

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI HAI GEN ĐÍCH CỦA *Chlamydia trachomatis*

Nguyễn Nam Thắng^{1*}, Bùi Đức Độ¹, Nguyễn Thị Hoa¹, Trần Thị Hòa¹,
Phan Ngọc Quang¹, Bùi Hương Dung¹, Đông Văn Quyên²

¹Trường Đại học Y Dược Thái Bình

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: PCR là một kỹ thuật thường được áp dụng trong sàng lọc nhiễm khuẩn đường sinh dục do *Chlamydia trachomatis* (CT). Tuy nhiên, một số chủng CT không có plasmid nên các kỹ thuật PCR sử dụng DNA plasmid là trình tự đích sẽ cho kết quả âm tính giả. Nghiên cứu này phát triển một kỹ thuật multiplex PCR (mPCR) có thể phát hiện cả trình tự DNA plasmid và trình tự gen *omp1* của CT nhằm khắc phục được hiện tượng âm tính giả ở trên. Từ 7 cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen *omp1* và plasmid của CT, sau khi thử nghiệm trong các điều kiện khác nhau, cuối cùng hai cặp mồi CTM-F1R1 và CTP-F1R2 đã được lựa chọn để sử dụng trong kỹ thuật mPCR phát hiện đồng thời các trình tự đặc hiệu trên DNA plasmid (434 bp) và trên gen *omp1* (153 bp). Sử dụng kỹ thuật mPCR, chúng tôi có thể phát hiện CT trong các mẫu bệnh phẩm nếu có 5 bản sao (hoặc hơn) của gen *omp1* và/hoặc 5 bản sao (hoặc hơn) của plasmid. Kỹ thuật này đã được thử nghiệm trên 128 mẫu quét cổ tử cung và so sánh với kết quả của 2 kỹ thuật PCR khác. Kỹ thuật mPCR có độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm đều là 100%. Ngoài ra, kỹ thuật mPCR của chúng tôi có thể loại trừ kết quả âm tính giả trong trường hợp chủng CT không có plasmid. Do đó, kỹ thuật này có thể được áp dụng trong chẩn đoán và/hoặc sàng lọc CT trong cộng đồng.

Từ khóa: *Chlamydia trachomatis*, multiplex PCR, *omp1*, plasmid.

MỞ ĐẦU

Chlamydia trachomatis là vi khuẩn chỉ gây bệnh ở người, gram âm, không có khả năng di động và ký sinh nội bào bắt buộc. CT được chia thành 15 typ huyết thanh chính ký hiệu bằng chữ cái từ A-K, ngoài ra còn có một số phân typ như Ba, Da, Ia và L2a. Trong số các typ trên, có 8 typ D, E, F, G, H, I, J và K là nguyên nhân gây viêm đường niệu sinh dục ở người, một trong những bệnh lây truyền qua đường tình dục phổ biến nhất trên thế giới. Tổ chức Y tế thế giới ước tính hàng năm có khoảng 131 triệu ca nhiễm mới CT được phát hiện (WHO, 2015).

Nhiễm CT nếu được phát hiện sớm và điều trị bằng các kháng sinh đặc hiệu, bệnh sẽ khỏi hoàn toàn. Khó khăn lớn nhất để kiểm soát bệnh do CT là khoảng 75% nữ giới và khoảng 50% nam giới nhiễm vi khuẩn nhưng không hề có bất kỳ triệu chứng nào nên không được điều trị (Honey et al., 2002). Những người mang mầm bệnh này chính là nguồn lây nhiễm đối với bạn tình của họ. Ngoài ra, do không được điều trị nên viêm đường niệu sinh dục do CT có thể dẫn

đến viêm mào tinh, làm giảm chất lượng tinh trùng dẫn đến vô sinh ở nam giới; viêm vùng chậu, viêm tử cung-vòi trứng, chửa ngoài tử cung hoặc vô sinh ở nữ giới. Sàng lọc tình trạng nhiễm CT ở phụ nữ trẻ tuổi có quan hệ tình dục là phương pháp đã được chứng minh có hiệu quả cao trong việc phòng ngừa các biến chứng của bệnh, do đó hầu hết các tổ chức sức khỏe cộng đồng ở Hoa Kỳ và châu Âu đều khuyến cáo nên thực hiện xét nghiệm sàng lọc CT ở phụ nữ trẻ có quan hệ tình dục (Honey et al., 2002; Shish et al., 2004).

Thời gian gần đây có rất nhiều nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật PCR để phát hiện CT do kỹ thuật này có độ nhạy rất cao. Hầu hết các nghiên cứu đều thiết kế các cặp mồi nhằm phát hiện trình tự DNA trên plasmid hoặc trên gen mã hóa protein màng ngoài (*omp1*) của vi khuẩn (Jalal et al., 2006; Mahony et al., 1994; Roosendaal et al., 1993). Kỹ thuật PCR sử dụng trình tự DNA plasmid làm gen đích sẽ có hiệu quả cao hơn so với gen *omp1* vì mỗi vi khuẩn có từ 7-10 bản sao DNA plasmid nhưng chỉ có 1

bản sao của gen *omp1*. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy một số chủng CT không có plasmid trong hệ gen (Farencena et al., 1997; Stothard et al., 1998), do đó kỹ thuật PCR sử dụng trình tự DNA plasmid làm gen đích có thể cho kết quả âm tính giả. Để nâng cao hiệu quả phát hiện CT bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm phát triển và chuẩn hóa kỹ thuật multiplex PCR phát hiện đồng thời trình tự DNA trên plasmid và trên gen *omp1* của CT.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm bao gồm 128 mẫu quét cổ tử cung của bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng là viêm cổ tử cung. Mẫu bệnh phẩm sau khi lấy được giữ trong ống Falcon có chứa 2 ml dung dịch 2SP (2-sucrose-phosphate transport medium), bảo quản ở 4°C và đưa về phòng thí nghiệm trong vòng 2-3 giờ. Tiến hành tách chiết DNA với bộ sinh phẩm Qiap DNA Mini Kit (Quiagen, CHLB Đức) và lưu giữ DNA ở -20°C cho đến khi thực hiện phản ứng PCR.

Mẫu chứng dương

Để thử nghiệm kỹ thuật multiplex PCR (mPCR), chúng tôi sử dụng chứng dương là trình tự DNA plasmid và trình tự DNA gen *omp1* của CT đã dòng hóa vào vector pJET1.2/blunt (Fermentas, CHLB Đức). Số lượng bản sao của các mẫu chứng dương được tính toán theo công thức:

$$n = \frac{m * 6.022 * 10^{23}}{650 * l * 10^9}$$

trong đó n là số lượng bản sao, m là khối lượng DNA tính bằng ng, l là kích thước của trình tự DNA tính bằng bp. Mẫu chứng dương được pha loãng thành các mẫu chuẩn có số bản sao là 5, 20, 50, 10², 10³, 10⁴ và 10⁵ trong 1 µl.

Thiết kế mồi

Sử dụng các trình tự nucleotide plasmid và gen *omp1* của CT đã được công bố trên GenBank và so sánh các trình tự bằng phần mềm Clustal X 2.0. Sau khi phân tích bằng phần mềm FastPCR (version 5.4.19), chúng tôi đã thiết kế các mồi để khuếch đại các trình tự tương ứng trên plasmid và trên gen *omp1* của CT như trong bảng 1.

Bảng 1. Thông tin về các mồi được thiết kế để sử dụng trong nghiên cứu

Trình tự mồi (5' - 3')	Gen đích	Vị trí	Tm (°C)
CTM-F1: WAGGACRCAGTGCCGCCAGAA	<i>omp1</i>	12-32	62
CTM-R1: GGATCCCCACAGGCAGAGC	<i>omp1</i>	145-164	61
CTM-F2: CTRTGGGAAGGTTTCGGYGGA	<i>omp1</i>	196-216	59
CTM-R2: CATCWGTTTTBCAAAACACGGTCG	<i>omp1</i>	291-313	57
CTP-F1: GGGACAAMATCAACACCTGTCGCA	Plasmid	4517-4540	61
CTP-R1: MCTGGGAGTGAATAACCCGTTGC	Plasmid	4800-4822	60
CTP-R2: GCTAGAACAACGCCGCTTCC	Plasmid	4930-4950	61

B=C/G/T; M=A/C; R=A/G; Y=C/T; W=A/T; Tm: Nhiệt độ nóng chảy của mồi.

Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20 µl bao gồm: 2 pmol mỗi loại mồi; 200 µM mỗi loại deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dUTP, dGTP); 2 mM MgCl₂; 0,5 U Taq polymerase (Fermentas, CHLB Đức); 0,2 U Uracil N glycosylase (Fermentas, CHLB Đức) và 1 µl DNA tách chiết (hoặc DNA chứng dương). Phản ứng được thực hiện trên máy luân nhiệt Mastercycler gradient (Eppendorf, CHLB Đức). Điện di 10 µl sản phẩm phản ứng PCR

trên gel agarose 2% và nhuộm ethidium bromide. Quan sát và phân tích kết quả trên hệ thống chụp ảnh gel.

Lựa chọn cặp mồi cho phản ứng mPCR và tối ưu hóa các điều kiện phản ứng

Để lựa chọn 2 cặp mồi thích hợp nhất sử dụng trong phản ứng mPCR (một cặp mồi phát hiện trình tự DNA plasmid, một cặp mồi phát hiện trình tự DNA gen *omp1*), chúng tôi tiến hành thử nghiệm từng cặp mồi trong bảng 1 với mẫu chứng dương để xác định hai cặp mồi có

hiệu quả khuếch đại tốt nhất đối với trình tự đặc hiệu trên gen *omp1* và trên DNA plasmid. Hai cặp mồi được lựa chọn sẽ được sử dụng trong kỹ thuật mPCR và thử nghiệm trên mẫu chứng dương để xác định các điều kiện tối ưu của kỹ thuật.

Giới hạn phát hiện của kỹ thuật

Sau khi tối ưu hóa, kỹ thuật mPCR phát hiện CT được thử nghiệm với các mẫu chuẩn có số bản sao là 5, 20, 50, 10^2 , 10^3 , 10^4 và 10^5 trong 1 μ l. Số lượng bản sao nhỏ nhất trong một phản ứng mà kỹ thuật mPCR có thể phát hiện được coi là giới hạn phát hiện của kỹ thuật.

Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính và âm tính của kỹ thuật

Kỹ thuật mPCR với tổ hợp mồi CTM-F1R1/CTP-F1R2 được thực hiện trên 128 mẫu DNA cùng với hai kỹ thuật PCR khác (một kỹ thuật sử dụng cặp mồi KL1/KL2 phát hiện trình tự DNA plasmid (Jalal et al., 2006) và một kỹ thuật sử dụng cặp mồi CtM1/CtM2 phát hiện trình tự DNA gen *omp1* (Roosendaal et al., 1993). Các mẫu có kết quả không tương đồng giữa các kỹ thuật sẽ được kiểm tra lại bằng kỹ thuật PCR sử dụng 2 cặp mồi khác do chúng tôi thiết kế để đưa ra kết luận cuối cùng. Độ nhạy,

độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính, giá trị tiên đoán âm tính của kỹ thuật mPCR được tính toán dựa vào các công thức thống kê y học.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xây dựng và chuẩn hóa kỹ thuật mPCR

Kết quả thử nghiệm từng cặp mồi với chứng dương cho thấy tất cả các cặp mồi đều có khả năng khuếch đại trình tự đặc hiệu tương ứng của CT. Từng cặp mồi được thử nghiệm để xác định điều kiện tối ưu về nhiệt độ gắn mồi (T_a) và nồng độ mồi. Giới hạn phát hiện của từng cặp mồi cũng được xác định dựa vào kết quả thử nghiệm với các mẫu chuẩn có số lượng bản sao khác nhau (bảng 2).

Kết quả trong bảng 2 cho thấy, các cặp mồi CTM-F1R1, CTM-F1R2 và CTP-F1R2 có giới hạn phát hiện thấp nhất (5 bản sao trong 1 phản ứng), do đó các cặp mồi này được lựa chọn để sử dụng trong kỹ thuật mPCR. So sánh kỹ thuật mPCR với từng tổ hợp mồi, chúng tôi nhận thấy tổ hợp mồi CTM-F1R1/CTP-F1R2 đạt hiệu quả tốt hơn so với tổ hợp mồi CTM-F1R2/CTP-F1R2 (kết quả không được trình bày). Do đó cặp mồi CTM-F1R1/CTP-F1R2 được lựa chọn để sử dụng trong kỹ thuật mPCR.

Bảng 2. Kết quả xác định điều kiện tối ưu và giới hạn phát hiện của từng cặp mồi

Cặp mồi	Trình tự đích	Sản phẩm PCR (bp)	Khoảng T_a thích hợp ($^{\circ}$ C)	Nồng độ mồi thích hợp (μ M)	Giới hạn phát hiện (copies/rxn)
CTM-F1R1	<i>omp1</i>	153	58-65	1	5
CTM-F2R2	<i>omp1</i>	118	57-61	1,5	10^2
CTM-F1R2	<i>omp1</i>	302	58-62	1	5
CTP-F1R1	plasmid	306	58-62	1	20
CTP-F1R2	plasmid	434	57-63	1	5

Trên thế giới đã có nhiều nhà khoa học xây dựng các kỹ thuật phát hiện CT trên cơ sở kỹ thuật PCR (Jalal et al., 2006; Mahony et al., 1994; Roosendaal et al., 1993). Một số tác giả sử dụng trình tự đích là plasmid của CT, một số khác lại sử dụng các gen đơn bản như gen mã hóa protein màng ngoài chủ yếu (*omp1*), gen mã hóa protein màng ngoài giàu cysteine hoặc gen mã hóa 23S rRNA. Nghiên cứu của Roosendaal et al. (1993) cho thấy kỹ thuật PCR sử dụng trình tự đích là plasmid có độ nhạy cao hơn so

với các gen đơn bản, bởi vì trong mỗi vi khuẩn CT có từ 7-10 bản sao plasmid. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cũng đã phát hiện các chủng vi khuẩn CT không có plasmid và gây ra hiện tượng âm tính giả trong chẩn đoán (Farencena et al., 1997; Stothard et al., 1998). Trong nghiên cứu này, kỹ thuật mPCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho cả trình tự plasmid và trình tự gen *omp1*, như vậy sẽ vẫn giữ được ưu điểm về độ nhạy của kỹ thuật đồng thời hạn chế được hiện tượng âm tính giả ở những chủng vi khuẩn

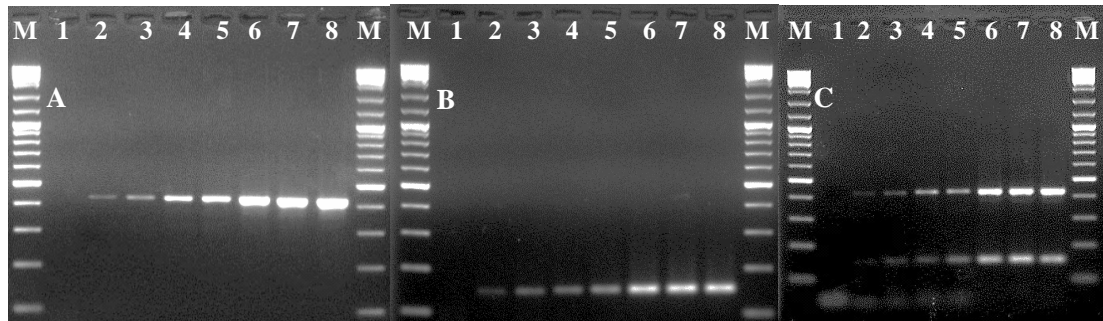
không có plasmid. Các cặp mồi đều được thiết kế để phát hiện tất cả các phân tử CT với nhiệt độ gắn mồi ở khoảng 60°C để có thể sử dụng đồng thời trong phản ứng mPCR.

Kỹ thuật PCR có độ nhạy rất cao nên ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán các bệnh nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, nếu không được thực hiện trong các điều kiện chuẩn mực, kỹ thuật PCR cũng có thể gây ra hiện tượng dương tính giả do nhiễm phải sản phẩm PCR của những lần xét nghiệm trước đó. Để khắc phục hiện tượng này, chúng tôi thực hiện kỹ

thuật tại các khu vực chuyên biệt, sử dụng đầu côn lọc và thường xuyên thay gắng tay trong quá trình thao tác. Mỗi lần thực hiện kỹ thuật, chúng tôi đều thực hiện đồng thời với các mẫu chứng âm và chứng dương. Đặc biệt là tất cả các phản ứng PCR đều sử dụng Uracyl N-glycosylase, enzyme có tác dụng phá hủy các sản phẩm PCR lây nhiễm vào trong phản ứng. Sau khi thử nghiệm trong các điều kiện khác nhau, thành phần phản ứng và chương trình nhiệt tối ưu của kỹ thuật mPCR đã được xác định (bảng 3).

Bảng 3. Thành phần phản ứng và chương trình nhiệt tối ưu của phản ứng mPCR

Thành phần phản ứng tối ưu		Chương trình nhiệt tối ưu		
Sinh phẩm	Thể tích (μl)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
Nước siêu sạch	15,5	37	15'	1
PCR buffer (10X)	2	95	10'	1
dNTP mix (10 mM mỗi loại)	0,4	95	15"	40
Cặp mồi CTM-F1R1, 10 μM	0,2	60	30"	40
Cặp mồi CTP-F1R2, 10 μM	0,2	72	30"	40
Taq DNA polymerase (1 u/μl)	0,5	72	10'	1
Uracil N Glycosylase (1 u/μl)	0,2	4	∞	
ADN khuôn	1			
Tổng	20			



Hình 1. Kết quả thử nghiệm xác định giới hạn phát hiện của kỹ thuật

A. Kỹ thuật PCR đơn với cặp mồi CTP-F1R2; B. Kỹ thuật PCR đơn với cặp mồi CTM-F1R1; C. Kỹ thuật mPCR với hai cặp mồi CTP-F1R2 và CTM-F1R1. M: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: Mẫu chứng âm; 2-8: Mẫu chứng dương với số bản sao lần lượt là 5, 20, 50, 10², 10³, 10⁴, 10⁵.

Với các điều kiện tối ưu (như trong bảng 3), kỹ thuật mPCR với tổ hợp mồi CTM-F1R1/CTP-F1R2 có thể phát hiện 100% các mẫu thử có từ 5 bản sao plasmid và/hoặc 5 bản sao gen *omp1* trở lên, tương đương với giới hạn phát hiện của kỹ thuật PCR với từng cặp mồi

riêng rẽ (hình 1). Bởi mỗi vi khuẩn thường có từ 7-10 plasmid nên kỹ thuật của chúng tôi có thể phát hiện được trình tự DNA plasmid khi trong mẫu thử chỉ có 1 vi khuẩn. Với giới hạn phát hiện như vậy, kỹ thuật mPCR do chúng tôi xây dựng không chỉ có thể áp dụng trong chẩn đoán

phát hiện CT từ mẫu quét cổ tử cung mà còn có thể áp dụng trong sàng lọc không xâm lấn trên mẫu bệnh phẩm là nước tiểu.

Đánh giá hiệu quả của kỹ thuật mPCR

Để đánh giá hiệu quả của kỹ thuật mPCR, chúng tôi đã thử nghiệm kỹ thuật trên 128 mẫu quét cổ tử cung của phụ nữ bị viêm cổ tử cung và so sánh với kết quả xét nghiệm của 2 kỹ

thuật PCR khác: một kỹ thuật sử dụng cặp mồi KL1/KL2 phát hiện trình tự plasmid có kích thước 241 bp (Jalal et al., 2006); một kỹ thuật khác sử dụng cặp mồi CtM1/CtM2 phát hiện trình tự gen *omp1* có kích thước 129 bp (Roosendaal et al., 1993). Trong trường hợp kết quả của các kỹ thuật không tương đồng, chúng tôi sử dụng 2 cặp mồi CTM-F1R2 và CTP-F1R1 để khẳng định kết quả (bảng 4).

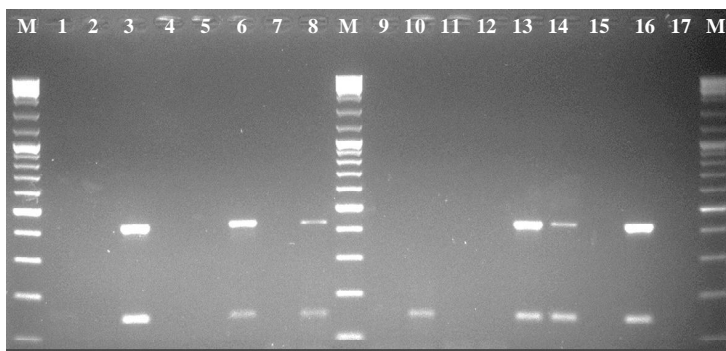
Bảng 4. Kết quả xét nghiệm bằng 3 kỹ thuật PCR trên 128 mẫu bệnh phẩm

Số lượng	Multiplex PCR		Single PCR		Kiểm tra lại		Kết luận
	CTM-F1R1 (<i>omp1</i>)	CTP-F1R2 (plasmid)	CtM1/CtM2 (<i>omp1</i>)	KL1/KL2 (plasmid)	CTM-F1R2 (<i>omp1</i>)	CTP-F1R1 (plasmid)	
36	+	+	+	+	ND	ND	Dương tính
5	+	+	-	+	+	+	Dương tính
1	+	+	-	-	+	+	Dương tính
2	+	-	+	-	+	-	Dương tính*
1	+	-	-	-	+	-	Dương tính*
83	-	-	-	-	ND	ND	Âm tính

Trong dấu ngoặc đơn () là trình tự đích của kỹ thuật PCR; ND: không thực hiện; dấu * là những mẫu vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* không có plasmid.

Kết quả trong bảng 4 cho thấy, 36/128 mẫu dương tính và 83/128 mẫu âm tính được xác định chính xác bởi cả 3 kỹ thuật mPCR, PCR đơn với mồi CtM1/CtM2 và PCR đơn với mồi KL1/KL2; 9/128 mẫu được kỹ thuật mPCR phát hiện chính xác, nhưng kỹ thuật PCR đơn với mồi CtM1/CtM2 và/hoặc kỹ thuật PCR đơn với mồi KL1/KL2 không phát hiện được, trong khi đó có 5 mẫu được phát hiện bởi kỹ thuật mPCR

và PCR với mồi KL1/KL2 nhưng lại âm tính với mồi CtM1/CtM2. Kết quả này có thể là do giới hạn phát hiện của kỹ thuật PCR với mồi CtM1/CtM2 thấp hơn so với kỹ thuật PCR với mồi KL1/KL2 và kỹ thuật mPCR. Tương tự, kỹ thuật mPCR của chúng tôi cũng thể hiện độ nhạy cao hơn khi có 1 mẫu được phát hiện bởi kỹ thuật mPCR nhưng cả 2 kỹ thuật PCR đơn đều không phát hiện được.



Hình 2. Kết quả xét nghiệm trên một số mẫu dịch quét cổ tử cung của kỹ thuật mPCR

M: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: Mẫu chứng âm; 8: Mẫu chứng dương 20 bản sao; các mẫu 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 15, 17 là các mẫu âm tính; các mẫu 3, 6, 10, 13, 14, 16 là các mẫu dương tính, trong đó mẫu 10 chỉ phát hiện trình tự đặc hiệu của gen *omp1*.

Đặc biệt trong số 45 mẫu dương tính chúng tôi đã phát hiện, có 3 mẫu (6,7%) là các chủng CT không có plasmid và không được phát hiện bởi kỹ thuật PCR đơn với mồi KL1/KL2. Điều

này cho thấy, vi khuẩn CT không có plasmid không phải là hiếm gặp ở Việt Nam và cũng ảnh hưởng không nhỏ đến kết quả chẩn đoán. Trong 3 chủng này, 2 chủng được phát hiện bởi kỹ

thuật mPCR và kỹ thuật PCR đơn với mỗi CtM1/CtM2; 1 chủng chỉ được phát hiện bởi mPCR, sau đó được khẳng định lại bằng kỹ thuật PCR đơn với cặp mỗi CTM-F1R2 và CTP-F1R1 do chúng tôi thiết kế.

Như vậy, độ chính xác của kỹ thuật mPCR đạt 100% (128/128); kỹ thuật PCR đơn mỗi KL1/KL2 đạt 96,9% (124/128) và kỹ thuật PCR đơn mỗi CtM1/CtM2 đạt 94,5% (121/128). Hình 2 là kết quả xét nghiệm của kỹ thuật mPCR trên một số mẫu bệnh phẩm, trong đó có 1 mẫu nhiễm chủng CT không có plasmid.

Trong bảng 5, chúng tôi so sánh độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính, giá trị tiên đoán âm tính của kỹ thuật mPCR với kỹ thuật

PCR đơn với mỗi CtM1/CtM2 và kỹ thuật PCR đơn với mỗi KL1/KL2.

Kết quả trong bảng 5 cho thấy kỹ thuật mPCR do chúng tôi xây dựng có độ nhạy tới 100%, cao hơn hẳn so với kỹ thuật PCR đơn sử dụng mỗi KL1/KL2 (91,1%) và kỹ thuật PCR đơn sử dụng mỗi CtM1/CtM2 (84,4%). Cả 3 kỹ thuật này đều có độ đặc hiệu và giá trị tiên đoán dương tính đạt 100%, tuy nhiên, giá trị tiên đoán âm tính của kỹ thuật PCR đơn sử dụng mỗi KL1/KL2 là 95,6% và kỹ thuật PCR đơn sử dụng mỗi CtM1/CtM2 là 84,4%, trong khi giá trị tiên đoán âm tính của kỹ thuật mPCR đạt 100%. Như vậy, kỹ thuật mPCR do chúng tôi xây dựng có độ nhạy và giá trị tiên đoán âm tính cao hơn hẳn so với các kỹ thuật PCR đơn.

Bảng 5. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính, giá trị tiên đoán âm tính của 3 kỹ thuật PCR

	Dương tính thật	Âm tính thật	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	Giá trị tiên đoán dương	Giá trị tiên đoán âm
KL1/KL2						
Dương tính	41	0	91,1		100,0	
Âm tính	4	83		100,0		95,4
CtM1/CtM2						
Dương tính	38	0	84,4		100,0	
Âm tính	7	83		100,0		92,2
Multiplex PCR						
Dương tính	45	0	100,0		100,0	
Âm tính	0	83		100,0		100,0
Tổng	45	83				

KẾT LUẬN

Kỹ thuật mPCR phát hiện đồng thời trình tự DNA plasmid và trình tự gen *omp1* do chúng tôi xây dựng có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, cho kết quả chính xác hơn so với các kỹ thuật PCR đơn mỗi thường được sử dụng. Do đó, kỹ thuật mPCR có thể ứng dụng trong chẩn đoán và/hoặc sàng lọc CT tại cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Farencena A., Comanducci M., Donati M., Ratti G., Cevenini R., 1997. Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect. Immun.*, 65(7): 2965-2969.

Honey E., Augood C., Templeton A., Russell I., Paavonen J., Mardh P. A., Stary A., Stray-Pedersen B., 2002. Cost effectiveness of screening for *Chlamydia trachomatis*: a review of published study. *Sex. Transm. Infect.*, 78(6): 406-412.

Jalal H., Stephen H., Curran M. D., Burton J., Bradley M., Carne C., 2006. Development and Validation of a Rotor-Gene Real-Time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of *Chlamydia trachomatis* in a Single Reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 44(1): 206-213.

Mahony J. B., Luinstra K. E., Waner J., McNab G., Hobrankska H., Gregson D., Sellors J. W., Chernesky M. A. 1994. Interlaboratory

- agreement study of a double set of PCR plasmid primers for detection of *Chlamydia trachomatis* in a variety of genitourinary specimens. J. Clin. Microbiol., 32(1): 87-91.
- Roosendaal R., Walboomers J. M., Veltman O. R., Melgers I., Burger C., Bleker O. P., MacClaren D. M., Meijer C. J., van den Brule A. J., 1993. Comparison of different primer sets for detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. J. Med. Microbiol., 38(6): 426-433.
- Shish S., Scholle S., 2004. *Chlamydia* screening among sexually active young female enrollees of health plans, United States, 1999-2001. Morb. Mortal. Wkly. Rep., 53(42): 983-985.
- Stothard D. A., Williams J. A., Van Der Pol B., Jones R. B., 1998. Identification of a *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. Infect. Immun., 66(12): 6010-6013.
- WHO, 2015. Sexually transmitted infections (STIs) - Fact sheet N°110, Updated December 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>. Access 13 Jan.2016.

**ESTABLISHMENT OF A MULTIPLEX PCR ASSAY
FOR SIMULTANEOUSLY DETECTING TWO TARGET SEQUENCES OF
*Chlamydia trachomatis***

**Nguyen Nam Thang^{1*}, Bui Duc Do¹, Nguyen Thi Hoa¹, Tran Thi Hoa¹,
Phan Ngoc Quang¹, Bui Huong Dung¹, Dong Van Quyen²**

¹Thai Binh University of Medicine and Pharmacy

²Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

PCR is a technique commonly applied in screening urogenital tract infections caused by *Chlamydia trachomatis* (CT). Since some CT strains might not have plasmid, the PCR technique using DNA plasmid sequence as target would produce false negative results. This study developed a multiplex PCR (mPCR) assay that could detect both DNA plasmid and *omp1* gene sequences of CT in order to avoid these false negative results. Originally, 7 primer pairs were designed based on DNA plasmid and *omp1* gene sequences of CT. After being tested in different conditions, two primer pairs CTM-F1R1 and CTP-F1R2 were finally selected to be used in the mPCR assay that could simultaneously detect specific sequences on DNA plasmid (434 bp) and on *omp1* gene (153 bp). CT could be detected by mPCR if there were 5 or more copies of *omp1* gene and/or 5 or more copies of plasmid in suspected samples. The assay was tested on 128 endocervical swab specimens and the results were then compared with those of 2 other PCR assays. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value of the mPCR assay were all 100%. Additionally, this assay could eliminate false negative results of CT strains which do not contain plasmids. Thus, the developed assay might be applied in diagnosis and/or screening CT in the community.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, multiplex PCR, *omp1*, plasmid.

Citation: Nguyen Nam Thang, Bui Duc Do, Nguyen Thi Hoa, Tran Thi Hoa, Phan Ngoc Quang, Bui Huong Dung, Dong Van Quyen, 2017. Establishment of a multiplex pcr assay for simultaneously detecting two target sequences of *Chlamydia trachomatis*. Tap chi Sinh hoc, 39(1): 108-114. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.8396.

*Corresponding author: nnthang_tmu@yahoo.com.vn.

Received 21 September 2015, accepted 20 March 2017