

u lympho với nhóm đối chứng ($p<0,05$). Kết quả gợi ý vai trò của HK2 trong quá trình hình thành u lympho và tiềm năng của HK2 trong tiên lượng và đánh giá hiệu quả điều trị.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi quỹ NAFOSTED trong đề tài mã số 108.02-2018.312.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Calvo-Vidal MN, Cerchietti L.** The metabolism of lymphomas. Current Opinion in Hematology. 2013; 20(4): 345. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283623d16
- Jiao L, Zhang HL, Li DD, et al.** Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2). Autophagy. 2018;14(4):671-684. doi:10.1080/15548627.2017.1381804
- Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, et al.** Hexokinase 2 Is Required for Tumor Initiation and Maintenance and Its Systemic Deletion Is Therapeutic in Mouse Models of Cancer. Cancer Cell. 2013;24(2):213-228. doi:10.1016/j.ccr.2013.06.014
- Porrata LF, Ristow K, Colgan JP, et al.** Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis and survival in classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2012;97(2):262-269. doi:10.3324/haematol.2011.050138
- Jin J, Gui A, Chen G, et al.** Hexokinase II expression as a prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma: pre- and post-rituximab era. Int J Hematol. 2022;116(3): 372-380. doi:10.1007/s12185-022-03358-0
- Lin J, Fang W, Xiang Z, et al.** Glycolytic enzyme HK2 promotes PD-L1 expression and breast cancer cell immune evasion. Front Immunol. 2023;14: 1189953. doi:10.3389/fimmu.2023.1189953
- Nakajima K, Kawashima I, Koshiisi M, et al.** Glycolytic enzyme hexokinase II is a putative therapeutic target in B-cell malignant lymphoma. Experimental Hematology. 2019;78:46-55.e3. doi:10.1016/j.exphem.2019.09.023
- Zhao H, Xiang G, Shao T, Wang M, Dai W.** HK2 contributes to the proliferation, migration, and invasion of diffuse large B-cell lymphoma cells by enhancing the ERK1/2 signaling pathway. Open Life Sci. 2023; 18(1):20220726. doi:10.1515/biol-2022-0726

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT REAL-TIME PCR ĐỂ KIỂM TRA CHỈ TIÊU TỔNG SỐ VI KHUẨN HIẾU KHÍ TRONG GIỚI HẠN NHIỄM KHUẨN CỦA DƯỢC PHẨM

Trịnh Túy An¹, Lưu Quốc Khánh¹, Lê Văn Hoài Trần¹,
Nguyễn Khắc Tiệp², Vũ Thanh Thảo¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Kiểm nghiêm giới hạn nhiễm khuẩn là yêu cầu bắt buộc đối với dược phẩm trước khi đưa vào lưu hành trên thị trường. Phương pháp real-time PCR cho phép kiểm tra nhanh sự hiện diện của các vi sinh vật trong mẫu với độ nhạy và độ chính xác cao. **Mục đích:** Nghiên cứu kỹ thuật real-time PCR để kiểm tra chỉ tiêu tổng số vi khuẩn hiếu khí trong giới hạn nhiễm khuẩn. **Phương pháp:** Phương pháp chiết RNA bằng SDS-TRIzol được khảo sát trên các chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Mỗi và nồng độ mỗi thích hợp để xác định mỗi chỉ tiêu được kiểm tra in silico và in vitro. Quy trình định lượng vi khuẩn bằng real-time PCR được thẩm định độ đặc hiệu, độ tuyền tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD). **Kết quả:** Phương pháp chiết RNA bằng SDS-TRIzol cho hiệu quả chiết RNA tốt nhất với thời gian xử lý để phá vỡ thành

tế bào vi khuẩn là 5 phút và không xử lý với lysozym. Định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí bằng RT-qPCR với cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R nồng độ 50 nM cho LOQ và LOD là 8 CFU/ml và 2 CFU/ml. Quy trình khảo sát đạt các yêu cầu thẩm định về độ đặc hiệu, độ tuyền tính, độ chính xác và độ đúng ($RSD < 25\%$). **Kết luận:** Kỹ thuật real-time PCR có thể được áp dụng để kiểm tra giới hạn nhiễm khuẩn về tổng số vi khuẩn hiếu khí trong dược phẩm. **Từ khóa:** real-time PCR, giới hạn nhiễm khuẩn, vi khuẩn hiếu khí.

SUMMARY

STUDY ON REAL-TIME PCR METHOD TO EXAMINE AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA CRITERIA ON BACTERIAL LIMITS OF PHARMACEUTICALS

Background: Microbiological testing is a mandatory requirement for pharmaceuticals being put into circulation on the market. Real-time PCR is a technique that enables rapid detection of microorganisms present in a sample with high sensitivity and precision. **Objectives:** This research aims to study real-time PCR techniques for examining aerobic mesophilic bacteria criteria of bacterial limits. **Methods:** The RNA extraction method using SDS-TRIzol was investigated on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. For each criterion on

¹Đại học Y Dược TP.HCM

²Đại học Dược Hà Nội

Chủ trách nhiệm chính: Vũ Thanh Thảo

Email: vuthanhthao@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.3.2024

Ngày phản biện khoa học: 19.4.2024

Ngày duyệt bài: 21.5.2024

determining the bacterial limits by real-time PCR, the primers were checked in silico and in vitro, selected at the appropriate concentration. The method of quantifying microorganisms using real-time PCR was validated for specificity, linearity, precision, accuracy, the limit of quantification (LOQ), and the limit of detection (LOD). **Results:** The RNA extraction method using SDS-TRIzol gives the best RNA extraction efficiency with a heat treatment time to break down bacterial cell walls of 5 minutes and does not require treatment with lysozyme. Method to quantify the total number of aerobic mesophilic bacteria using RT-qPCR technique with the pair of primers Bac_890F/Bac_1034R at a concentration of 50 nM had LOQ and LOD values of 8 CFU/ml and 2 CFU/ml, respectively. The examination method met the validation requirements of specificity, linearity, precision, and accuracy ($RSD < 25\%$). **Conclusions:** The real-time PCR technique could be applied to examine aerobic mesophilic bacteria criteria of bacterial limits in pharmaceuticals. **Keywords:** real-time PCR, bacterial limits, aerobic mesophilic bacteria.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dược phẩm trước khi được đưa vào lưu hành trên thị trường cần phải trải qua quá trình kiểm nghiệm chất lượng một cách nghiêm ngặt, trong đó có chỉ tiêu kiểm nghiệm về giới hạn nhiễm khuẩn. Theo Dược điển Việt Nam V (ĐDVN V), để phát hiện và định lượng vi sinh vật trong mẫu cần kiểm nghiệm, hai phương pháp được sử dụng phổ biến là đếm khuẩn lạc trên hộp thạch và cấy pha loãng trong ống nghiệm nhằm ước lượng tổng số vi khuẩn (phương pháp MPN) [1]. Tuy nhiên, hai phương pháp trên có thời gian kiểm nghiệm kéo dài. Kỹ thuật PCR dựa trên các gen đặc hiệu giúp rút ngắn thời gian phát hiện các vi sinh vật chỉ thị trong mẫu và không cần sử dụng các môi trường phân biệt hay chọn lọc để định danh vi sinh vật. Tuy nhiên, phương pháp PCR có tính chất định tính, trong khi đó một số chỉ tiêu về giới hạn nhiễm khuẩn như tổng số vi khuẩn, tổng số vi nấm hay E. coli và vi khuẩn gram âm dung nạp mật cần xác định số lượng có trong 1 g hoặc 1 ml mẫu thử. RT-qPCR là một kỹ thuật PCR cải tiến, cho phép định lượng vi sinh vật có trong mẫu phân tích theo thời gian thực. Việc áp dụng kỹ thuật này vào kiểm nghiệm giới hạn vi sinh vật có thể rút ngắn được thời gian kiểm nghiệm so với xác định mật độ vi sinh vật bằng phương pháp đếm đĩa, trải đếm hay MPN.

Với mục tiêu nghiên cứu sử dụng kỹ thuật RT-qPCR để kiểm nghiệm chỉ tiêu về tổng số vi khuẩn hiếu khí của dược phẩm, nghiên cứu khảo sát phương pháp chiết RNA vi khuẩn, thiết kế mồi và khảo sát điều kiện phù hợp cho phản ứng RT-qPCR để định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí. Phương pháp RT-qPCR để định lượng tổng số vi

khuẩn hiếu khí sẽ được thẩm định về độ đặc hiệu, độ tuyển tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD) theo khuyến cáo của Broeders [2] và Kralik [3].

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp chiết RNA vi khuẩn.

Phương pháp chiết RNA vi khuẩn sử dụng SDS để phá vỡ tế bào và TRIzol để tinh chế RNA (SDS-TRIzol) được khảo sát trên 4 chủng vi khuẩn gồm E. coli ATCC 25922, P. aeruginosa ATCC 27853, B. subtilis PY79 và S. aureus ATCC 25923. Vi khuẩn được tăng sinh trong LB ở 37 °C đến khi đạt OD₆₀₀ 0,1. Ly tâm 1,0 ml dịch vi khuẩn ở 12.000 g trong 1 phút, thu tế bào. Phân tán tế bào trong với 200 µl lysozyme 10 mg/ml, ủ 37°C trong 10 phút, ly tâm 14.000g trong 1 phút để thu tế bào. Phân tán tế bào trong 200 µl dịch ly giải; ủ ở 95°C trong 3-6 phút. Hai bước xử lý với lysozyme và dịch ly giải sẽ được khảo sát để chọn điều kiện chiết RNA phù hợp. Thêm 1ml TRIzol, ủ 25°C trong 5 phút. Bổ sung 200 µl chloroform, trộn đều, ly tâm 12.000 g ở 4°C trong 15 phút. Thu dịch nổi chứa RNA, thêm 500 µl isopropanol, ủ -20°C trong 30 phút, ly tâm 15.000 g ở 4°C trong 10 phút để thu túa RNA. Rửa túa với 1 ml ethanol 75%. Hòa tan túa RNA trong 50µl nước khử khoáng và bảo quản ở -80°C.

2.2. Thiết kế mồi cho phản ứng RT-qPCR. Mỗi được thiết kế bằng công cụ GenScript Online PCR Primers Designs dựa trên trình tự gen có mức độ phiên mã ổn định ứng với chủng vi khuẩn mục tiêu. Đối với mỗi phổ quát cho vi khuẩn, phần mềm MegAlign (DNASTAR) được sử dụng để gióng hàng trình tự vùng 16S rRNA của các chủng vi khuẩn khảo sát nhằm tìm ra vùng có trình tự tương đồng. Các mồi sau khi thiết kế sẽ được kiểm tra tính đặc hiệu thông qua công cụ Standard Nucleotide BLAST trên NCBI. Các thông số của mồi bao gồm T_m, khả năng tự bắt cặp, bắt cặp chéo và tạo cấu trúc kẹp tóc được kiểm tra bằng công cụ OligoAnalyzer™ (IDT). Từ kết quả kiểm tra in silico, các mồi có tiềm năng sử dụng được kiểm tra in vitro khả năng tạo dimer của mồi hoặc sản phẩm phụ để chọn ra những mồi phù hợp nhất.

2.3. Phản ứng RT-qPCR. Phản ứng RT-qPCR (Bảng 1) được thực hiện bằng bộ kit Luna® Universal one-step RT-qPCR (E3005) (New England BioLabs® Inc). Thành phần của phản ứng: Luna reaction mix 2X, Luna enzym mix 20X, mồi xuôi và mồi ngược; khuôn mẫu RNA và nước chứa DEPC được bổ sung vừa đủ 20 µl.

Bảng 1. Chu trình nhiệt của phản ứng

RT-qPCR

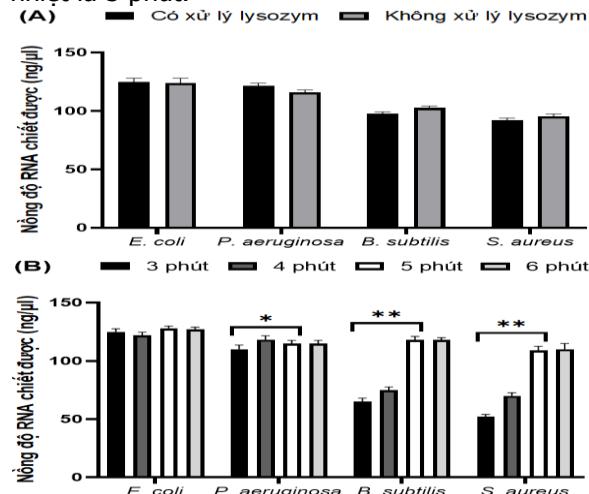
Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Phiên mã ngược	55 °C	600 giây	1
Biến tính ban đầu	95 °C	60 giây	1
Biến tính	95 °C	10 giây	
Gắn mồi và kéo dài	60 °C	30 giây	40
Đo đường cong nhiệt độ chảy	70-90 °C	200 giây	1

2.4. Thẩm định phương pháp xác định giới hạn nhiễm khuẩn bằng RT-qPCR.

Những chỉ tiêu cần thẩm định đối với phương pháp xác định giới hạn nhiễm khuẩn bằng RT-qPCR bao gồm độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD) [2], [3]. Độ đặc hiệu của phương pháp phụ thuộc vào độ đặc hiệu của mồi, đối với mỗi phô quát của vi khuẩn cần dương tính với RNA vi khuẩn và âm tính với RNA vi nấm. Mẫu vi khuẩn chiết ở OD₆₀₀ = 0,1 được pha loãng thành dải nồng độ theo cấp số 10 để trải dải xác định mật độ và chiết RNA cho RT-qPCR, xây dựng đường hồi quy tuyến tính giữa số Ct và log của số CFU. Thủ nghiêm được lặp lại 4 lần trong 4 ngày, đường tuyến tính phải có hệ số tương quan $r^2 \geq 0,98$. Độ chính xác bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Đối với độ lặp lại, mẫu ở các cấp pha loãng được thực hiện phản ứng RT-qPCR, mỗi cấp pha loãng lặp lại 3 lần trong 3 ngày. Để thẩm định độ chính xác trung gian, mẫu ở các cấp pha loãng được thực hiện phản ứng RT-qPCR, mỗi cấp pha loãng lặp lại 6 lần trong 2 ngày khác nhau. Số Ct tại từng cấp pha loãng phải có RSD ≤ 25%. Mẫu vi khuẩn chiết ở cấp 0 được pha loãng đến cấp 3 (theo cấp số 10) để khảo sát độ đúng. Lượng vi khuẩn được điều chỉnh để tương đương với 80%, 100% và 120% lượng có trong mẫu và thực hiện RT-qPCR, lặp lại 6 lần trong 3 ngày khác nhau. Tỉ lệ thu hồi phải từ 75-125% và Ct của các mẫu phải có RSD ≤ 25%. Giới hạn định lượng là điểm ứng với số CFU thấp nhất nằm trên đường tuyến tính. Giới hạn định lượng phải phù hợp với mức chỉ tiêu thấp nhất được quy định trong DĐVN V [1] cho chỉ tiêu tổng số vi khuẩn hiểu khí là LOQ ≤ 10² CFU/ml. Giới hạn phát hiện là điểm ứng với số CFU thấp nhất mà tại đó phương pháp có thể phát hiện được. LOD được tính toán bằng công thức: LOD = LOQ/ 3,3. LOD được kiểm tra lại bằng thực nghiệm, lặp lại 6 lần và phải có RSD ≤ 25%.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**3.1. Khảo sát phương pháp chiết RNA vi khuẩn.** Phương pháp chiết RNA vi khuẩn bằng

SDS-TRIzol được khảo sát hiệu quả chiết giữa việc có hoặc không xử lý mẫu với lysozym và thăm dò thời gian xử lý nhiệt để phá vỡ thành tế bào vi khuẩn. Kết quả cho thấy khi xử lý với lysozym, nồng độ acid nucleic có giá trị 91-121 ng/μl. Khi không xử lý với lysozym, nồng độ acid nucleic thu được 95-122 ng/μl. Giữa các mẫu có hoặc không xử lý với lysozym thì không có sự khác biệt đáng kể về nồng độ acid nucleic (Hình 1A), do đó không cần xử lý mẫu với lysozym. Thời gian xử lý nhiệt để phá vỡ tế bào được khảo sát ở mốc 3-6 phút. Đối với *E. coli* và *P. aeruginosa*, khi tăng thời gian xử lý nhiệt từ 3-6 phút thì không có sự khác biệt về lượng acid nucleic thu được (Hình 1B). Đối với *B. subtilis* và *S. aureus*, khi tăng thời gian xử lý nhiệt từ 3-5 phút thì lượng acid nucleic thu được tăng dần, mốc 5 phút cho lượng acid nucleic cao nhất, giữa mốc 5 và 6 phút không có sự khác biệt đáng kể về lượng RNA thu được, nên chọn thời gian xử lý nhiệt là 5 phút.



Hình 1. Đồ thị so sánh nồng độ RNA chiết được giữa mẫu có hoặc không xử lý với lysozym (A) và thời gian xử lý nhiệt phá vỡ thành tế bào vi khuẩn khác nhau (B) của phương pháp SDS – TRIzol

*: p<0,05; **: p<0,001

3.2. Khảo sát và lựa chọn mồi phổ quát cho vi khuẩn

Tham khảo và thiết kế mồi in silico. Cặp mồi đều được tham khảo hoặc thiết kế để bắt cặp với vùng 16S rRNA của vi khuẩn (Bảng 2). Các mồi được kiểm tra tính đặc hiệu bằng công cụ BLAST để đối chiếu với ngân hàng gen của NCBI. Mỗi phô quát cho vi khuẩn phải bắt cặp đặc hiệu với các chủng vi khuẩn (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Salmonella*, *K. pneumonia*,...) và không bắt cặp với vi nấm (C.

albicans, A. niger,...). Các thông số của mồi được kiểm tra in silico bằng công cụ OligoAnalyzer™ (IDT), kết quả kiểm tra cho thấy các mồi có tỉ lệ GC từ 41-63%, nhiệt độ nóng chảy T_m từ 60,8-

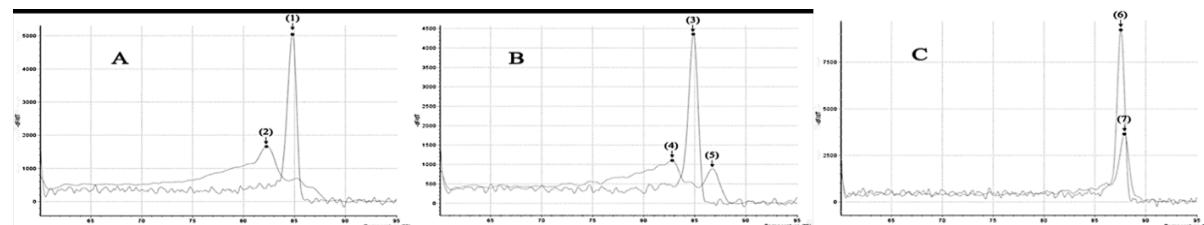
65,8 °C, chỉ số tạo cấu trúc kẹp tóc dao động từ -2,88 đến 0,96 kcal/mol, chỉ số tự bắt cặp từ -6,67 đến -4,67 và chỉ số bắt cặp chéo trong khoảng từ -6,36 đến -4,67.

Bảng 2. Danh sách mồi phổ quát và giá trị Ct của các mẫu khảo sát để lựa chọn mồi

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Tham khảo/ thiết kế	Ct	
			Chứng dương	Chứng âm
Bac_890F	GTGGAGCATGTGGTTAACCG	Thiết kế	5,02	24,79
Bac_1034R	GTTRCGGGACTTAACCCAAC			
Bac_891F	TGGAGCATGTGGTTAACCGA	Yang [4]	5,30	24,41
Bac_1033R	TGCAGGACTTAACCCAACA			
Nadkarni_F	TCCTACGGGAGGCAGCACT	Nadkarni [5]	5,86	23,34
Nadkarni_R	GGACTACCAGGGTATCTAACCTGTT			

Khảo sát in vitro để lựa chọn mồi. Mẫu RNA vi khuẩn (12 ng/μl) được dùng làm khuôn mẫu khảo sát các mồi. Các cặp mồi phổ quát cho vi khuẩn có Ct mẫu chứng âm từ 23,34-24,79 (Bảng 2). Theo đường biểu diễn pic nhiệt độ chảy (Hình 2) cho thấy mẫu chứng âm của cặp mồi Nadkarni_F/Nadkarni_R có 1 pic sản phẩm phụ trùng với pic sản phẩm chính của mẫu chứng dương. Hai cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R

và Bac_891F/Bac_1033R đều có pic sản phẩm phụ của mẫu chứng âm không trùng với pic sản phẩm chính của mẫu chứng dương. Cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R có sự chênh lệch Ct giữa mẫu chứng dương và chứng âm lớn nhất trong ba cặp mồi ($\Delta Ct = 19,77$). Do đó, cặp mồi phổ quát được chọn để xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí là cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R.



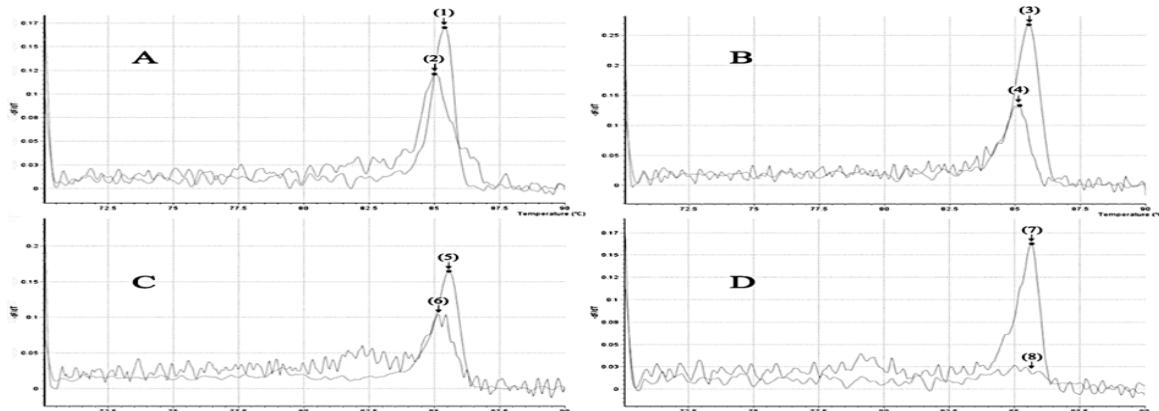
Hình 2. Đường biểu diễn pic nhiệt độ chảy của nhóm mồi phổ quát

(1) Chứng dương và (2) chứng âm của cặp mồi Bac_890F và Bac_1034R; (3) chứng dương và (4, 5) chứng âm của cặp mồi Bac_891F và Bac_1033R; (6) chứng dương và (7) chứng âm của cặp mồi Nadkarni_F và Nadkarni_R

3.3. Khảo sát điều kiện cho phản ứng RT-qPCR để định lượng tổng số vi khuẩn.

Cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R được khảo sát ở

nồng độ 50-400 nM. Khi giảm nồng độ mồi, Ct mẫu chứng dương thay đổi không đáng kể (5,09-5,93). Trong khi đó, mẫu chứng âm lại có sự dao động về Ct (5,31-33,15). Đồng thời, mẫu chứng âm ở nồng độ 50 nM cũng cho thấy không có pic sản phẩm phụ (Hình 3). Vì vậy đối với cặp Bac_890F/Bac_1034R, nồng độ 50 nM được chọn để định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí.



Hình 3. Đường biểu diễn pic nhiệt độ chảy của cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R ở các nồng độ

(1) Chứng dương và (2) chứng âm mỗi 400 nM; (3) chứng dương và (4) chứng âm mỗi 200 nM; (5) chứng dương và (6) chứng âm mỗi 100 nM; (7) chứng dương và (8) chứng âm mỗi 50 nM

3.4. Thẩm định phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn bằng RT-qPCR. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của mồi Bac_890F/Bac_1034R cho Ct mẫu RNA vi khuẩn là 5,16; Ct mẫu RNA của C. albicans (33,07) và mẫu chứng âm (32,91) không có sự khác biệt đáng kể. Vậy mồi Bac_890F/Bac_1034R bắt cặp đặc hiệu với vi khuẩn, phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn bằng RT-qPCR đạt độ đặc hiệu. Mẫu vi khuẩn được pha loãng thành dải nồng độ theo cấp số 10 để xây dựng đường tuyến tính giữa số Ct và logCFU. Đường tuyến tính có phương trình: $y = -3,5868x + 29,785$ với $r^2 = 0,998$ ($> 0,980$). Phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn bằng RT-qPCR đạt độ tuyến tính với khoảng xác định từ $7,5 \text{--} 7,5 \cdot 10^6$ CFU. Độ chính xác bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp có RSD dao động từ 1,08-3,28%, độ chính xác trung gian của phương pháp có RSD dao động từ 1,31-5,76% ($< 25\%$) (Bảng 3).

Bảng 3 Kết quả khảo sát độ tuyến tính và độ chính xác của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn bằng RT-qPCR

CFU	Độ tuyến tính		Độ chính xác			
	Độ lặp lại		Độ chính xác trung gian			
	Ct	RSD (%)	Ct	RSD (%)	Ct	RSD (%)
$7,5 \cdot 10^6$	5,28	2,74	5,26	3,28	5,47	5,76
$7,5 \cdot 10^5$	8,46	2,37	8,53	2,13	8,35	2,75
$7,5 \cdot 10^4$	12,44	2,46	12,37	2,63	12,55	2,42
$7,5 \cdot 10^3$	16,06	1,67	16,15	1,50	15,85	2,47
$7,5 \cdot 10^2$	19,41	1,52	19,51	1,36	19,27	1,65
$7,5 \cdot 10^1$	22,52	1,08	22,45	1,08	22,38	1,36
7,5	27,04	0,41	27,43	1,34	27,35	1,31

Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn (Bảng 4) cho thấy tỉ lệ thu hồi trung bình của mẫu từ 98,73-101,61%, giá trị Ct của mẫu có RSD là 0,40-0,68% ($< 25\%$). Vậy phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn bằng RT-qPCR đạt độ đúng.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn bằng RT-qPCR

Mẫu	logCFU ban đầu	Trung bình logCFU tìm lại	Trung bình tỷ lệ thu hồi (%)	Ct	RSD (%)
80%	4,78	4,72	98,73	12,89	0,68

100%	4,88	4,95	101,50	12,04	0,40
120%	4,95	5,03	101,61	11,74	0,40

Phương pháp RT-qPCR định lượng tổng số vi khuẩn có LOQ là 8 CFU/ml, vậy LOD = LOQ/3,3 là 2 (CFU/ml). Mẫu RNA được pha loãng đến mật độ tương ứng 2 CFU/ml để kiểm tra LOD bằng thực nghiệm. Kết quả kiểm tra LOD cho thấy giá trị Ct của các mẫu có RSD là 0,99% ($< 25\%$). Vậy phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn hiểu khí bằng RT-qPCR có LOD là 2 CFU/ml.

IV. BÀN LUẬN

Những chỉ tiêu cần thẩm định đối với phương pháp xác định giới hạn nhiễm khuẩn bằng kỹ thuật RT-qPCR được tham khảo trong nghiên cứu của Broeders [2] và Kralik [3]. Phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn hiểu khí với cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R đạt tính đặc hiệu, độ tuyến tính ($r^2 = 0,997$), hệ số E = 90,02%, độ chính xác và độ đúng (RSD $< 25\%$), LOQ là 8 CFU/ml và LOD là 2 CFU/ml. Phương pháp đã xây dựng có thể phát hiện mức vi khuẩn tổng số thấp nhất (10^2 CFU/ml) theo yêu cầu quy định trong DĐVN V [1].

V. KẾT LUẬN

Phương pháp chiết RNA bằng SDS-TRIzol hiệu quả có thời gian xử lý nhiệt ở bước ly giải là 5 phút. Cặp mồi phổ quát Bac_890F/Bac_1034R được chọn để xác định tổng số vi khuẩn hiểu khí. Thẩm định phương pháp đạt các chỉ tiêu về tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, LOQ 8 CFU/ml, LOD 2 CFU/ml). Các kết quả đạt được cho thấy tiềm năng ứng dụng của kỹ thuật RT-qPCR để kiểm tra một số chỉ tiêu về giới hạn nhiễm khuẩn trong mẫu dược phẩm.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài theo hợp đồng số 19/2023/HĐ-QKHCN ngày 17/03/2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Dược điển Việt Nam V – Tập 2: Bộ Y Tế,** 2017, tr. PL300-PL311.
2. **Broeders S., Huber I., Grohmann L., et al.** (2014). "Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods", Trends in Food Science and Technology, 37 (2), pp. 115-126.
3. **Kralik P., Ricchi M.** (2017). "A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything", Frontiers in Microbiology, 8 (108), pp. 1-9.
4. **Yang S., Lin S., Kelen G. D., et al.** (2002). "Quantitative multiprobe PCR assay for

- simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens", Journal of Clinical Microbiology, 40 (9), pp. 3449-3454.
5. Nadkarni M. A., Martin F. E., Jacques N. A., et al. (2002). "Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set", Microbiology, 148 (1), pp. 257-266.
6. Tillman G. E., Simmons M., Wasilenko J. L., et al. (2015). "Development of a Real-Time PCR for Escherichia coli based on gadE, an acid response regulatory gene", Letters in Applied Microbiology, 60 (2), pp. 196-202.
7. Bej A. K., McCarty S. C., Atlas R. M. (1991). "Detection of coliform bacteria and Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring", Applied Environmental Microbiology, 57 (8), pp. 2429-2432.
8. Liang T., Long H., Zhan Z., et al. (2022). "Simultaneous detection of viable Salmonella spp., Escherichia coli, and Staphylococcus aureus in bird's nest, donkey-hide gelatin, and wolfberry using PMA with multiplex real-time quantitative PCR", Food Science and Nutrition, 10 (9), pp. 3165-3174.

SỰ GẮN KẾT TRONG CÔNG VIỆC CỦA NHÂN VIÊN Y TẾ TẠI BỆNH VIỆN ĐẠI HỌC Y DƯỢC TPHCM

Nguyễn Thị Hồng Minh¹, Nguyễn Quế Trân¹, Võ Thị Hồng Nhẫn¹,
Đặng Anh Long¹, Đỗ Thị Nam Phương¹, Đặng Thị Bảo Trân¹,
Lê Thị Ngọc Liên¹, Vũ Thị Thúy Nhài¹, Lê Hoàng Phúc¹,
Nguyễn Thị Thu Hảo¹, Nguyễn Thị Thảo Linh¹, Nguyễn Thị Bích Ngọc¹,
Nguyễn Đức Nguyệt Quỳnh¹, Trần Thị Thanh Tâm¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: gắn kết trong công việc là một trạng thái bền vững về cảm xúc, nhận thức và động lực tích cực với công việc đang thực hiện, được đo lường bằng ba nhóm yếu tố là sự say mê, sự cống hiến và sự nỗ lực. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Một nghiên cứu cắt ngang được thực hiện bằng khảo sát tư diễn trên 1690 nhân viên y tế (NVYT) làm việc toàn thời gian tại bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM bằng bô câu hỏi gắn kết công việc Utrecht work engagement scale (UWES) phiên bản tiếng Việt với mục tiêu xác định điểm số gắn kết công việc của nhân viên y tế và các yếu tố liên quan tại Bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM. **Kết quả:** điểm trung bình UWES của NVYT là 3,90 (ĐLC= 0,91), nhóm yếu tố có điểm số thấp nhất là sự say mê công việc ($3,45 \pm 1,05$). Các yếu tố liên quan đến UWES ($p<0,05$) là giới, độ tuổi, trình độ, nghề nghiệp, kinh nghiệm làm việc và cảm xúc nghề nghiệp. **Kết luận:** Điểm gắn kết công việc của nhân viên y tế đang làm việc tại bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM ở mức khá. Các yếu tố liên quan đến gắn kết công việc là giới, độ tuổi, trình độ, nghề nghiệp, kinh nghiệm làm việc và cảm xúc nghề nghiệp. Cần có các hoạt động chung nhằm thúc đẩy sự say mê trong công việc, gắn kết nhân viên với đơn vị. **Từ khóa:** Gắn kết trong công việc, Utrecht work engagement scale (UWES), nhân viên y tế

SUMMARY

¹Bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM
Chủ trách nhiệm chính: Trần Thị Thanh Tâm
Email: tam.ttt2@umc.edu.vn
Ngày nhận bài: 13.3.2024
Ngày phản biện khoa học: 19.4.2024
Ngày duyệt bài: 22.5.2024

WORK ENGAGEMENT OF A HEALTHCARE PROVIDER AT THE UNIVERSITY MEDICAL CENTER IN HO CHI MINH CITY

Background: Work engagement is a sustainable state of positive emotions, cognition, and motivation for the work being done, measured by three groups of factors: vigor, dedication, and absorption. **Research object and method:** A cross-sectional study was conducted using a self-completed survey on 1,690 healthcare providers who were working full-time at the University Medical Center, Ho Chi Minh City. The Vietnamese version of the Utrecht Work Engagement Scale (UWES) was used to collect data and aims to determine the work engagement scores of healthcare providers and related factors at the University Medical Center, Ho Chi Minh City. **Results:** The average UWES score of healthcare providers is 3.90 (SD = 0.91), and the factor with the lowest score was vigor (3.45 ± 1.05). Factors related to UWES ($p<0.05$) are gender, age, qualifications, occupation, work experience, and professional emotions. **Conclusion:** Healthcare providers at the University Medical Center in Ho Chi Minh City have a good level of work engagement. Factors related to work engagement are gender, age, qualifications, occupation, work experience, and professional emotions. There should be common activities to promote passion for work and connect employees with the hospital.

Keywords: Utrecht Work Engagement Scale (UWES), Healthcare Provider

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gắn kết với công việc được định nghĩa như là một kênh truyền năng lượng cá nhân vào lao động thể chất, cảm xúc và nhận thức³. Mặc khác, sự gắn kết trong công việc được khái niệm