

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT MULTIPLEX REAL-TIME PCR PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI BỐN GEN KHÁNG COLISTIN TỪ *mcr-1* ĐẾN *mcr-4*

Nguyễn Nam Thắng^{1*}, Lê Việt Hà¹,
Trần Thị Hòa¹, Nguyễn Thị Hoa¹,
Nguyễn Xuân Bái¹, Khổng Thị Diệp¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thiết kế các bộ primer/probe đặc hiệu để có thể phát hiện đồng thời 4 gen kháng colistin từ *mcr-1* đến *mcr-4* bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR.

Phương pháp: Các trình tự DNA của các gen từ *mcr-1* đến *mcr-4* được phân tích bằng các phần mềm tin sinh học (Clustal Omega, BioEdit, Fast PCR) để thiết kế 4 bộ primer/probe đặc hiệu cho các gen tương ứng. Sau khi tối ưu hóa về nồng độ primer/probe, nồng độ MgCl₂ và xác định giới hạn phát hiện của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR, chúng tôi đánh giá về độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật bằng cách so sánh với kỹ thuật Multiplex PCR do Yamaguchi và cộng sự đề xuất [3].

Kết quả: Kỹ thuật Multiplex Real-time PCR có độ ổn định rất cao, sự thay đổi về nồng độ primer/probe từ 0,2/0,08 đến 0,6/0,24 μ M hay sự thay đổi về nồng độ MgCl₂ từ 3,0 đến 5,0 mM hầu như không ảnh hưởng tới kết quả của phản ứng. Khi thử nghiệm với các mẫu chứng dương có nồng độ từ 100 đến 108 bản sao/phản ứng, kỹ thuật có thể phát hiện khi trong mẫu có từ 101 bản sao/phản ứng. Khi thử nghiệm với 60 chủng *E. coli*, kỹ thuật Multiplex Real-time PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu đều là 100,0%.

Kết luận: Kỹ thuật Multiplex Real-time PCR phát hiện đồng thời 4 gen kháng colistin từ *mcr-1* đến *mcr-4* có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện của kỹ thuật là từ 101 đến 108 copies/phản ứng. Do đó, kỹ thuật có thể áp dụng trong chẩn đoán lâm sàng và giám sát sự lưu hành của vi khuẩn mang gen kháng colistin trong cộng đồng.

Từ khóa: kháng colistin, gen *mcr*, multiplex real-time PCR, phát hiện.

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL-TIME PCR ASSAY FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF FOUR COLISTIN RESISTANCE GENES FROM *mcr-1* TO *mcr-4*

1. Trường Đại học Y Dược Thái Bình

* Tác giả chính: Nguyễn Nam Thắng

Email: thangnn@tbmc.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/6/2024

Ngày phản biện: 28/6/2024

Ngày duyệt bài: 30/6/2024

ABSTRACT

Objective: To design specific primer/probe sets to simultaneously detect 4 colistin resistance genes from *mcr-1* to *mcr-4* using a Multiplex Real-time PCR assay.

Method: The DNA sequences of genes from *mcr-1* to *mcr-4* were analyzed using bioinformatic software (Clustal Omega, BioEdit, Fast PCR) to design 4 specific primer/probe sets for the corresponding genes. After optimizing the primer/probe concentration, MgCl₂ concentration, and determining the detection limit of the Multiplex Real-time PCR assay, we evaluate the sensitivity and specificity of the assay by comparing it with the Multiplex PCR method proposed by Yamaguchi and colleagues [3].

Results: The Multiplex Real-time PCR assay had very high stability, the change in primer/probe concentration from 0.2/0.08 to 0.6/0.24 μ M or the change in MgCl₂ concentration from 3.0 to 5.0 mM hardly affected the test results. When testing with positive control samples with concentrations from 100 to 108 copies/reaction, the assay could detect when the sample contains equal or more than 101 copies/reaction. Testing results with 60 strains of *E. coli* showed that the assay had both sensitivity and specificity of 100.0%.

Conclusions: The Multiplex Real-time PCR assay for simultaneous detection of 4 colistin-resistant genes from *mcr-1* to *mcr-4* had high sensitivity and specificity, and the limit detection of the assay was from 101 to 108 copies/reaction. Therefore, the assay could be applied in clinical diagnosis and monitoring the circulation of bacteria carrying colistin-resistant genes in the community.

Keywords: colistin resistance, *mcr* gene, multiplex real-time PCR, detection.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Colistin là kháng sinh quan trọng để điều trị đối với các trực khuẩn Gram âm đa kháng, đặc biệt là những trường hợp kháng với carbapenems [1]. Tình trạng vi khuẩn kháng colistin do sự xuất hiện của gen *mcr* (mobile colistin resistant gene) hiện

nay làm cho việc điều trị đối với các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn Gram âm trở nên vô cùng khó khăn. Để ngăn chặn sự lan truyền của vi khuẩn kháng colistin trong bệnh viện và trong cộng đồng, nhiều kỹ thuật vi sinh và sinh học phân tử đã được áp dụng để phát hiện kiểu hình hoặc kiểu gen kháng colistin ở vi khuẩn [2]. Các kỹ thuật sinh học phân tử (PCR; multiplex PCR; real-time PCR; WGS) được sử dụng để phát hiện gen mcr có các ưu điểm là độ nhạy, độ đặc hiệu cao, thời gian xét nghiệm nhanh, tuy nhiên chi phí xét nghiệm cao và yêu cầu kỹ năng xét nghiệm chuyên sâu. Để giảm chi phí và đơn giản hóa kỹ thuật xét nghiệm, một số tác giả đã phát triển các kỹ thuật sinh học phân tử có thể phát hiện đồng thời nhiều biến thể của gen mcr trong cùng một phản ứng [3, 4]. Kể từ năm 2015 đến nay có 10 nhóm gen kháng colistin từ mcr-1 đến mcr-10 đã được phát hiện [5], trong đó các gen từ mcr-1 đến mcr-4 xuất hiện phổ biến nhất. Với mong muốn phát triển một kỹ thuật xét nghiệm mới để có thể áp dụng trong chẩn đoán lâm sàng và giám sát vi khuẩn kháng colistin, góp phần ngăn chặn tình trạng vi khuẩn kháng thuốc ở Việt Nam hiện nay, trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ thiết kế các bộ primer/probe đặc hiệu để có thể phát hiện đồng thời 4 gen kháng colistin từ mcr-1 đến mcr-4 bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR trong cùng một phản ứng, đồng thời đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật. Việc phát triển thành công kỹ thuật này sẽ giúp làm giảm chi phí và thời gian xét nghiệm, đơn giản hóa kỹ thuật xét nghiệm và làm tăng độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Trình tự gen tham chiếu của các gen kháng colistin từ mcr-1 đến mcr-4 được tải về từ website của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene>) và phân tích bằng các phần mềm tin sinh học (Clustal Omega, BioEdit, FastPCR) để thiết kế các primer và probe đặc hiệu cho các gen kháng colistin mcr-1, mcr-2, mcr-3 và mcr-4 sử dụng trong kỹ thuật Multiplex Real-time PCR.

Các chủng vi khuẩn *E. coli* được phân lập từ phân người (34 chủng), phân gà (11 chủng), phân lợn (10 chủng), thịt gà (3 chủng) và rau (2 chủng) được sử dụng để thử nghiệm đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR.

2.1.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Dịch vụ Khoa học kỹ thuật Y Dược, Trường Đại học Y Dược Thái Bình trong thời gian từ tháng 10/2022 đến tháng 06/2023.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp thực nghiệm.

2.3. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế primer, probe

Trình tự nucleotide tham chiếu của các biến thể gen mcr được so sánh ghép cặp (alignment) bằng chương trình Clustal Omega trên website của EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Kết quả so sánh ghép cặp được tải về và phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.0 và phần mềm FastPCR để thiết kế các bộ primer/probe đặc hiệu cho từng gen mcr. Các trình tự primer/probe sau khi thiết kế tiếp tục được phân tích bằng chương trình Primer-BLAST và FastPCR để đánh giá độ đặc hiệu của primer/probe và khả năng tương thích của các primer/probe khi phối hợp trong cùng một phản ứng Multiplex Real-time PCR. Tất cả các primer/probe dùng trong nghiên cứu đều được mua từ công ty Integrated DNA Technologies (USA).

2.3.2. Chế tạo bộ chứng dương

Trình tự DNA của các gen kháng colistin từ mcr-1 đến mcr-4 được chèn vào vector pJET 1.2 blunt với bộ sinh phẩm CloneJET™ PCR Cloning Kit (ThermoFisherScientific, USA). Plasmid tái tổ hợp chứa trình tự DNA của các gen từ mcr-1 đến mcr-4 sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến DH10B và nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 18h. Các mẫu nuôi cấy được ly tâm, thu cặn tế bào vi khuẩn và tiến hành tách chiết plasmid tái tổ hợp bằng bộ sinh phẩm GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisherScientific, USA). Hàm lượng plasmid tái tổ hợp trong mẫu được đo mật độ quang để xác định nồng độ DNA. Căn cứ vào kích thước của phân tử plasmid để tính toán số lượng bản sao (copies) trong mẫu, sau đó pha loãng thành các nồng độ từ 100 đến 108 bản sao/μL. Plasmid tái tổ hợp có chứa trình tự DNA của các gen mcr-1, mcr-2, mcr-3 và mcr-4 ở các nồng độ pha loãng khác nhau được sử dụng làm mẫu chứng dương để thử nghiệm kỹ thuật Multiplex Real-time PCR.

2.3.3. Xác định các điều kiện tối ưu và giới hạn phát hiện của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR

Thử nghiệm kỹ thuật multiplex Real-time PCR với các mẫu chứng dương để xác định điều kiện tối ưu về nồng độ primer/probe (từ 0,2/0,08 - 0,6/0,24 μM) và nồng độ MgCl_2 (từ 3,0 - 5,0 mM). Bộ sinh phẩm QuantiNova Multiplex PCR Kit đã được nhà sản xuất tối ưu về chương trình nhiệt nên chúng tôi sử dụng chương trình nhiệt cho phản ứng multiplex Real-time PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thử nghiệm kỹ thuật multiplex Real-time PCR với mẫu chứng dương ở các nồng độ từ 100 đến 108 bản sao/ μL để xác định giới hạn phát hiện của kỹ thuật.

2.3.4. Tách chiết DNA

Các chủng vi khuẩn *E. coli* đã được phân lập từ mẫu bệnh phẩm, mẫu phân người khỏe mạnh, phân gà, phân lợn và mẫu thực phẩm trong các nghiên cứu trước đây được sử dụng để thử nghiệm kỹ thuật Multiplex Real-time PCR. Sau khi nuôi cấy các chủng *E. coli* trong môi trường LB lỏng qua đêm, mẫu nuôi cấy sẽ được ly tâm để thu lấy cặn tế bào vi khuẩn. Tiến hành tách chiết DNA của vi khuẩn bằng phương pháp đun sôi cặn tế bào trong dung dịch TE (Tris HCl - EDTA) ở 95°C trong 10 phút. Sau khi ly tâm thì chuyển dịch nổi có chứa DNA của vi khuẩn sang một tube mới và bảo quản ở -30°C cho đến khi tiến hành thực hiện phản ứng Multiplex Real-time PCR.

2.3.5. Phản ứng Multiplex Real-time PCR

Các mẫu DNA tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* được sử dụng để thực hiện phản ứng Multiplex Real-time PCR phát hiện các gen *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* và *mcr-4* với bộ sinh phẩm QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen, Đức). Thành phần phản ứng Multiplex Real-time PCR có thể tích 20 μL và bao gồm các thành phần: 5 μL QuantiNova Multiplex PCR

Master Mix 4X; 1 μL Primer/probe mix 20X (hỗn hợp gồm 8 μM mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược, 5 μM mỗi loại probe); 12 μL H_2O và 2 μL DNA khuôn. Phản ứng Multiplex Real-time PCR được thực hiện trên hệ thống LightCycler 480 II (Roche). Chương trình nhiệt của phản ứng gồm: 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ gồm: 95°C trong 5 giây và 60°C trong 30 giây. Mỗi lần thực hiện kỹ thuật Multiplex Real-time PCR đều thực hiện đồng thời với mẫu chứng dương cho các gen *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* và mẫu chứng âm kèm theo. Kết quả xét nghiệm được phân tích trên hệ thống LightCycler 480 II bằng phần mềm LC 1.5.2 (Roche). Các mẫu thử có số chu kỳ ngưỡng (CT) từ 35 trở xuống được coi là mẫu dương tính.

2.3.6. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR

Để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR, chúng tôi so sánh kỹ thuật do chúng tôi xây dựng với kỹ thuật Multiplex PCR do Yamaguchi đề xuất [3]. Tất cả 60 chủng vi khuẩn Gram âm đều được tiến hành xét nghiệm đồng thời bằng cả 2 kỹ thuật. Nếu kết quả xét nghiệm của 2 kỹ thuật không tương đồng thì chúng tôi sẽ tiến hành xét nghiệm lại bằng kỹ thuật PCR với một bộ primer khác để khẳng định kết quả.

2.4. Xử lý và phân tích số liệu

Số liệu được nhập vào máy tính và quản lý bằng phần mềm Excel. Phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 22.0.

2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài đã được phê duyệt theo quyết định số 2320/QĐ-UBND ngày 23/09/2021 của Ủy ban nhân dân tỉnh Thái Bình.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1. Trình tự các bộ primer/probe sử dụng để phát hiện các gen kháng colistin *mcr*

Tên mồi, mẫu dò	Gen đích	Trình tự nucleotide 5'-3'	Sản phẩm PCR (bp)
MCR1:F340-365	<i>mcr-1</i>	CAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAA	157
MCR1:R_476-496		CAAGACTTGCCACGATCAAGC	
MCR1:RP_451-475		CYAN500-CCAATCGGCGCATCAAACCCTTGCC-BHQ1	
MCR2:F_7-29	<i>mcr-2</i>	TCACA K CACTCTTGGTATCGCTA	157
MCR2:R_140-163		CCGCCATTGAGAY G ATAAAGCCTA	
MCR2:RP_106-134		FAM-TCCGATACAGGATAGACCGCCATCGCTTT-BHQ2	

Tên mồi, mẫu dò	Gen đích	Trình tự nucleotide 5'-3'	Sản phẩm PCR (bp)
MCR3:F_541-563	mcr-3	AACAATTCAAACCTCCAGCGTGA	161
MCR3:R_677-701		AG R AACATCAACGTGGGCTTACTTT	
MCR3:RP_645-673		HEX-TAGTATCCCGTTTTCATCATCACCTAAA-BHQ2	
MCR4:F_663-682	mcr-4	GAATGCCAGTCGTAACCCGA	145
MCR4:R_786-807		GTAAACGCAATCAGCCCCTGA	
MCR4:RP_709-737		CY5-CTCATTGAGCGCGCAGTTTCACCCACAAC-BHQ2	

Ghi chú: các chữ in đậm và gạch chân trong trình tự của primer là các base thoái hóa (degenerate base): K là G hoặc T; Y là C hoặc T; R là A hoặc G.

Trình tự các primer/probe sử dụng trong kỹ thuật Multiplex Real-time PCR được trình bày trong bảng 1. Để tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật, tại một số vị trí trên trình tự primer chúng tôi có sử dụng các base thoái hóa (degenerate base).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ primer/probe và nồng độ Mg^{2+} đến số chu kỳ ngưỡng của phản ứng Multiplex Real-time PCR

Gen đích	Số chu kỳ ngưỡng và nồng độ primer/probe tương ứng (*)					± sd
	0,2/0,08 μM	0,3/0,12 μM	0,4/0,16 μM	0,5/0,2 μM	0,6/0,24 μM	
mcr-1	26,51	26,69	26,76	26,84	26,81	26,72 ± 0,12
mcr-2	27,15	27,46	27,59	27,74	27,83	27,55 ± 0,24
mcr-3	27,35	27,74	27,82	27,81	27,84	27,71 ± 0,18
mcr-4	26,26	26,51	26,54	26,60	26,61	26,50 ± 0,13
Số chu kỳ ngưỡng và nồng độ $MgCl_2$ tương ứng						
	3,0 mM	3,5 mM	4,0 mM	4,5 mM	5,0 mM	
mcr-1	26,84	26,81	26,64	26,73	26,70	26,74 ± 0,07
mcr-2	27,74	27,66	27,84	27,62	27,56	27,68 ± 0,10
mcr-3	27,81	27,84	27,76	27,70	27,66	27,75 ± 0,07
mcr-4	26,60	26,60	26,59	26,47	26,32	26,52 ± 0,11

Ghi chú: (*): Nồng độ probe tương đương với 40% nồng độ của primer.

Kết quả trong bảng 2 cho thấy khi nồng độ primer/probe và nồng độ $MgCl_2$ thay đổi thì số chu kỳ ngưỡng (CT) của phản ứng Multiplex Real-time PCR thay đổi không đáng kể ở cả 4 nhóm gen. Điều này cho thấy trong khoảng giới hạn nồng độ primer/probe và nồng độ $MgCl_2$ được thử nghiệm thì phản ứng Multiplex Real-time PCR hầu như không bị ảnh hưởng.

Bảng 3. Kết quả xác định giới hạn phát hiện của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR

Gene đích	Số lượng bản sao của gen trong mỗi phản ứng Multiplex Real-time PCR (copies/reaction)									NC*
	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	
mcr-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
mcr-2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
mcr-3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
mcr-4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Chú thích: *: Mẫu chứng âm (Negative control - NC) sử dụng nước siêu sạch để thay cho DNA khuôn; (+): Dương tính; (-): Âm tính.

Thử nghiệm kỹ thuật Multiplex Real-time PCR với các mẫu chứng dương có nồng độ từ 10^0 đến 10^8 bản sao/phản ứng cho thấy kỹ thuật có khả năng phát hiện khi trong mẫu thử có từ 10^1 bản sao/phản ứng trở lên (bảng 3).

Bảng 4. Kết quả phát hiện gen mcr bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR và Multiplex PCR

Kết quả xét nghiệm	Multiplex PCR	Multiplex Real-time PCR
mcr-1	33	35
mcr-3	4	3
mcr-1 & mcr-3	3	3
Không phát hiện	20	19

Khi xét nghiệm cho 60 chủng vi khuẩn *E. coli* thì kỹ thuật Multiplex PCR phát hiện 33 chủng mang gen mcr-1, 4 chủng mang gen mcr-3, 3 chủng mang đồng thời gen mcr-1 và gen mcr-3 và 20 chủng không mang gen từ mcr-1 đến mcr-5. Trong khi đó, kỹ thuật Multiplex Real-time PCR phát hiện có 35 chủng mang gen mcr-1, 3 chủng mang gen mcr-3, 3 chủng mang đồng thời gen mcr-1 và gen mcr-3 và 19 chủng không mang gen từ mcr-1 đến mcr-4. Sự khác biệt này liên quan đến kết quả xét nghiệm ở 2 chủng *E. coli*: một chủng được xác định là không mang gen với kỹ thuật Multiplex PCR nhưng khi xét nghiệm bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR thì được xác định là mang gen mcr-1; một chủng khác được xác định là mang gen mcr-3 với kỹ thuật Multiplex PCR nhưng khi xét nghiệm bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR thì được xác định là mang gen mcr-1 mà không mang gen mcr-3. Cả hai chủng *E. coli* này được xét nghiệm khẳng định bằng kỹ thuật PCR với các cặp primer khác và đều cho kết quả dương tính với gen mcr-1.

Bảng 5. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR và Multiplex PCR

Multiplex Real-time PCR Multiplex PCR	Dương tính	Âm tính	Tổng
Dương tính	39	1	40
Âm tính	2	18	20
Tổng	41	19	60

Từ các kết quả trong bảng 5 có thể xác định được độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex PCR lần lượt là 95,1% và 94,7%, trong khi độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR đều là 100,0%.

IV. BÀN LUẬN

4.1. Phát triển và tối ưu hóa kỹ thuật Multiplex Real-time PCR

Real-time PCR và PCR là những kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng phổ biến trong chẩn đoán và giám sát sự lưu hành của các gen kháng thuốc ở vi khuẩn do kỹ thuật này có độ nhạy, độ đặc hiệu cao và thời gian xét nghiệm nhanh [2]. Tuy nhiên do số lượng các gen kháng thuốc ở vi khuẩn rất nhiều nên một số tác giả đã thiết kế các kỹ thuật nhằm có thể phát hiện đồng thời nhiều gen kháng thuốc khác nhau trong cùng một phản ứng Multiplex PCR hoặc Multiplex Real-time PCR [3, 4]. Riêng đối với gen kháng colistin mcr, đến nay đã có tới 10 nhóm gen được phát hiện [5], trong đó các gen từ mcr-1 đến mcr-4 được lưu hành phổ biến,

trong khi các nhóm gen còn lại rất ít gặp. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thiết kế 4 bộ primer/probe đặc hiệu cho các gen từ mcr-1 đến mcr-4 để có thể sử dụng trong kỹ thuật Multiplex Real-time PCR. Do trình tự DNA của các gen kháng colistin mcr có độ biến đổi cao nên đối với một số primer chúng tôi đã sử dụng các base thoái hóa để làm tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật (bảng 1).

Kỹ thuật Multiplex Real-time PCR được thực hiện với bộ sinh phẩm QuantiNova Multiplex PCR Kit. Để tối ưu hóa kỹ thuật Multiplex Real-time PCR, chúng tôi thử nghiệm kỹ thuật với các mẫu chứng dương (103 bản sao/phản ứng) và thay đổi về nồng độ primer/probe và nồng độ $MgCl_2$ trong phản ứng. Kết quả cho thấy sự thay đổi về nồng

độ primer/probe trong khoảng từ 0,2/0,08 đến 0,6/0,24 μM và nồng độ MgCl_2 trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 mM hầu như không ảnh hưởng đến số chu kỳ ngưỡng (cycle threshold - CT) của kỹ thuật (bảng 2). Do đó chúng tôi lựa chọn nồng độ primer/probe là 0,2/0,08 μM và nồng độ MgCl_2 là 3,0 mM để thực hiện kỹ thuật.

Để xác định giới hạn phát hiện của kỹ thuật, chúng tôi tiến hành thử nghiệm với các mẫu chứng dương có nồng độ từ 100 đến 108 bản sao trong một phản ứng. Kết quả cho thấy kỹ thuật có khả năng phát hiện khi trong mẫu thử có từ 101 bản sao/phản ứng trở lên (bảng 3). So với nghiên cứu của Gong và cộng sự [6] thì kỹ thuật của chúng tôi có giới hạn phát hiện thấp hơn (101 so với 102 bản sao/phản ứng), cho thấy kỹ thuật có thể áp dụng trong chẩn đoán lâm sàng cũng như trong nghiên cứu, giám sát vi khuẩn kháng colistin.

4.2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR

Kết quả thử nghiệm với 60 chủng *E. coli* bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR do chúng tôi phát triển và kỹ thuật Multiplex PCR của Yamaguchi (bảng 4) cho thấy có 2 chủng *E. coli* có kết quả xét nghiệm không tương đồng ở hai kỹ thuật. Chúng tôi đã xét nghiệm khẳng định lại cho 2 chủng *E. coli* đó bằng kỹ thuật PCR với một cặp primer khác. Kết quả xét nghiệm khẳng định hoàn toàn trùng lặp với kết quả xét nghiệm của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR cho thấy kỹ thuật Multiplex Real-time PCR có độ chính xác cao hơn so với kỹ thuật Multiplex PCR. Độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật Multiplex Real-time PCR đều đạt 100,0%, cao hơn so với kỹ thuật Multiplex PCR do Yamaguchi đề xuất (bảng 5).

V. KẾT LUẬN

Kỹ thuật Multiplex Real-time PCR phát hiện đồng thời 4 gen kháng colistin từ *mcr-1* đến *mcr-4* do chúng tôi thiết kế có độ nhạy và độ đặc hiệu đều là

100,0% và kỹ thuật có khả năng phát hiện khi trong mẫu thử có từ 101 bản sao trở lên. Do đó, kỹ thuật Multiplex Real-time PCR phát hiện đồng thời 4 gen kháng colistin từ *mcr-1* đến *mcr-4* có thể ứng dụng trong chẩn đoán lâm sàng và nghiên cứu, giám sát vi khuẩn kháng colistin trong cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kasiakou SK, Michalopoulos A, Soteriades ES, et al. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3136-3146.
2. Osei Sekyere J. *Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods.* *Microbiologyopen.* 2019;8(4):e00682.
3. Yamaguchi T, Kawahara R, Harada K, et al. The presence of colistin resistance gene *mcr-1* and -3 in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(11):10.1093/femsle/fny100.
4. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill.* 2018;23(6):17-00672.
5. Shen Y, Zhang R, Schwarz S, et al. Farm animals and aquaculture: significant reservoirs of mobile colistin resistance genes. *Environ Microbiol.* 2020;22(7):2469-2484.
6. Gong X, Yang G, Liu W, et al. A multiplex Taq-Man real-time PCR assays for the rapid detection of mobile colistin resistance (*mcr-1* to *mcr-10*) genes. *Front Microbiol.* 2024;15:1279186.