ISSN: 1859-1779

Nghiên cứu Y học
Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh;28(9):161-170
https://doi.org/10.32895/hcjm.m.2025.09.19

Nghiên cứu kỹ thuật RT-qPCR để định lượng vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong dược phẩm

Vũ Thanh Thảo[1,2], Nguyễn Tấn Phát[2], Lê Tuấn Anh[2], Phan Thanh Dũng[1,2], Nguyễn Tú Anh[2], Trần Cát Đông[1], Phạm Văn Sơn[3], Ngô Thị Minh Tâm[3], Trần Thị Bích Huệ[3], Bạch Thu Thảo[3], Trịnh Túy An[1,*]

[1]Trung tâm Khoa học Công nghệ UMP, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam
[2]Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam
[3]Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Theo Dược điển Việt Nam V, chỉ tiêu vi khuẩn Gram âm dung nạp mật là yêu cầu bắt buộc trong kiểm tra giới hạn nhiễm khuẩn của dược phẩm có nguồn gốc từ động thực vật, khoáng chất và thuốc dùng đường hít. Mutiplex RT-qPCR cho phép phát hiện đồng thời các vi khuẩn Gram âm dung nạp mật dựa trên các gen đặc hiệu với độ nhạy và độ chính xác cao.

Mục tiêu: Áp dụng kỹ thuật RT-qPCR để định lượng vi khuẩn Gram âm dung nạp mật.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Các mồi và đoạn dò được thiết kế *in silico* và kiểm tra *in vitro*. Phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng RT-qPCR được đánh giá các chỉ tiêu thẩm định bao gồm độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD).

Kết quả: Phương pháp RT-qPCR định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật sử dụng tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/R1/P1 và oprI_F1/R1/P1 với nồng độ mồi và đoạn dò lần lượt là 400 và 200 nM đạt yêu cầu về độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, LOQ là 4.10^2 tế bào/ml và LOD là 121 tế bào/ml.

Kết luận: Kỹ thuật RT-qPCR có thể áp dụng để định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong dược phẩm.

Từ khóa: vi khuẩn Gram âm dung nạp mật; *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas*; giới hạn nhiễm khuẩn

Abstract

STUDY ON RT-qPCR TECHNIQUE FOR QUANTIFICATION OF BILE-TOLERANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN PHARMACEUTICALS

Vu Thanh Thao, Nguyen Tan Phat, Le Tuan Anh, Phan Thanh Dung, Nguyen Tu Anh, Tran Cat Dong, Pham Van Son, Ngo Thi Minh Tam, Tran Thi Bich Hue, Bach Thu Thao, Trinh Tuy An

Ngày nhận bài: 25-06-2025 / Ngày chấp nhận đăng bài: 10-10-2025 / Ngày đăng bài: 13-10-2025
*Tác giả liên hệ: Trịnh Túy An. Trung tâm Khoa học Công nghệ UMP, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. E-mail: ttan@ump.edu.vn
© 2025 Bản quyền thuộc về Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh.

Backgrounds: According to the Vietnamese Pharmacopoeia V, the bile-tolerant Gram-negative bacteria index is a mandatory requirement for testing the bacterial limits of pharmaceuticals originated from animal, plant, mineral and for inhaled medication. RT-qPCR technique features rapid determination of the number of bile-tolerant Gram-negative bacteria based on specific genes with high sensitivity and accuracy.

Objectives: Applying the RT-qPCR technique to quantify the total number of bile-tolerant Gram-negative bacteria.

Methods: Primers and probes were designed in silico and tested for feasibility in vitro. The method of quantifying the total number of bile-tolerant Gram-negative bacteria using the RT-qPCR technique was evaluated for validation criteria, including specificity, linearity, accuracy, the limit of quantification (LOQ), and the limit of detection (LOD).

Results: The RT-qPCR method for quantifying the total number of bile-tolerant Gram-negative bacteria using the primer and probe combinations, namely rplP_F1/R1/P1 and oprI_F1/R1/P1 with primer and probe concentrations of 400 and 200 nM, respectively, met the requirements for specificity, linearity, and accuracy (RSD < 25%), with LOQ of 4.10^2 cells/ml and LOD at 121 cells/ml.

Conclusions: The RT-qPCR technique can be applied to test the total number of bile-tolerant Gram-negative bacteria required to determine the limit of contamination in pharmaceutical samples.

Keywords: bile-tolerant Gram-negative bacteria; *Enterobacteriaceae; Pseudomonas*; bacterial limits

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn Gram âm dung nạp mật là nhóm trực khuẩn bao gồm *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonad* và *Aeromonad*, có khả năng sinh trưởng trên thạch chứa muối mật. Sự hiện diện của vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong dược phẩm đường uống có nguồn gốc tự nhiên (động vật, thực vật, khoáng chất…) hoặc thuốc hít không những có khả năng gây bệnh cho người dùng mà còn phản ánh nguy cơ hiện diện của vi khuẩn gây bệnh lây truyền qua đường tiêu hoá hoặc không khí trong dược phẩm [1]. Phụ lục 13.6, Dược điển Việt Nam V quy định dược phẩm có nguồn gốc dược liệu chỉ được phép chứa số lượng giới hạn vi khuẩn Gram âm chịu mật, còn dược phẩm dùng đường hít không được phép chứa nhóm vi khuẩn này trong 1 g (ml) dược phẩm [2]. Phương pháp phát hiện vi khuẩn Gram âm dung nạp mật theo Dược điển tăng sinh trên môi trường Enterobacteria Enrichment Broth-Mossel và cấy phân lập trên môi trường thạch VRB (Violet Red Bile Agar) xác định sự có mặt của vi khuẩn cũng như định lượng vi khuẩn. Tuy nhiên, phương pháp trên cần thời gian thực hiện ít nhất là 3-4 ngày [2]. Phương pháp multiplex qPCR phát hiện dựa trên gen đặc hiệu cho các họ của vi khuẩn Gram âm dung nạp mật vì vậy rút ngắn thời gian phát hiện, mặt khác phương pháp có độ đặc hiệu và độ nhạy cao [3].

Một số nghiên cứu trên thế giới đã áp dụng kỹ thuật PCR để phát hiện nhanh sự hiện diện của các vi sinh vật trong mẫu. Skof A đã sử dụng kỹ thuật real-time PCR để phát hiện *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* trong các mẫu dược phẩm dùng tại chỗ với khả năng phát hiện 1-10 CFU/ml hoặc g sản phẩm sau khi tăng sinh 24 giờ [4]. Nghiên cứu của Barletta F đã sử dụng kỹ thuật multiplex real-time PCR để phát hiện đồng thời *Campylobacter, Salmonella* và *Shigella* với giới hạn định lượng là 10^4 CFU/g và giới hạn phát hiện là 10^3 CFU/g [5]. Sen K và Asher DM sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae trong mẫu máu với thời gian kiểm nghiệm 3 giờ [6], nghiên cứu của Nakano S xây dựng quy trình PCR cho phép phát hiện các vi khuẩn họ Enterobacteriaceae trong thực phẩm trong 7 giờ [7], hoặc nghiên cứu của Chiu TH áp dụng kỹ thuật PCR để phát hiện các loài thuộc chi *Salmonella* trong các mẫu thực phẩm [8]. Trong nước, Trần Thị Xuân Mai đã sử dụng phương pháp multiplex PCR để phát hiện nhanh *Salmonella spp.*, *Salmonella enterica* trong thực phẩm [9]. Nghiên cứu của Nguyễn Thành Luân đã sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện *Salmonella sp.* và *Staphylococcus aureus* sau khi tăng sinh 14 giờ mẫu có mật độ vi khuẩn là 1 CFU/ 25 g và có độ nhạy là 3.10^2 CFU/ml đối với *Salmonella sp*., 70 CFU/ml đối với *S. aureus* [10]. Xuất phát từ nhu cầu thực tế về kiểm nghiệm chỉ tiêu vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong các mẫu dược phẩm, nghiên cứu đặt mục tiêu xây dựng quy trình định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong dược phẩm bằng kỹ thuật RT-qPCR.

 https://doi.org/10.32895/hcjm.m.2025.09.19

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu gồm có *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* ATCC 49128, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Aspergillus niger* ATCC 16404 và *Candida albicans* ATCC 10231. Các chủng vi sinh vật trên được mua từ Microbiologics (Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết RNA vi sinh vật

Phương pháp chiết RNA vi sinh vật sử dụng sodium dodecyl sulfat (SDS) kết hợp gia nhiệt để phá vỡ tế bào, sau đó dùng TRIzol và tải qua cột silica để tinh chế RNA. RNA được rửa giải bằng nước chứa dietyl pyrocarbonat (DEPC) và bảo quản ở -80℃. Dịch chiết RNA có thể pha loãng trong dung dịch đệm phosphat pH 7,2 nếu cần để dùng cho các khảo sát.

2.2.2. Phản ứng multiplex RT-qPCR

Phản ứng RT-qPCR ghi nhận tín hiệu bằng đoạn dò được thực hiện bằng bộ kit Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR (E30006) của New England BioLabs® Inc. Thành phần của phản ứng bao gồm Luna Universial Probe One-Step Reaction Mix 2X; Luna WarmStart RT Enzym Mix 20X; mồi xuôi, mồi ngược và đoạn dò ở nồng độ phù hợp sẽ được khảo sát; 5 µl khuôn mẫu RNA và nước chứa DEPC được bổ sung vừa đủ thể tích 20 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng RT-qPCR trải qua 04 giai đoạn luân nhiệt: giai đoạn phiên mã ngược ở 55℃ trong 10 phút; giai đoạn biến tính ban đầu ở 95℃ trong 60 giây; giai đoạn khuếch đại và ghi nhận tín hiệu với 40 chu kỳ lặp lại gồm 02 bước, biến tính ở 95℃ trong 10 giây, gắn mồi và kéo dài ở 60℃ trong 30 giây.

2.2.3. Thiết kế mồi/ đoạn dò và khảo sát điều kiện cho phản ứng RT-qPCR

Vi khuẩn Gram âm dung nạp mật gồm có *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonad* và *Aeromonad*, tuy nhiên những chủng vi khuẩn thường được phát hiện trong các mẫu dược phẩm đa số thuộc họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas*. Do đó nghiên cứu này dựa trên những tài liệu tham khảo từ Takahashi H và De Vos D để lựa chọn cặp mồi phát hiện các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas* [11,12]. Đoạn dò được thiết kế bằng công cụ PrimerQuest™ (IDT) dựa trên trình tự đoạn gen được khuếch đại của mỗi cặp mồi đã chọn. Các thông số của mồi được kiểm tra in silico bằng công cụ OligoAnalyzer™ (IDT). Mẫu vi khuẩn Gram âm dung nạp mật được sử dụng làm khuôn mẫu cho thí nghiệm được tạo thành bằng cách trộn các mẫu RNA chiết ở OD_{600} là 0,1 của *E. coli, K. pneumoniae, Pseudomonas và Salmonella* theo tỷ lệ 1:1:1:1. Mồi xuôi và mồi ngược được khảo sát ở các nồng độ 400, 200 và 100 nM; cùng với đoạn dò được khảo sát đồng thời ở các nồng độ 200, 100 và 50 nM.

2.2.4. Đánh giá phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kĩ thuật RT-qPCR

Những chỉ tiêu cần đánh giá đối với phương pháp bao gồm độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD) được tham khảo từ nghiên cứu của Broeders S và Kralik P [13,14]. Độ đặc hiệu của phương pháp phụ thuộc vào độ đặc hiệu của mồi, mồi phổ quát cho nhóm vi khuẩn Gram âm dung nạp mật cần dương tính với RNA vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas*, đồng thời âm tính với RNA các vi khuẩn khác và vi nấm, mẫu khảo sát độ đặc hiệu được lặp lại 2 lần. Mẫu vi khuẩn Gram âm dung nạp mật chiết ở OD_{600} = 0,1 được pha loãng thành dãy các nồng độ theo cấp số 10 để trải đếm xác định mật độ và chiết RNA cho phản ứng RT-qPCR, xây dựng đường hồi quy tuyến tính giữa số Ct và log của số tế bào tương ứng (n = 4). Giới hạn định lượng là điểm ứng với số tế bào thấp nhất nằm trên đường tuyến tính. Giới hạn phát hiện là điểm ứng với số tế bào thấp nhất mà tại đó phương pháp có thể phát hiện được. 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 lặp lại 3 lần trong 3 ngày khác nhau (n = 3). Để thẩm định độ chính xác trung gian, mẫu ở các cấp pha loãng được thực hiện phản ứng RT-qPCR lặp lại 6 lần trong 2 ngày khác nhau (n = 6). Số Ct tại từng cấp pha loãng phải có RSD ⩽ 25%. Đối với độ đúng, lượng vi khuẩn thêm vào được điều chỉnh ở mức 80%, 100% và 120% lượng vi khuẩn ở mật độ 4.10^3 tế bào/ml, thực hiện phản ứng RT-qPCR lặp lại 6 lần trong 3 ngày khác nhau (n = 6). Tỷ lệ thu hồi được tính từ log tế bào theo công thức:

% Tỷ lệ thu hồi = (log tế bào tìm lại/log tế bào ban đầu) × 100 và tỉ lệ thu hồi phải từ 75-125%.

3. KẾT QUẢ

3.1. Thiết kế mồi và đoạn dò *in silico*

Nhóm vi khuẩn Gram âm dung nạp mật gồm những vi khuẩn phát triển được trên môi trường thạch muối mật tím đỏ, trong đó đa phần vi khuẩn Gram âm dung nạp mật được phát hiện trong các mẫu dược phẩm là những vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas*. Do đó, quy trình định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật cần sử dụng kết hợp bộ mồi và đoạn dò phổ quát cho họ Enterobacteriaceae cùng với bộ mồi và đoạn dò phổ quát cho chi *Pseudomonas*. Trình tự các mồi tham khảo từ những nghiên cứu đi trước để thiết kế tổ hợp mồi và đoạn dò dùng cho quy trình định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật RT-qPCR được liệt kê ở Bảng 1.

Đối với họ Enterobacteriaceae, lựa chọn gen *rplP* làm gen đích và sử dụng trình tự gen đích là trình tự gen được giới hạn bởi cặp mồi rplP_F và rplP_R, thêm 20 nucleotid ở đầu 3' và 5' để thiết kế mồi và đoạn dò bằng công cụ PrimerQuest™. Sử dụng phần mềm MegAlign dóng hàng trình tự gen các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae (gồm *E. coli, K. pneumoniae* và *S. enterica*) để xác định vùng trình tự phổ quát trên trình tự bộ gen *K. pneumoniae*. Kết quả kiểm tra cho thấy trên đoạn dò có 3 nucleotid không nằm trên vùng tương đồng, vì thế chuyển các nucleotid không tương đồng ở đoạn dò rplP_P thành nucleotid "R" (thay cho nucleotid "A" hoặc "G") và "S" (thay cho nucleotid "G" hoặc "C") để bắt cặp hoàn toàn với các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae.

Kiểm tra vị trí các cặp mồi và đoạn dò so với vùng tương đồng của chi *Pseudomonas* cho kết quả mồi xuôi oprI_F1 có 01 nucleotid không nằm trên vùng tương đồng và đoạn dò oprI_P1 có 3 nucleotid không nằm trên vùng tương đồng. Đối với mồi oprI_F1 và đoạn dò oprI_P1, thay đổi các nucleotid không tương đồng thành nucleotid W (thay cho nucleotid "A" hoặc "T"), nucleotid "M" (thay cho nucleotid "A" hoặc "C") ở các vị trí thích hợp để bắt cặp hoàn toàn với các vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*.

Các thông số của mồi được kiểm tra *in silico* bằng công cụ OligoAnalyzer™ (IDT). Kết quả chi tiết được trình bày ở Bảng 2. Hai tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/ R1/ P1 và oprI_F1/ R1/ P1 có các thông số về chiều dài, tỉ lệ GC, nhiệt độ nóng chảy (T_m), chỉ số hairpin, self dimer, hetero dimer và kích thước sản phẩm đều nằm trong mức giới hạn theo khuyến cáo của Rodríguez A [15].

Bảng 1. Danh sách các mồi tham khảo từ tài liệu

Đối tượng phát hiện	Gen đích	Tên mồi/ đoạn dò	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
Vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae	*rplP*	rplP_F	GTCGCTGATGTTACAACCAAAG	Takahashi H [11]
		rplP_R	AGRCCGAARSTGCCGAAGCTAACA	
Vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*	*oprI*	oprI_F	AAATTCTCTGCWCTGGCTCTG	De Vos D [12]
		oprI_R	AGCAGCSWMTCCAAAGAAACCGAA	

R: nucleotid A hoặc G; S: G hoặc C; W: A hoặc T; M: A hoặc C (theo danh pháp IUPAC)

Bảng 2. Kết quả kiểm tra in silico các thông số của mồi và đoạn dò bằng công cụ OligoAnalyzer™ (IDT)

Tên mồi/ đoạn dò	Trình tự (5'-3')	Chiều dài (nu)	Tỉ lệ GC (%)	T_m (°C)	Hairpin (kcal/mol)	Self dimer (kcal/mol)	Hetero dimer (kcal/mol)
rplP_F1	GTCGCTGATGTTACAACCAAAG	22	45,5	61	-0,16	-3,61	-4,41‡/ -5,49♣
rplP_R1	GCTTAACTGCACGGGTCATA	20	50	61,1	-0,53	-7,05	N/A*/ N/A♣
rplP_P1	AGRCCGAARSTGCCGAAGCTAACA	24	54,2	67	-1,86	-6,34	N/A*/ -5,09‡
oprI_F1	AAATTCTCTGCWCTGGCTCTG	21	47,6	61,5	-0,32	-6,87	-4,92‡/ -8,47♣
oprI_R1	TTACTTGCGGCTGGCTTT	18	47,2	59,6	-0,52	-3,61	-4,92*/ -6,69♣
oprI_P1	AGCAGCSWMTCCAAAGAAACCGAA	24	47,9	66,7	0,99	-3,61	-8,47*/ -6,69‡

R: nucleotid A hoặc G; S: G hoặc C; W: A hoặc T; M: A hoặc C (theo danh pháp IUPAC); nu: nucleotid; T_m: nhiệt độ nóng chảy; *: hetero dimer với mồi xuôi; ‡: hetero dimer với mồi ngược; ♣: hetero dimer với đoạn dò; N/A: không có giá trị

https://doi.org/10.32895/hcjm.m.2025.09.19

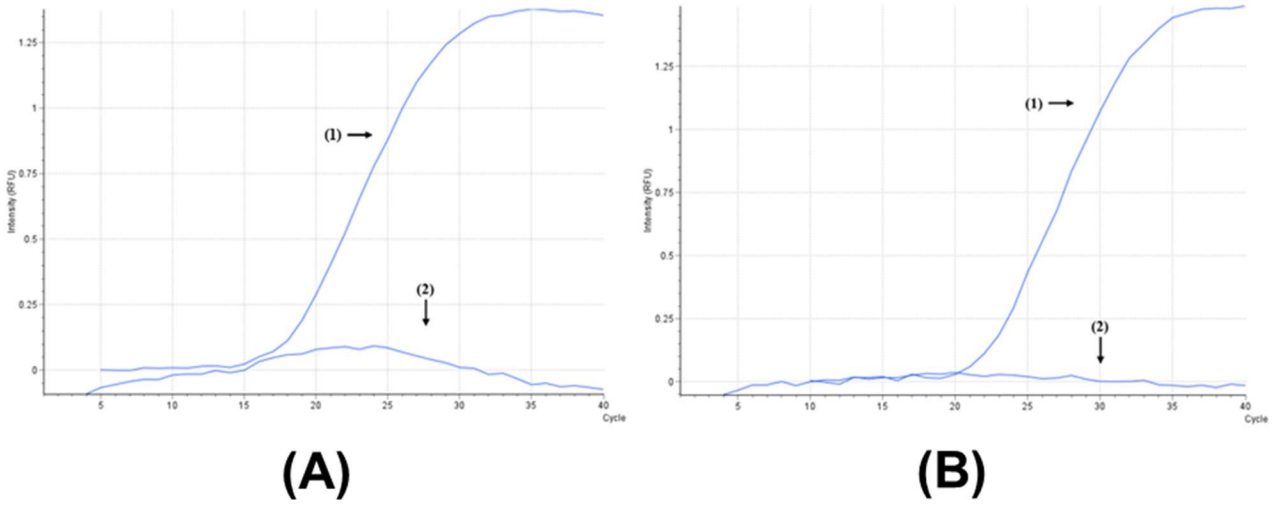
3.2. Khảo sát điều kiện cho phản ứng multiplex RT-qPCR

Kết quả khảo sát nồng độ mồi và đoạn dò cho phản ứng multiplex RT-qPCR thực hiện trên khuôn mẫu RNA vi khuẩn Gram âm dung nạp mật được trình bày ở Bảng 3. Đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang theo số chu kỳ được thể hiện ở Hình 1. Kết quả khảo sát nồng độ mồi và đoạn dò cho thấy chứng âm ở ba nồng độ khảo sát có giá trị Ct gần bằng nhau. Tuy nhiên ở nồng độ 400 – 200 nM chứng dương có giá trị Ct thấp nhất (22,34). Vì vậy đối với tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/ R1/ P1 và oprI _F1/ R1/ P1 lựa chọn nồng độ mồi là 400 nM và nồng độ đoạn dò là 200 nM để sử dụng trong phương pháp phát hiện vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex RT-qPCR.

Bảng 3. Kết quả khảo sát nồng độ của tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/ R1/ P1 và oprI _F1/ R1/ P1

Nồng độ mồi – đoạn dò (nM)	Ct	
	Chứng dương	Chứng âm
400 – 200	22,34	36,99
200 – 100	22,74	37,02
100 – 50	26,20	37,65

Ct: chu kỳ ngưỡng

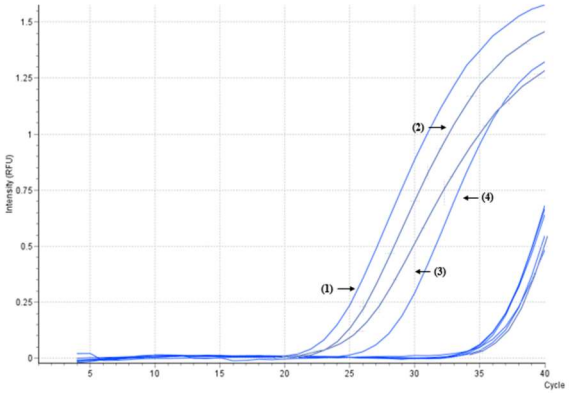


Hình 1. Đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang theo số chu kỳ của mẫu khảo sát *in vitro*

3.3. Đánh giá phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex RT-qPCR

3.3.1. Độ đặc hiệu

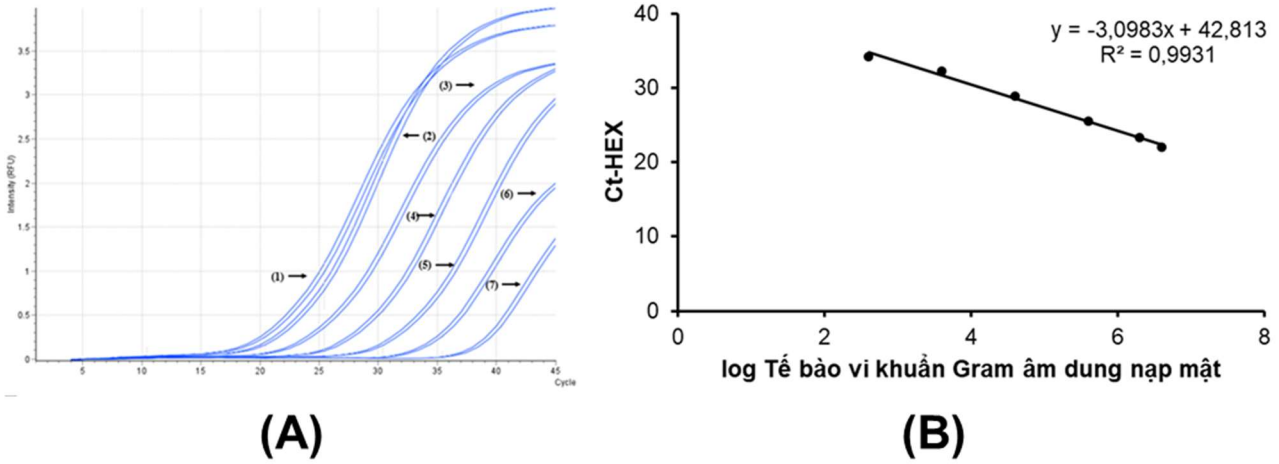
Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/ R1/ P1 và oprI_F1/ R1/ P1 ở Hình 2 cho thấy các mẫu RNA của nhóm vi khuẩn Gram âm dung nạp mật đều có giá trị Ct thấp hơn chứng âm (36,99). Các mẫu RNA vi khuẩn *(B. subtilis* và *S. aureus*) và vi nấm khác (*C. albicans* và *A. niger*) có giá trị Ct gần bằng với chứng âm. Vậy tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/ R1/ P1 và oprI_F1/ R1/ P1 bắt cặp đặc hiệu với nhóm vi khuẩn Gram âm dung nạp mật, phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex RT-qPCR đạt độ đặc hiệu.



Hình 2. Đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang theo số chu kỳ của mẫu kiểm tra độ đặc hiệu với tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/ R1/ P1 và oprI_F1/ R1/ P1 dùng cho kỹ thuật multiplex RT-qPCR. (1): Mẫu RNA *S. enterica*; (2): Mẫu RNA *K. pneumoniae*; (3): Mẫu RNA *E. coli*; (4): Mẫu RNA *P. aeruginosa*

3.3.2. Độ tuyến tính

Kết quả khảo sát độ tuyến tính của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex RT-qPCR cho thấy các mẫu có RSD dao động từ 0,42-0,66% (< 25%). Đường hồi quy tuyến tính được xây dựng có phương trình: "y = -3,0983x + 42,813" với R^2 = 0,9931 (> 0,980). Vậy phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex RT-qPCR đạt độ tuyến tính với khoảng xác định từ 4.10^2-4.10^6 tế bào.



Hình 3. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng multiplex RT-qPCR. (A): Đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang theo số chu kỳ của mẫu khảo sát; (B): Đường chuẩn tương quan giữa Ct và log số tế bào vi khuẩn Gram âm dung nạp mật tương ứng; (1-6): Mẫu RNA vi khuẩn Gram âm dung nạp mật ở các cấp pha loãng theo dãy nồng độ giảm dần từ 4.10^6 đến 4.10^2 tế bào; (7): Mẫu chứng âm

3.3.3. Độ chính xác

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng multiplex RT-qPCR

Tế bào	Độ lặp lại			Độ chính xác trung gian		
	$\overline{Ct}$	SD	RSD (%)	$\overline{Ct}$	SD	RSD (%)
4.10^6	22,04	0,18	0,79	22,05	0,16	0,73
2.10^6	23,27	0,17	0,73	23,27	0,15	0,65
4.10^5	25,49	0,14	0,57	25,49	0,13	0,50
4.10^4	28,83	0,14	0,49	28,87	0,15	0,53
4.10^3	32,27	0,10	0,30	32,24	0,15	0,47
4.10^2	34,24	0,10	0,28	34,21	0,13	0,38

$\overline{Ct}$: giá trị trung bình của chu kỳ ngưỡng; SD: độ lệch chuẩn; RSD: độ lệch chuẩn tương đối

Độ chính xác bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng multiplex RT-qPCR được trình bày ở Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại của các mẫu có RSD dao động từ 0,28-0,79%. Độ chính xác trung gian đối với phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng multiplex RT-qPCR của các mẫu có RSD dao động từ 0,38-0,73% (< 25%). Vậy phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex RT-qPCR đạt độ chính xác.

3.3.4. Độ đúng

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng multiplex RT-qPCR

Mẫu	log tế bào ban đầu	Trung bình log tế bào tìm lại	Trung bình tỷ lệ thu hồi (%)[†]	$\overline{Ct}$	SD	RSD (%)
80%	3,51	3,41	97,29	32,25	0,33	1,03
100%	3,60	3,32	92,20	32,52	0,12	0,36
120%	3,68	3,50	95,01	31,98	0,36	1,13

[†]: tỷ lệ thu hồi được tính theo log tế bào; $\overline{Ct}$: giá trị trung bình của chu kỳ ngưỡng; SD: độ lệch chuẩn; RSD: độ lệch chuẩn tương đối

Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng multiplex RT-qPCR cho thấy tỉ lệ thu hồi trung bình của mẫu dao động từ 92,20-97,29%, giá trị Ct của mẫu có RSD trong khoảng 0,36-1,13% (< 25%). Vậy phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex

https://doi.org/10.32895/hcjm.m.2025.09.19

RT-qPCR đạt độ đúng.

3.3.5. LOD và LOQ

Phương pháp multiplex RT-qPCR định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật có LOQ là 4.10^2 tế bào/ml. (giá trị tế bào thấp nhất trên đường tuyến tính là 4.10^2 tế bào). Mẫu RNA vi khuẩn Gram âm dung nạp mật được pha loãng đến mật độ tương ứng 121 tế bào/ml để kiểm tra LOD bằng thực nghiệm. Kết quả kiểm tra LOD cho thấy giá trị Ct của các mẫu có RSD là 2,63% (< 25%). Vậy phương pháp định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng kỹ thuật multiplex RT-qPCR có LOD là 121 tế bào/ml.

4. BÀN LUẬN

Giới hạn nhiễm vi sinh vật thường được xác định bằng phương pháp đĩa thạch đối với chỉ tiêu định lượng; tăng sinh và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc với chỉ tiêu định tính. Tuy nhiên, phương pháp này cần nhiều thời gian để vi sinh vật, nếu có trong mẫu thử, hồi phục và phát triển trong môi trường nuôi cấy để có thể xác nhận khi quan sát bằng mắt thường. Do đó, các phương pháp kiểm nghiệm nhanh chỉ tiêu vi sinh đang không ngừng được nghiên cứu phát triển nhằm bổ khuyết những hạn chế của phương pháp truyền thống. Một số nghiên cứu trên thế giới đã áp dụng kỹ thuật PCR để phát hiện nhanh sự hiện diện của các vi sinh vật trong mẫu phẩm như nghiên cứu của Sen K và Asher DM đã xây dựng được phương pháp phát hiện các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae trong mẫu máu bằng kỹ thuật multiplex PCR, sử dụng đoạn dò TaqMan bắt cặp đặc hiệu với trình tự gen 16S rRNA để xác định các chủng vi khuẩn như *Serratia*, *Klebsiella*, các loài *Enterobacter* và *Y. enterocolitica* [6]. Nghiên cứu của Castillo M cũng dựa trên kỹ thuật real-time PCR để xây dựng quy trình định lượng tổng số vi khuẩn họ Enterobacteriaceae trong hệ tiêu hóa heo sữa với giới hạn phát hiện từ 10^5 đến 10^6 bản sao trong 1 g mẫu mô tươi [16]. Bên cạnh đó, các vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* cũng được nghiên cứu phát hiện bằng kỹ thuật real-time PCR. Mulet M đã xây dựng quy trình phát hiện các vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* bằng kỹ thuật nested PCR với hai cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự gen *rpo*D để tăng độ nhạy và độ đặc hiệu [17].

Hầu như chưa có nghiên cứu nào hướng đến việc phát hiện đồng thời các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas*, phục vụ cho công tác kiểm nghiệm chỉ tiêu này trong các mẫu dược phẩm. Trong nghiên cứu này, cặp mồi và đoạn dò phổ quát của Enterobacteriaceae rplP_F1/ R1/ P1 được thiết kế dựa trên cặp mồi rplP_1F và rplP_185R của Takahashi H [11]; cặp mồi và đoạn dò cho chi *Pseudomonas* oprI_F1/ R1/ P1 được thiết kế dựa trên cặp mồi PS1_F và PS2_R trong nghiên cứu của De Vos D [12]. Trong đó, nhóm nghiên cứu đã thay đổi các nucleotid không tương đồng của họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas* bằng các nucleotid ngẫu nhiên tương ứng, điều này làm tăng tính phổ quát của cặp mồi và đoạn dò sử dụng, và cũng là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trên đối tượng vi khuẩn Gram âm dung nạp mật.

Phương pháp phát hiện vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng multiplex RT-qPCR trong nghiên cứu đạt tính đặc hiệu, độ tuyến tính ($R^2 = 0,9931$), hệ số E = 110,3%, độ chính xác và độ đúng (RSD < 25%), LOQ = 4.10^2 tế bào/ml và LOD = 121 tế bào/ml. Nghiên cứu của Choi SH (2011) sử dụng phương pháp RT-qPCR để phát hiện vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae với giới hạn phát hiện là 10^3 CFU/ml [18]. Một nghiên cứu khác của Maier C (2021) định lượng tổng số vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* trong mẫu sữa bằng qPCR với khoảng xác định từ 10^3-10^7 CFU/ml [19]. Giới hạn phát hiện các vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong hai nghiên cứu kể trên đều cao hơn giới hạn phát hiện của phương pháp phát hiện và phương pháp định lượng vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong nghiên cứu. Trong nghiên cứu được công bố gần đây của Noh E (2025) [20], việc áp dụng kỹ thuật PCR cho phép phát hiện *Pseudomonas cannabina* trong mẫu thực vật ở giới hạn 100 CFU/ ml.

Theo Dược điển Việt Nam V (DĐVN V) quy định đối với chỉ tiêu định lượng vi khuẩn Gram âm dung nạp mật: không quá 10^2 CFU vi khuẩn trong 1 g (ml) thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên (động, thực vật, khoáng chất), cao thuốc, cồn thuốc dùng để sản xuất thuốc uống từ dược liệu; không quá 10^4 CFU vi khuẩn trong 1 g (ml) sản phẩm thuốc từ dược liệu (thuốc thang...) được xử lý bằng ethanol thấp độ (hoặc nước nóng không sôi) trước khi dùng [2]. Như vậy, giới hạn phát hiện của phương pháp trong nghiên cứu đạt yêu cầu quy định trong DĐVN V với chỉ tiêu định lượng. Đối với chỉ tiêu không có vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong chế phẩm dạng thuốc hít (bao gồm cả dạng khí dung) quy định trong DĐVN V, mẫu có thể được tăng sinh trong môi trường EE

(Enterobacteriaceae Enrichment Mossel), sau đó cấy ria trên môi trường thạch VRB (Violet Red Bile Agar) để phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn Gram âm dung nạp mật. Nhóm nghiên cứu cũng đã tiến hành tăng sinh mẫu chứa khoảng 1-5 vi khuẩn trên môi trường EE sau 4 giờ, phương pháp nghiên cứu cho thấy được *K. pneumoniae* sau khi tăng sinh. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Nakano S sử dụng real-time PCR để phát hiện các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae trong các mẫu thực phẩm sau khi tăng sinh 5 giờ [7].

Phương pháp định lượng dựa trên khuôn mẫu dùng cho phản ứng PCR là RNA cũng cho phép khẳng định kết quả định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật này đại diện cho các vi sinh vật sống có trong mẫu, đáp ứng yêu cầu kiểm nghiệm vi sinh, xác định lượng vi sinh vật còn sống có trong các mẫu dược phẩm; do RNA chỉ tồn tại trong tế bào sống, bị phân hủy trong thời gian ngắn ngay khi vi sinh vật chết đi.

Đề tài đã tiến hành xây dựng và đánh giá quy trình đồng thời trên 4 chủng vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bao gồm *E. coli, K. pneumoniae, Pseudomonas* và *Salmonella*, đại diện cho họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas*. Với mục tiêu bước đầu xây dựng quy trình định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong dược phẩm bằng kỹ thuật RT-qPCR, các nội dung nghiên cứu được tiến hành trên đối tượng mẫu thử là các chủng vi sinh vật chuẩn ATCC (American Type Culture Collection), được hoạt hóa từ ống gốc và tăng sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm. Đề tài sẽ tiếp tục triển khai khảo sát quy trình định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật bằng RT-qPCR trên các mẫu dược phẩm thực tế, tập trung vào đối tượng là các chế phẩm thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên (động, thực vật, khoáng chất), cao thuốc, cồn thuốc dùng để sản xuất thuốc uống từ dược liệu và thuốc từ dược liệu (thuốc thang, trà...).

5. KẾT LUẬN

Phương pháp RT-qPCR định lượng tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật sử dụng tổ hợp mồi và đoạn dò rplP_F1/ R1/ P1 và oprI_F1/ R1/ P1 cho phép cùng lúc ghi nhận tín hiệu của các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và chi *Pseudomonas* với nồng độ mồi và đoạn dò lần lượt là 400 và 200 nM. Phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng (RSD < 25%), giới hạn định lượng là 4.10^2 tế bào/ml và giới hạn phát hiện ở mức 121 tế bào/ml, với tổng thời gian kiểm nghiệm gói gọn trong vòng 3 giờ. Kết quả thu được từ nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của kỹ thuật RT-qPCR để kiểm tra chỉ tiêu tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật đối với yêu cầu về giới hạn nhiễm khuẩn trong các mẫu dược phẩm.

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 nghiên cứu.

Nguồn tài trợ

Nghiên cứu nhận được kinh phí tài trợ từ Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 19/2023/HĐ-QKHCN ký ngày 17/03/2023.

Xung đột lợi ích

Không có xung đột lợi ích tiềm ẩn nào liên quan đến bài viết này được báo cáo.

ORCID

Vũ Thanh Thảo
https://orcid.org/0009-0006-9322-8355
Nguyễn Tấn Phát
https://orcid.org/0009-0003-0954-7715
Lê Tuấn Anh
https://orcid.org/0000-0003-4566-0945
Phan Thanh Dũng
https://orcid.org/0009-0005-7295-1176
Nguyễn Tú Anh
https://orcid.org/0000-0003-4566-0945
Trần Cát Đông
https://orcid.org/0009-0001-2617-8160
Phạm Văn Sơn
https://orcid.org/0000-0002-8425-0386
Ngô Thị Minh Tâm
https://orcid.org/0009-0006-2012-2090

https://doi.org/10.32895/hcjm.m.2025.09.19

Trần Thị Bích Huệ
https://orcid.org/0009-0000-9795-3083
Bạch Thu Thảo
https://orcid.org/0009-0004-5813-0825
Trịnh Túy An
https://orcid.org/0000-0001-7439-6245

Đóng góp của các tác giả

Ý tưởng nghiên cứu: Trần Cát Đông

Đề cương và phương pháp nghiên cứu: Vũ Thanh Thảo

Thu thập dữ liệu: Nguyễn Tấn Phát, Lê Tuấn Anh

Giám sát nghiên cứu: Vũ Thanh Thảo

Nhập dữ liệu: Trần Thị Bích Huệ, Bạch Thu Thảo

Quản lý dữ liệu: Ngô Thị Minh Tâm

Phân tích dữ liệu: Phạm Văn Sơn

Viết bản thảo đầu tiên: Trịnh Túy An

Góp ý bản thảo và đồng ý cho đăng bài: Phan Thanh Dũng, Nguyễn Tú Anh

Cung cấp dữ liệu và thông tin nghiên cứu

Tác giả liên hệ sẽ cung cấp dữ liệu nếu có yêu cầu từ Ban biên tập.

Chấp thuận của Hội đồng Đạo đức

Nghiên cứu được tiến hành trên đối tượng mẫu thử là các chủng vi sinh vật chuẩn ATCC đã được thương mại hóa, không phải các chủng phân lập trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm, do đó nghiên cứu được miễn trừ hồ sơ y đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. USP. Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Tests for Specified Organisms. In USP-NF. 2023.
2. Bộ Y tế. Phụ lục 13.6, Dược điển Việt Nam V. NXB Y học. 2018.
3. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. Methods Mol Biol. 2017;1546:125-33.
4. Škof A, Poljak M, Krbavčič A. Real-time polymerase chain reaction for detection of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in pharmaceutical products for topical use. Journal of Rapid Methods Automation in Microbiology. 2004;12(3):169-83.
5. Barletta F, Mercado EH, Lluque A, Ruiz J, Cleary TG, Ochoa TJ. Multiplex real-time PCR for detection of Campylobacter, Salmonella, and Shigella. J Clin Microbiol. 2013;51(9):2822-9.
6. Sen K, Asher DM. Multiplex PCR for detection of Enterobacteriaceae in blood. Transfusion. 2001;41(11):1356-64.
7. Nakano S, Kobayashi T, Funabiki K, Matsumura A, Nagao Y, Yamada T. Development of a PCR assay for detection of Enterobacteriaceae in foods. J Food Prot. 2003;66(10):1798-804.
8. Chiu TH, Chen TR, Hwang WZ, Tsen HY. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of Salmonella spp. in food. Int J Food Microbiol. 2005;97(3):259-65.
9. Trần Thị Xuân Mai, Trần Thị Hoàng Yến, Nguyễn Văn Bé, Võ Thị Thanh Phương. Phát hiện nhanh Salmonella spp., Salmonella enterica hiện diện trong thực phẩm bằng kỹ thuật PCR đa mồi (multiplex PCR). Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 2011(20b):198-208.
10. Nguyễn Thành Luân, Lường Thị Hiếu, Cao Nguyễn Khánh Linh. Nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật multiplex pcr trong phát hiện vi khuẩn Salmonella sp. và Staphylococcus aureus gây ngộ độc thực phẩm. 2019.
11. Takahashi H, Saito R, Miya S, Tanaka Y, Miyamura N, Kuda T, et al. Development of quantitative real-time PCR for detection and enumeration of Enterobacteriaceae. 2017;246:92-7.
12. De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, et al. Direct detection and identification of Pseudomonas aeruginosa in clinical samples such as skin biopsy specimens and

expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35(6):1295-9.

13. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Trends in Food Science & Technology. 2014;37(2):115-26.
14. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. Front Microbiol. 2017;8:108.
15. Rodriguez A, Rodriguez M, Cordoba JJ, Andrade MJ. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. Methods Mol Biol. 2015;1275:31-56.
16. Castillo M, Martin-Orue SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martin M, Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. Vet Microbiol. 2006;114(1-2):165-70.
17. Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, Garcia-Valdes E. An rpoD-based PCR procedure for the identification of Pseudomonas species and for their detection in environmental samples. Mol Cell Probes. 2009;23(3-4):140-7.
18. Choi SH, Lee SB. Real time Reverse Transcriptase-PCR to detect viable enterobacteriaceae in milk. Food Science of Animal Resources. 2011;31(6):851-7.
19. Maier C, Hofmann K, Huptas C, Scherer S, Wenning M, Lucking G. Simultaneous quantification of the most common and proteolytic Pseudomonas species in raw milk by multiplex qPCR. Appl Microbiol Biotechnol. 2021;105(4):1693-708.
20. Noh E, Cedeno C, Bull CT, Keinath AP, Wechter WP, Wang H. A Quantitative PCR Assay for Specific Detection of Pseudomonas cannabina pv. alisalensis. Plant Dis. 2025;109(2):461-70.

 https://doi.org/10.32895/hcjm.m.2025.09.19