (1990). "Fractures: A History and Iconography of their Treatment". Norman Publishing.

NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP QUY TRÌNH PHÁT HIỆN KÍ SINH TRÙNG *PLASMODIUM VIVAX* BẰNG KỸ THUẬT REAL - TIME PCR

TRẦN THỊ THU HUYỀN¹, NGUYỄN THỊ LAN DUNG^{1,2},
NGUYỄN THÙY TRANG^{1,2}, ĐỖ DIỆU LINH^{1,3},
HỒ ANH SƠN¹, HOÀNG VĂN TÔNG¹

¹Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y
²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
³Trường Đại học Y Hải Phòng

TÓM TẮT

Mục tiêu: Tối ưu quy trình phát hiện ký sinh trùng *P. vivax* bằng kỹ thuật Real-time PCR và đánh giá độ nhạy đặc hiệu của phương pháp.

Phương pháp: Tách chiết DNA, tối ưu quy trình PCR tạo đối chứng dương, tối ưu quy trình Real-time PCR sử dụng Taqman Probe phát hiện KSTSR *P. vivax*. Xác định ngưỡng phát hiện, độ

nhạy, độ đặc hiệu của quy trình và đánh giá so sánh với kit thương mại.

Kết quả: Khuếch đại thành công đối chứng dương có kích thước 1,2 kb chủng KST *P. vivax*. Tối ưu thành công quy trình real-time phát hiện KSTSR *P. vivax*. Ngưỡng phát hiện của quy trình là 4,138 copies/phản ứng tương đương với 0,1 KST/ μ l, độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình là 100%. Có sự tương quan cao giữa kit thị trường với quy trình nghiên cứu với hệ số Cohen's kappa ($K=0,96$).

Kết luận: Đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình phát hiện ký sinh trùng *P. vivax* bằng kỹ

Chịu trách nhiệm: Trần Thị Thu Huyền
Email: tranthuhuyen.cnsh@gmail.com
Ngày nhận: 11/3/2021
Ngày phản biện: 09/4/2021
Ngày duyệt bài: 20/4/2021

thuật Real-time PCR và đạt được độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương với kit thương mại trên thị trường, tiết kiệm chi phí và thời gian xét nghiệm.

Từ khóa: Sốt rét, Real-time PCR, *P. vivax*.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF TAQMAN REAL-TIME PCR- BASED ASSAY TO DETECT PLASMODIUM VIVAX

Objective: To optimize and analytically validate a Taqman real-time PCR assay to detect *P. vivax*.

Method: A real-time PCR assay was optimized based on the positive control and was validated the diagnostic performance on clinical samples for the sensitivity, specificity and the limit of detection (LOD).

Results: We have successfully optimized the real-time PCR procedure for detecting *P. vivax*. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay was 100% and the LOD of the assay was 4.138 copies per reaction, which is equivalent to 0.1 parasites/ μ l.

Conclusion: The Taqman real-time PCR assay was successfully developed and could be used for the detection of *P. vivax* in clinical samples.

Keywords: Malaria, real-time PCR, *Plasmodium vivax*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

P. vivax là chủng ký sinh trùng (KST) gây bệnh sốt rét phổ biến thứ hai ở Việt Nam đứng sau *P. falciparum* [1]. *P. vivax* thường gây ra sốt rét theo cơn nhưng ít trường hợp chuyển sang sốt rét ác tính. Các đặc điểm lâm sàng của sốt rét do *P. vivax* không đủ để chẩn đoán chính xác vì có các triệu chứng tương đồng với một số các bệnh nhiễm trùng khác như bệnh leishmaniasis, thương hàn và bệnh lao. Vì vậy các kỹ thuật chẩn đoán xét nghiệm có độ nhạy cao để chẩn đoán sốt rét nhanh, chính xác là rất cần thiết [2].

Phương pháp xét nghiệm PCR dựa trên đoạn trình tự đích *18S rRNA* để phát hiện ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) có độ nhạy và đặc hiệu nhạy so với phương pháp kính hiển vi thông thường [3-6]. Tuy nhiên các phương pháp xét nghiệm dựa trên PCR được công bố cho đến nay có nhược điểm như thời gian thực hiện kéo dài, không định lượng được số lượng KSTSR. Mặt khác, real-time PCR sử dụng đầu dò taqman là một phương pháp mới được sử dụng để phát hiện chủng KSTSR không những đáp ứng được những vướng mắc về số lượng mẫu, lượng ký sinh trùng mà còn tiết kiệm chi phí và thời gian xét nghiệm. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nghiên cứu thiết lập quy trình phát hiện ký sinh trùng sốt rét *P. vivax*

bằng kỹ thuật Real-time PCR.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Chúng tôi thực hiện xây dựng quy trình trên chủng chuẩn KSTSR *P. vivax* được cung cấp bởi Viện Y học nhiệt đới Tuebigen, CHLB Đức. Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu quy trình xây dựng được trên các mẫu bệnh phẩm bao gồm: 30 mẫu bệnh phẩm đã được xác định sốt rét do KSTSR *P. vivax*, 30 mẫu tự tạo nhiễm KSTSR không phải *P. vivax*. Đánh giá sự tương quan quy trình xây dựng được với kit thương mại trên thị trường sử dụng 52 mẫu bệnh phẩm đã được xác định nhiễm KSTSR bằng phương pháp nhuộm Giemsa tại khu vực Tây Nguyên.

2. Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA: Từ chủng chuẩn và 112 mẫu bệnh phẩm thu thập được tách bằng kit tách chiết DNA từ máu toàn phần GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA được đo bằng máy NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), các mẫu DNA được bảo quản ở -30°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

Khuếch đại đoạn gen tạo đối chứng dương: Sử dụng cặp mồi đặc hiệu nhân đoạn gen *18S rRNA* sử dụng trong phản ứng PCR: Trình tự mồi như sau: Mồi xuôi 5'-CTT GTT GCC TTA AAC TTC-3' và mồi ngược 5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3'. Thành phần phản ứng PCR nhân gen gồm: master mix: 10 μ l; mồi xuôi: 1 μ l; mồi ngược: 1 μ l; nước: 6 μ l; mẫu: 2 μ l. Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 95°C 10 phút; tiếp theo 35 chu kỳ: 95°C 30 giây, 57°C 30 giây, 72°C 60 giây; 72°C 5 phút và bảo quản mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1,5% sau đó được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ), điện di kiểm tra lại lần nữa và phân tích kết quả.

Xây dựng quy trình phát hiện ký sinh trùng *P. vivax* bằng kỹ thuật Real-time PCR: Sử dụng probe Taqman làm chất phát huỳnh quang. Mồi và probe thiết kế đặc hiệu để nhân gen đích *18S rRNA*, là trình tự bảo tồn cao đồng thời nhiều bản sao nằm rải rác trên hệ gen của chủng KSTSR *P. vivax*. Trình tự mồi VIV-F 5'-CTT TTG AGA GGT TTT GTT ACT TTG AGT AA-3', mồi VIV-R 5'-TAT TCC ATG CTG TAG TAT TCA AAC ACA A-3' và VIV- probe 5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC -3'. Thành phần phản ứng Real-time PCR:

master mix probe: 12,5 µl; VIV-F: 1µl; VIV-R: 1µl; probe: 0,25µl; nước: 8,25µl và mẫu: 2µl. Chu trình nhiệt: 95°C 15 phút; tiếp theo 45 chu kỳ: 94°C 15 giây, 60°C 60s.

Xác định ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu của quy trình: Panel độ nhạy, pha loãng 10 lần liên tiếp từ dung dịch DNA gốc có nồng độ là 30ng/µl. Tính số bản copies DNA theo công thức: Số bản copies = $(ng * 6.022 * 10^{23}) / (Chiều dài * 10^9 * 650)$. Độ nhạy chẩn đoán được tính bằng: Se = Dương tính thật / (Dương tính thật + Âm tính giả) x 100%. Độ đặc hiệu được tính bằng: Sp = Âm tính thật / (Âm tính thật + Dương tính giả) x 100%. Đánh giá tương quan và phân tích số liệu bằng phần mềm thống kê sinh học.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tối ưu quy trình PCR tạo đối chứng dương

Thực hiện tối ưu các thành phần của quy trình PCR tạo đối chứng dương: tối ưu nhiệt độ gắn môi, thời gian kéo dài, nồng độ môi.

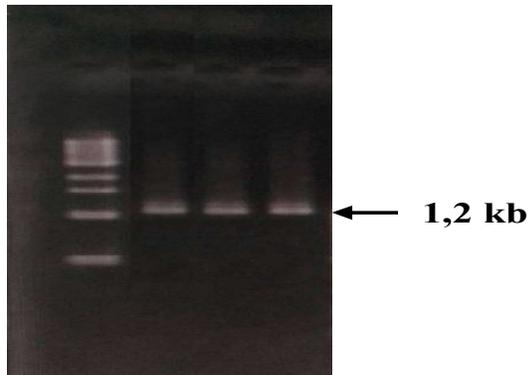
Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn môi: Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình chạy gradient nhiệt độ gắn môi với dải nhiệt độ từ 50-57°C để nhiệt độ gắn môi không quá thấp và phù hợp với Tm của môi. Sản phẩm phản ứng được điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm trong dung dịch ethidium bromide trong 20 phút. Kết quả tối ưu, ở nhiệt độ gắn môi 57°C cho sản phẩm 1 băng đặc hiệu rõ nét nhất có kích thước tương ứng 1,2 kb, được chọn cho các lần chạy sau.

Thời gian kéo dài: Ước lượng theo công thức 60s kéo dài tương ứng với sản phẩm kích thước 1kb, với sản phẩm đích mong muốn có kích thước 1,2 kb đầu tiên thời gian kéo dài được sử dụng là 1 phút 20 giây. Tuy nhiên sản phẩm thu được xuất hiện các band không mong muốn. Tiến hành thí nghiệm với thời gian kéo dài giảm xuống lần lượt còn 1 phút 10 giây, 1 phút. Tại 1 phút cho 1 băng duy nhất kích thước 1,2 kb phù hợp với yêu cầu của thí nghiệm nên được chọn làm thời gian kéo dài cho phản ứng.

Nồng độ môi: Với môi sử dụng là môi có nồng độ 5 µM và tổng thể tích của phản ứng là 20 µl, chúng tôi thực hiện thí nghiệm với các nồng độ môi lần lượt là 0,2 µM, 0,25 µM, 0,4 µM. Điện di sản phẩm trên gel Agarose 1,5%. Tại vị trí nồng độ môi 0,25 µM được chọn cho phản ứng PCR.

Kết quả tạo đối chứng dương

Sản phẩm PCR được tinh sạch, điện di kiểm tra và đo nồng độ DNA.



Hình 1: Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR tạo đối chứng dương

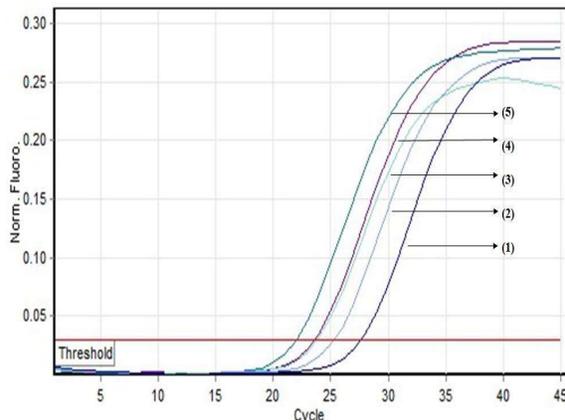
Trên hình cho thấy, điện di sản phẩm tinh sạch cho băng đặc hiệu đậm, rõ nét có kích thước 1,2 kb trên tất cả các mẫu thực hiện. Từ đó chứng minh, đã khuếch đại và tinh sạch thành công chứng dương *P. vivax*. Sản phẩm được bảo quản ở -30°C và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả đo OD của mẫu DNA chứng dương mà chúng tôi tự tổng hợp là 30 ng/µl. Từ kết quả này, tính toán số bản số bản copies của dung dịch gốc, tiếp đó sẽ pha loãng dung dịch để có số bản sao được sử dụng làm khuôn mẫu cho mỗi phản ứng đồng thời dãy nồng độ pha loãng này sẽ được sử dụng để đánh giá độ nhạy kỹ thuật và giới hạn phát hiện của phương pháp.

Kết quả tối ưu quy trình phát hiện kí sinh trùng *P. vivax* bằng kỹ thuật Real-time PCR

Nhiệt độ gắn môi, nồng độ môi và nồng độ probe là yếu tố quan trọng trong phản ứng real-time PCR, quyết định tới hiệu quả của cả quá trình real-time PCR nên chúng tôi đã tối ưu ba yếu tố trên. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn môi: chạy các phản ứng real-time PCR với các nhiệt độ gắn môi khác nhau. Sau các lần chạy, chúng tôi thấy rằng tại cùng các thành phần giống nhau (nồng độ DNA $2,3 \times 10^5$ copies/µl), nhiệt độ gắn môi là 60°C sẽ cho giá trị Ct=20,45 sớm nhất, tức là nhiệt độ gắn môi này đặc hiệu nhất để phản ứng real-time PCR tổng hợp và khuếch đại sản phẩm đạt hiệu quả cao.

Để tối ưu nồng độ môi chúng tôi tiến hành các phản ứng real-time PCR giống nhau về thành phần và chu trình nhiệt (thực hiện phản ứng trên DNA nồng độ $2,3 \times 10^5$ copies/µl), chỉ khác nhau về nồng độ môi. Tiến hành khảo sát thực hiện phản ứng với nồng độ môi xuôi, môi ngược mỗi loại từ 0,1 đến 0,5µM/phản ứng. Tại nồng độ 0,4 µM/phản ứng đặc hiệu nhất để máy real-time PCR nhận được tín hiệu huỳnh quang

sớm nhất. Nồng độ 0,4 μM /phản ứng sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2: Kết quả tối ưu nồng độ mồi cho phản ứng real-time PCR

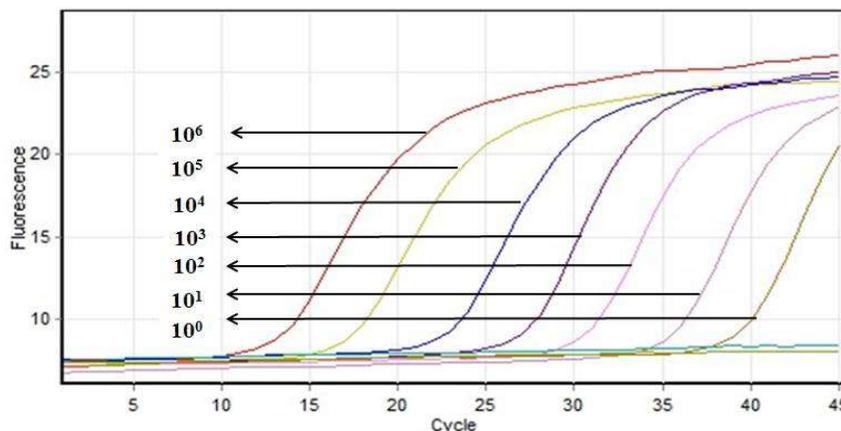
(1): Nồng độ 0,1 μM ; (2): Nồng độ 0,2 μM ; (3): Nồng độ 0,25 μM ; (4): Nồng độ 0,3 μM ; (5): Nồng độ 0,4 μM

Tiếp tục tiến hành các phản ứng giống nhau về thành phần và chu trình nhiệt (thực hiện phản ứng trên DNA nồng độ $2,3 \times 10^5$ copies/ μl), chỉ

khác nhau về nồng độ probe. Tiến hành khảo sát thực hiện phản ứng real-time PCR kiểm tra sản phẩm với nồng độ probe từ 0,05 đến 0,2 μM /phản ứng. Tại nồng độ mồi 0,1 μM thấp nhất vẫn thu được được tín hiệu sớm nên nồng độ probe này được sử dụng cho các phản ứng sau để có thể tiết kiệm hóa chất nhất có thể.

Kết quả đánh giá ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu của quy trình

Độ nhạy của kỹ thuật Real-time PCR chẩn đoán chủng KSTSR *P. vivax* được định nghĩa là tại mẫu có nồng độ pha loãng thấp nhất mà vẫn cho tín hiệu quang. Kết quả cho thấy với nồng độ DNA mẫu chứng dương là 30 ng, chiều dài 1,2 kb ta tính được số bản copy DNA có mặt là $2,3 \times 10^{10}$ copies/ μl . Lấy 5 μl dung dịch gốc làm stock. Tiến hành xác định ngưỡng phát hiện trên panel độ nhạy gồm các mẫu có nồng độ từ 10^{-1} - 10^8 copies/ μl , đánh giá lặp lại 12 lần. Nồng độ từ 10^1 - 10^6 cho 100% kết quả dương tính, tại 10^0 thì 83,33% cho kết quả dương tính tại Ct = 38,11 và tại nồng độ 10^{-1} thì âm tính 100%.



Hình 3: Kết quả Real-time PCR xác định ngưỡng phát hiện

Ngưỡng phát hiện là giá trị tối thiểu có thể phát hiện được của kỹ thuật. Độ lặp lại thí nghiệm: được xác định bằng cách sử dụng một nồng độ nhất định để tiến hành phản ứng real-time PCR lặp lại nhiều lần (trong thí nghiệm của chúng tôi là 6) nếu độ lặp lại là 6/6 được tính là lặp lại hoàn toàn 100%.

Kết quả thấy nồng độ cuối cho tín hiệu huỳnh quang là $2,3 \times 10^{10}$ copies/phản ứng, tuy nhiên với độ lặp lại là 83,33% chưa thể kết luận được ngưỡng phát hiện của quy trình. Thực hiện thí nghiệm với dải nồng độ pha loãng liên tiếp từ $2,3 \times 10^{10}$ đến $2,3 \times 10^0$ copies/ phản ứng. Kết

quả thí nghiệm được phân tích và tính toán bằng phần mềm PROLabPOD (QuoData). Ngưỡng phát hiện của quy trình phát hiện KST *P. vivax* bằng kỹ thuật Real-time PCR với độ tin cậy 95% là 4,138 copies/ phản ứng với khoảng tin cậy [2,603; 6,560]. Từ đó kết luận ngưỡng phát hiện của quy trình là 4,138 copies / phản ứng tương đương với 0,1 KST/ μl máu.

Đánh giá độ nhạy chẩn đoán của quy trình, thực hiện thí nghiệm trên panel độ nhạy chẩn đoán đã tạo. Kết quả thí nghiệm cho thấy trên 30 mẫu panel dương tính tất cả các phản ứng đều cho tín hiệu huỳnh quang và không quan sát thấy

trường hợp nào cho kết quả âm tính ở các mẫu được khẳng định là nhiễm kí sinh trùng *P. vivax*.

Panel độ đặc hiệu: Kết quả thấy chỉ có mẫu chứng dương và mẫu chủng *P. vivax* cho tín hiệu huỳnh quang và không có mẫu nào của panel độ đặc hiệu cho tín hiệu huỳnh quang.

Kết quả so sánh với kit thương mại trên thị trường

Đánh giá sự tương quan giữa quy trình nghiên cứu và kit thương mại RealStar Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics) trên 52 mẫu bệnh phẩm thu thập được bệnh nhân đã được chẩn đoán sốt rét do nhiễm KSTSR sốt rét bằng phương pháp nhuộm Giemsa tại khu vực Tây Nguyên cho thấy 21/52 mẫu dương tính (40,38%) và 30/52 mẫu âm tính cho cả 2 phương pháp. Có 1 mẫu có sự sai khác giữa 2 phương pháp (kit Altona âm tính và phương pháp real-time PCR chúng tôi xây dựng dương tính). Tuy nhiên về thống kê, dữ liệu chứng minh có sự tương quan cao trong định tính giữa 2 phương pháp với hệ số Cohen's kappa (K=0,96).

Bảng 1. Kết quả so sánh với kit thương mại trên thị trường

Mẫu	Altona			Hệ số Kappa
	Âm tính	Dương tính	Tổng	
Âm tính	30	0	30	0,96
Dương tính	1	21	22	
Total	31	21	52	

BÀN LUẬN

Hiện nay việc sử dụng kính hiển vi để phát hiện ký sinh trùng sốt rét trong lam máu nhuộm vẫn là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán KSTSR vì nó dễ thực hiện và giúp giảm thiểu các chính sách kinh tế của nhiều quốc gia [7]. Tuy nhiên, phương pháp soi kính hiển vi có nhiều hạn chế như độ nhạy giảm theo mật độ ký sinh trùng sốt rét trong máu, phụ thuộc vào kinh nghiệm của người soi kính, giới hạn phát hiện của phương pháp này là 10-20 KST/ μ L [7, 8]. Mật độ KST trong bệnh sốt rét do *P. vivax* thường thấp hơn so với *P. falciparum*, trong nhiều trường hợp thường nhiễm sốt rét phối hợp, do đó làm tăng nguy cơ âm tính giả với sốt rét cấp tính do *P. vivax*. Đây cũng không phải là phương pháp lý tưởng cho chẩn đoán SR khi mật độ KSTSR trong máu thấp hay nhiễm KSTSR phối hợp. Ở vùng dịch sốt rét, phương pháp soi kính hiển vi không thể đảm bảo kết quả, thì việc sử dụng test nhanh được khuyến khích.

Phương pháp test nhanh sử dụng kháng nguyên để phát hiện sốt rét nhanh mang lại nhiều lợi thế như kết quả có thể đạt được trong

vòng nửa giờ bởi các kỹ thuật viên không chuyên, dễ sử dụng, kit đều ổn định trong điều kiện nhiệt độ phòng trong vài tháng [7]. Tuy nhiên, độ nhạy và độ đặc hiệu của test nhanh rất khác nhau giữa các nhà cung cấp và theo loài được chẩn đoán. Nhìn chung các bộ kit phát triển cho chẩn đoán sốt rét do nhiễm *P. falciparum* tốt hơn so với *P. vivax*.

Các kỹ thuật chẩn đoán sử dụng các dấu hiệu huyết thanh học đã được áp dụng hầu hết cho các nghiên cứu về miễn dịch bảo vệ và dịch tễ học. Hầu hết các nghiên cứu đã được công bố đều áp dụng các kỹ thuật sử dụng các kháng nguyên tổng hợp thay vì sử dụng các peptide tự nhiên đặc trưng cho giai đoạn phát triển của KSTSR. Các nghiên cứu về các xét nghiệm huyết thanh có nguồn gốc từ kháng nguyên vắc-xin thương mại cho thấy độ đặc hiệu rất kém đối với chẩn đoán nhiễm trùng đang hoạt động. Phương pháp này cũng dễ gây hiện tượng dương tính giả, đặc biệt là ngay sau khi điều trị vì kháng nguyên vẫn tồn tại ngay cả khi đã loại bỏ KST.

Phương pháp nested-PCR được sử dụng phổ biến trong phát hiện KSTSR, phương pháp này cũng đã được chứng minh có độ nhạy cao so với phương pháp soi kính hiển vi hay test nhanh, có thể lên tới 1 KST/ μ L, có thể phát hiện được nhiễm KSTSR phối hợp. Tuy nhiên, hạn chế lớn của phương pháp này là thời gian dài, cần tới 8 giờ cho 2 vòng phản ứng PCR, nguy cơ lây nhiễm chéo cao và không thể định lượng được số lượng KST trong máu. Phương pháp real-time PCR mặt khác có thể theo dõi liên tục và phát hiện ngay tín hiệu mà không cần chờ đến khi phản ứng kết thúc. Phương pháp này cũng hạn chế khả năng lây nhiễm chéo và giảm thiểu thời gian.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn gen *18S rRNA* là gen đích, đây là gen đặc trưng của loài *Plasmodium*, RNA ribosome (rRNA) tạo thành phần cốt lõi của ribosome và rất cần thiết cho sự tổng hợp protein trong tất cả các sinh vật sống. Do các hạn chế chức năng, rRNA là một trong những axit nucleic được bảo tồn nhất trong tự nhiên, đồng thời chúng cũng tạo thành phần lớn các phân tử RNA trong các tế bào. Mặt khác, bằng cách nhắm mục tiêu vào một gen có nhiều bản sao phân tán khắp hệ gen *Plasmodium*, độ nhạy của xét nghiệm này cao hơn so với việc chọn gen một bản sao. Mặt khác dựa trên dữ liệu *18S rDNA* có thể các xét nghiệm sàng lọc PCR được phát triển để phát hiện và phân biệt giữa các kí sinh trùng thuộc các chi khác nhau.

Chính vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu quy trình phát hiện KST *P. vivax* bằng kỹ thuật real-

time PCR với độ nhạy cao (100%) và đặc hiệu (100%), giới hạn phát hiện (độ nhạy phân tích) đạt 4,138 bản copy DNA/ phản ứng tương đương với 0,1 KST/ μ l máu. Real-time PCR có thể mang lại kết quả trong vòng 2 giờ, không yêu cầu xử lý sau PCR, giảm xử lý mẫu và giảm thiểu rủi ro nhiễm bẩn. Do đó, xét nghiệm có thể dễ dàng thực hiện trong các xét nghiệm chẩn đoán sốt rét thông thường.

Với ngưỡng phát hiện là 4,138 copies/ phản ứng tương đương với 0,1 KST/ μ l cao hơn 100 lần so với phương pháp soi kính hiển vi thông thường (10 - 20 KST/ μ l), cao gấp 10 lần so với phương pháp PCR truyền thống (1 - 10 KST/ μ l). Mặt khác khi so sánh với các nghiên cứu cùng sử dụng kỹ thuật real-time PCR với đầu dò taqman đạt 1,13 KST/ μ l [9], 0,2 KST/ μ l [10] kỹ thuật của chúng tôi cho ngưỡng phát hiện cao hơn hẳn. Như vậy, tăng giới hạn phát hiện, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp có vai trò vô cùng quan trọng trong chẩn đoán sớm sốt rét, bệnh đã được Bộ Y tế đưa vào trong các mục tiêu Quốc gia thanh toán một số bệnh dịch nguy hiểm.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình phát hiện kí sinh trùng *P. vivax* bằng kỹ thuật Real-time PCR. Đã xác định ngưỡng phát hiện, độ nhạy chẩn đoán và độ đặc hiệu của quy trình. Quy trình mà chúng tôi xây dựng đã đạt được độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương với kit thương mại trên thị trường, tiết kiệm chi phí và thời gian xét nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ashley, E.A., et al., *Spread of artemisinin*

resistance in Plasmodium falciparum malaria. N Engl J Med, 2014. 371(5): p. 411 - 23.

2. Bell DR, J.P., Christophel EM, Palmer KL, *Malaria risk: Estimation of the malaria burden*. Nature, 2005 Sep 8.

3. Manca, N., et al., *Search for malaria parasites by PCR and Southern blot in patients with imported malaria in Italy*. New Microbiol, 2000. 23(3): p. 339 - 46.

4. Perandin, F., et al., *Usefulness of genus-specific PCR and Southern blot species-specific hybridization for the detection of imported malaria cases in Italy*. New Microbiol, 2001. 24(1): p. 69 - 76.

5. Perandin, F., et al., *Identification of Plasmodium falciparum, P. vivax, P. ovale and P. malariae and detection of mixed infection in patients with imported malaria in Italy*. New Microbiol, 2003. 26(1): p. 91 - 100.

6. Zhong, K.J. and K.C. Kain, *Evaluation of a colorimetric PCR-based assay to diagnose Plasmodium falciparum malaria in travelers*. J Clin Microbiol, 1999. 37(2): p. 339 - 41.

7. Milne, L.M., et al., *Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom*. J Clin Pathol, 1994. 47(8): p. 740 - 2.

8. Iqbal, J., et al., *Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants*. J Clin Microbiol, 1999. 37(11): p. 3644 - 6.

9. Kamau, E., et al., *Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria*. PLoS One, 2013. 8(8): p. e71539.

10. Hwang, S.Y., et al., *A novel real-time PCR assay for the detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria in low parasitized individuals*. Acta Trop, 2011. 120(1 - 2): p. 40 - 5.

MỘT SỐ YẾU TỐ NGUY CƠ GÂY CẬN THỊ HỌC ĐƯỜNG Ở HỌC SINH TRUNG HỌC CƠ SỞ TRƯỜNG NGUYỄN VĂN CỪ, THỊ XÃ TỪ SƠN, TỈNH BẮC NINH

PHAN VĂN HUYỀN,
NGUYỄN THỊ QUỲNH HOA, TRƯƠNG VIỆT TRƯỜNG
Trường Đại học Y - Dược, Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Bằng phương pháp nghiên cứu phân tích, thiết kế bệnh chứng, các tác giả đã phân tích một

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Quỳnh Hoa

Email: ntqhoa375ydtm@gmail.com

Ngày nhận: 02/3/2021

Ngày phản biện: 05/4/2021

Ngày duyệt bài: 23/4/2021

số yếu tố nguy cơ gây cận thị học đường của 101 học sinh ở nhóm cận thị và 101 học sinh ở nhóm không cận thị của học sinh Trường trung học cơ sở Nguyễn Văn Cừ, thị xã Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh. Kết quả cho thấy yếu tố nguy cơ đối với cận thị học đường giữa xem vô tuyến liên tục trên 1 giờ cao gấp 5,73 lần so với nhóm xem vô tuyến dưới 1 giờ; sử dụng máy vi tính liên tục trên 1 giờ cao gấp 7,1 lần so với nhóm sử dụng máy vi