

# XÂY DỰNG ĐỐI CHỨNG CHUẨN CHO KỸ THUẬT MULTIPLEX qPCR XÁC ĐỊNH *BACTEROIDES FRAGILIS*, *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*, *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* VÀ *ESCHERICHIA COLI* Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

Vũ Sơn Giang<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Thân<sup>1</sup>, Nguyễn Linh Toàn<sup>2</sup>, Hồ Văn Sơn<sup>1</sup>

## Tóm tắt

**Mục tiêu:** Xây dựng được đối chứng dương giúp phát hiện đồng thời *Enterotoxigenic Bacteroides fragilis* (ETBF), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Akkermansia muciniphila* (Am), *Escherichia coli* (E.coli) với độ đặc hiệu và độ nhạy cao trong khối u sinh thiết từ bệnh nhân (BN) ung thư đại trực tràng (UTĐTT).

**Phương pháp nghiên cứu:** Sử dụng phương pháp qPCR đa môi, thiết kế các cặp môi đặc hiệu với các gen của ETBF, Fn, Am, E.coli, xây dựng mẫu chuẩn và tối ưu điều kiện qPCR đa môi. **Kết quả:** Tạo ra 4 plasmid tái tổ hợp cho các chủng vi khuẩn. Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật đạt đến 10 bản sao vi khuẩn trên một phản ứng, với hệ số tương quan  $R^2 > 0,99$ ; hiệu suất phản ứng  $> 94\%$  và có thể sử dụng làm đối chứng chuẩn để phân tích trên mẫu bệnh phẩm. Đồng thời, qua khảo sát trên 100 mẫu UTĐTT nhận thấy tỷ lệ nhiễm vi khuẩn ETBF, Fn, Am, E.coli lần lượt là 61%, 60%, 44% và 39%. **Kết luận:** Bước đầu cho thấy những thay đổi của hệ vi sinh vật có tiềm năng trở thành dấu ấn sinh học để phát hiện sớm UTĐTT.

**Từ khóa:** *Bacteroides fragilis*; *Fusobacterium nucleatum*; *Akkermansia muciniphila*; *Escherichia coli*; Ung thư đại trực tràng; qPCR đa môi.

## DEVELOPMENT OF STANDARD CONTROLS FOR MULTIPLEX qPCR TECHNIQUE TO QUANTIFY *BACTEROIDES FRAGILIS*, *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*, *AKKERMANSIA MUCINIPHILA*, AND *ESCHERICHIA COLI* IN COLORECTAL CANCER PATIENTS

### Abstract

**Objectives:** To develop a standard calibrator for the simultaneous detection of *Enterotoxigenic Bacteroides fragilis* (ETBF), *Fusobacterium nucleatum* (Fn),

<sup>1</sup>Bệnh viện Quân y 175

<sup>2</sup>Học viện Quân y

\*Tác giả liên hệ: Vũ Sơn Giang (bsgiang175@gmail.com)

Ngày nhận bài: 19/9/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 30/10/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i1.1023>

*Akkermansia muciniphila* (*Am*), and *Escherichia coli* (*E.coli*) with high specificity and sensitivity in tumor tissues of colorectal cancer (CRC) patients. **Methods:** The specific primers and probes were designed based on the highly conserved regions of *ETBF*, *Fn*, *Am*, and *E.coli*, built a standard calibrator, and optimized multiplex qPCR conditions. **Results:** 4 recombinant plasmids containing specific regions were successfully synthesized. The sensitivity of the technique reaches 10 copies/reaction, with correlation coefficient  $R^2 > 0.99$  and  $E > 94\%$ , and can be used as a standard control for analyzing the specimens from patients. At the same time, detected positivity for *ETBF*, *Fn*, *A.m*, and *E.coli* in 61%, 60%, 44%, and 39% of the samples respectively ( $n = 100$ ). **Conclusion:** These preliminary findings suggest that an imbalance in the gut microbiota has the potential to serve as a biomarker for the early detection of CRC.

**Keywords:** *Bacteroides fragilis*; *Fusobacterium nucleatum*; *Akkermansia muciniphila*; *Escherichia coli*; Colorectal cancer; Multiplex qPCR.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là một trong những bệnh ung thư phổ biến, đứng thứ ba về tỷ lệ mắc mới và thứ hai về tỷ lệ tử vong trên toàn thế giới, với > 1,9 triệu trường hợp mắc mới và gần 930.000 trường hợp tử vong trong năm 2022 [1]. Sự phát triển của UTĐTT gần như là kết quả của đột biến gen, quá trình methyl hóa DNA và rối loạn vi sinh vật đường ruột [2, 3].

Hệ vi sinh vật đường ruột chứa khoảng 40 nghìn tỷ vi sinh vật sống trong hệ tiêu hóa của người [4]. Thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột ở người bị ảnh hưởng bởi chế độ ăn uống, tuổi tác, vị trí địa lý, chủng tộc và kiểu gen của vật chủ [5, 6]. Các phân tích so sánh về metagenomic và metataxonomic hệ vi sinh vật đường ruột được tìm thấy trong đại tràng của BN ung thư và

người khỏe mạnh cho thấy một số vi khuẩn đường ruột như *Fn*, *ETBF*, *Am* và *E.coli* có liên quan đến sự khởi phát và tiến triển của UTĐTT [5, 6, 7].

Tại Việt Nam, Tran và CS (2022) đã kết hợp giải trình tự 16S rRNA, phân tích dữ liệu vi khuẩn kỵ khí và giải trình tự toàn bộ hệ gen, *Fn* đã được phát hiện ở BN UTĐTT [8]. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu về các vi khuẩn khác gây ung thư, đặc biệt là mối quan hệ của chúng với nhau ở BN UTĐTT. Gần đây, đợt sàng lọc UTĐTT đầu tiên (2018 - 2019) được thực hiện tại Hà Nội bằng xét nghiệm miễn dịch hóa học - máu ẩn trong phân (iFOBT) và những người tham gia FOBT dương tính sau đó được thực hiện bằng phương pháp nội soi, nâng tỷ lệ UTĐTT từ 1,7 - 16,4% [9]. Tuy nhiên, FOBT bị giới hạn về độ nhạy

(33%) và độ chính xác (11%) trong phát hiện các khối u tuyến tiền triển, làm tăng nhu cầu ứng dụng dấu ấn sinh học DNA chính xác hơn. Vì vậy, việc phát triển một kỹ thuật đơn giản, chính xác và thông lượng cao để phát hiện đồng thời các chủng vi khuẩn gây ung thư, từ đó, kỹ thuật qPCR đa môi được thiết lập nhằm phát hiện đồng thời các vi khuẩn *Fn*, *ETBF*, *Am* và *E.coli*. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên dựa vào kỹ thuật qPCR đa môi để phát hiện vi khuẩn. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Xây dựng đối chứng dương giúp phát hiện đồng thời Fn, ETBF, Am và E.coli với độ đặc hiệu và độ nhạy cao.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

- \* *Mẫu bệnh phẩm*: 100 mẫu mô ung thư từ BN mắc UTĐTT đã được phân loại mô bệnh học tại Bệnh viện Quân y 175 trong năm 2023.
- \* *Cặp môi tự thiết kế*: Chúng tôi đã thiết kế các cặp môi đặc hiệu với các chủng *ETBF*, *Fn*, *Am*, *E.coli* dựa trên các gene tiết các độc tố hoặc các chất kích hoạt oncogen. Các cặp môi/đầu dò được tổng hợp bởi hãng IDT (Singapore) với trình tự được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các cặp môi/đầu dò trong nghiên cứu.

| Vi khuẩn                                  | Trình tự (5'-3')                                                                                    |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>B.fragilis</i><br>(gene <i>Bft-1</i> ) | F: GTACATGTTTCTATGGATAAGCGT<br>R: CCAGTATAAAGCTGGTAGAATCC<br>P: Hex-TCCCTGCCGTTGAACAGACGGACA        |
| <i>Fn</i><br>(gene <i>nusG</i> )          | F: CCATTACTTTAACTCTACCATGTTC<br>R: TTGACTTTACTGAGGGAGATTATG<br>P: FAM-CAATTTTCAGCAACTTGTCCTTCTTGATC |
| <i>Am</i><br>(gene <i>RluA</i> )          | F: GAAGACGGAGGACGGA ACT<br>R: CCCGGCTCTGGGATTTGAA<br>P: Hex-CTTTCCCGTATTCTGTCCGTTGAAGC              |
| <i>E.coli</i><br>(gene <i>eae</i> )       | F: TGTAAACTATACTCCGATTCCTC<br>R: GGAAGTGCATTGAGTAAAGGAG<br>P: FAM-ACCCGTACCATGACGGTAATCGATCC        |
| Nội kiểm<br>( <i>SLCO2A1</i> )            | F: CAGGCAGCAAGCACAGTCA<br>R: GCAATCCCCAAAGCACCTG<br>P: Cy5-TCACAGACATTTCCTGAGAGGCCAAGA              |

## 2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Tách chiết DNA tổng số*: DNA được tách từ mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen). Nồng độ và độ sạch DNA được đánh giá bằng máy đo quang phổ hấp thụ NanoDrop 2000 (Invitrogen).

\* *Kỹ thuật PCR*: Phương pháp PCR được xây dựng với các cặp mồi thiết kế đặc hiệu với từng chủng vi khuẩn, sử dụng 1X GoTaq Mastermix (Promega). Nồng độ mồi sử dụng là 0,2μM, lượng DNA là 150ng cho mỗi phản ứng. Điều kiện phản ứng: 95°C - 2 phút, (95°C - 30 giây, 60°C - 30 giây, 72°C - 30 giây) x 45, 72°C - 5 phút.

\* *Tách dòng sản phẩm PCR*: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit GenJET PCR Purification (Thermo Scientific), tách dòng bằng kit pGEM-T Vector Systems (Promega).

\* *Xác định số bản sao plasmid*: Nồng độ DNA được xác định bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ trên máy NanoDrop2000, sau đó sẽ được tính toán đưa về số bản sao/μL theo công thức: Số bản sao plasmid/μL =  $(6,02 \times 10^{23} \text{ copy}/\mu\text{L}) \times (X \text{ ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / \text{kích thước plasmid (bp)}$ .

Các plasmid được pha loãng bậc 10 và phối trộn với nhau tạo thành dải nồng độ có tỷ lệ được trình bày trong bảng 2 để lần lượt tạo ra các mẫu chuẩn.

\* *Kỹ thuật qPCR*: Phản ứng qPCR đa mồi khuếch đại trình tự đích (*Bft-1*; *nusG*; *eae*, *RluA*) và trình tự tham chiếu (*SLCO2A1*) được thực hiện từ các đường chuẩn phối trộn với nhau (Bảng 2), sử dụng Paltinum qPCR Mastermix (Invitrogen). Điều kiện phản ứng: 95°C - 2 phút (95°C - 30 giây, 60°C - 30 giây) x 45 chu kỳ. Đọc tín hiệu tại 60°C.

**Bảng 2.** Tỷ lệ phối trộn các plasmid để tạo mẫu chuẩn.

| Phản ứng | Plasmid                           | Số bản copy     |                 |                 |                 |                 |    |  |
|----------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|--|
| Multi 1  | p.Bft-1                           | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 |  |
|          | p.nusG                            | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 |  |
|          | gDNA vi khuẩn <i>E.coli JM109</i> | 50ng            |                 |                 |                 |                 |    |  |
| Multi 2  | p.RluA                            | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 |  |
|          | p.eae                             | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 |  |
|          | p.SLCO2A1                         | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 |  |
|          | gDNA vi khuẩn <i>E.coli JM109</i> | 50ng            |                 |                 |                 |                 |    |  |

\* *Phân tích thống kê*: Dữ liệu được tổng hợp, xử lý bằng Excel, sử dụng phần mềm Graphpad Prism 9 để lập đồ thị và phân tích. Đường hồi quy tuyến tính được biểu diễn thông qua các giá trị Ct trung bình của dải nồng độ plasmid được pha loãng bậc 10 để tìm ra hệ số tuyến tính  $R^2$  và hiệu suất phản ứng E.

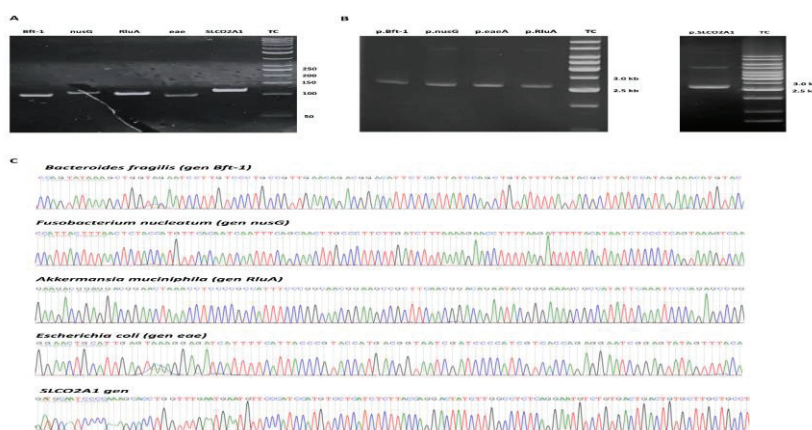
### 3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức Bệnh viện Quân y 175 (Giấy chứng nhận số 58/GCN-HĐĐĐ ngày 10/01/2023). Số liệu nghiên cứu được Bệnh viện Quân y 175 cho phép sử dụng và công bố. Các kết quả xét nghiệm chỉ có giá trị trong nghiên cứu và không áp dụng trong điều trị hay cho bất kỳ mục đích thương mại. Thông tin của BN được đảm bảo giữ bí mật. Nhóm tác giả cam kết không có bất kỳ xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Tách dòng trình tự khảo sát và trình tự tham chiếu

Sản phẩm sau khi được khuếch đại với các cặp mồi đặc hiệu với các chủng vi khuẩn, kết quả điện di trên gel polyacrylamide 8% cho thấy các băng sáng rõ nét, đúng kích thước (Hình 1A). Sản phẩm PCR tinh sạch được đưa vào vector pGEM-T, nối và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109 theo phương pháp sốc nhiệt. Sàng lọc trên môi trường kháng sinh ampicillin, thu nhận được plasmid tái tổ hợp. Lần lượt chọn 1 khuẩn lạc mang đoạn chèn để tách plasmid tái tổ hợp (Hình 1B), sau đó giải trình tự với cặp mồi vector. Kết quả so sánh trình tự nucleotide thu được với ngân hàng dữ liệu cho thấy đoạn DNA khuếch đại bởi cặp mồi chúng tôi thiết kế tương đồng với các trình tự tương ứng gene *Bft-1*, *nusG*, *RluA*, *eae* và *SLCO2A1* (Hình 1C).

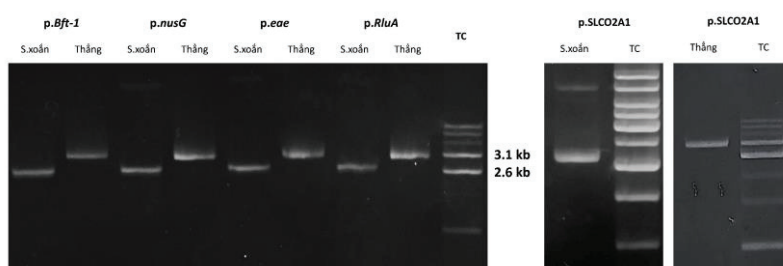


**Hình 1.** (A) Kết quả sản phẩm PCR chứa các gene *Bft-1*, *eae*, *RluA*, *nusG* và *SLCO2A1* sau tinh sạch; (B) Plasmid sau tách chiết; (C) Kết quả giải trình tự đoạn chèn *Bft-1*, *nusG*, *RluA*, *eae* và *SLCO2A1* đại diện cho *B.fragilis*, *Fn*, *Am* và *E.coli*.



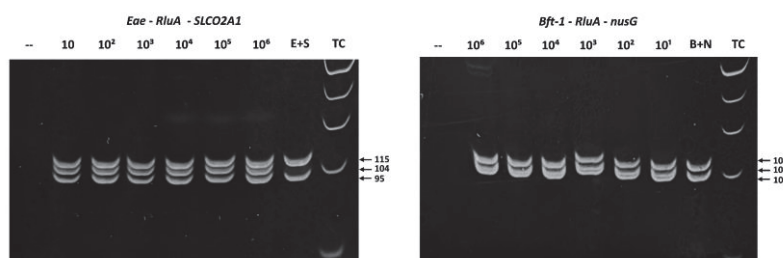
## 2. Xác định hiệu suất phản ứng của phản ứng PCR đa môi

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra cấu hình plasmid ảnh hưởng đến độ nhạy phát hiện phản ứng PCR [10]. Theo đó, DNA plasmid dạng thẳng làm khuôn trong phản ứng PCR có độ nhạy tốt hơn so với plasmid ở dạng siêu xoắn. Chính vì vậy, các plasmid dạng thẳng được tổng hợp bằng phương pháp PCR đảo. Sau khi tinh sạch, sản phẩm được đo nồng độ và điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 2). Ảnh điện di cho thấy các băng plasmid dạng thẳng sau khi tinh sạch rõ nét, đúng với kích thước như tính toán.



**Hình 2.** Kết quả điện di 1 µL plasmid dạng thẳng sau tinh sạch trên gel agarose 1% sau khi tinh sạch.  
(TC: Thang chuẩn DNA SY- 4,6kb)

DNA plasmid thẳng được pha loãng thành một dải nồng độ theo bậc 10 từ  $10^6$  - 10 bản sao. Dựa vào sự chênh lệch kích thước các plasmid được phối trộn với nhau để làm khuôn cho 2 phản ứng PCR đa môi nhằm xác định độ đặc hiệu và độ nhạy phản ứng. Qua ảnh điện di, 5 cặp môi phối trộn trong 2 phản ứng PCR đa môi cho phép phát hiện 3 băng DNA của 4 chủng vi khuẩn, đồng thời, độ nhạy của các đường chuẩn phát hiện đến 10 bản sao vi khuẩn (Hình 3). Như vậy, chúng tôi đã tối ưu thành công và lựa chọn hai phản ứng PCR đa môi bao gồm phản ứng 1 (*Bft-1* và *nusG*) và phản ứng 2 (*eae*, *RluA*, *SLCO2A1*).



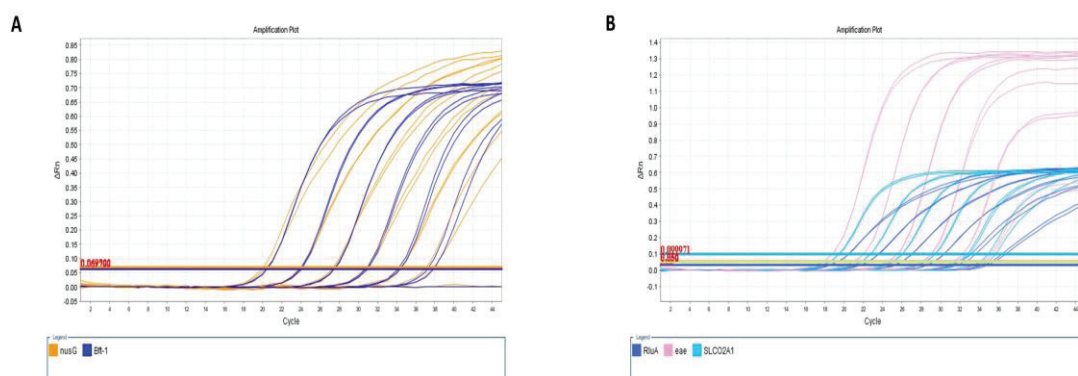
**Hình 3.** Kết quả điện di sản phẩm PCR đa môi từ mẫu đối chứng chuẩn trên gel Polyacrylamide 12%.

(Giếng B+N: Sản phẩm PCR đơn của cặp môi *Bft1* và *nusG*; giếng E+S: Sản phẩm PCR đơn của cặp môi *eae* và *SLCO2A1*. Mẫu đối chứng âm (--): Không cho khuôn DNA. TC: Thang chuẩn DNA 50bp (ThermoScientific).

### 3. Xác định hiệu suất, ngưỡng phát hiện của phản ứng qPCR đa môi

Để chứng minh 2 phản ứng qPCR đa môi đảm bảo độ tin cậy và ổn định, chúng tôi đã dựa trên các tiêu chí: (i) Hình dạng của đường cong huỳnh quang; (ii) Giá trị tuyến tính  $R^2$ , hiệu suất E thu được từ đường hồi quy tuyến tính; (iii) Giá trị  $C_t$  của đối chứng dương đã biết trước số bản sao. Từ đó, chúng tôi tiến hành xây dựng 5 đường chuẩn từ 2 phản ứng qPCR đa môi, sử dụng khuôn là các plasmid ở

các nồng độ khác nhau từ  $10^6$  - 10 bản sao; thí nghiệm được lặp lại ít nhất 10 lần. Chất lượng của các đường tín hiệu huỳnh quang của các kênh màu được kiểm tra. Hình 4 cho thấy đường cong khuếch đại của 5 gene đều ở dạng điển hình, thể hiện được sự phân tách rõ ràng các đường tín hiệu huỳnh quang tương ứng với các bậc pha loãng khác nhau. Đường threshold được sử dụng cao hơn tín hiệu nền, dưới pha bão hòa và thuộc pha lũy thừa của đường tín hiệu.



**Hình 4.** Đường cong khuếch đại của hai phản ứng qPCR đa môi.

(A) Phản ứng 1: Gene *Bft-I-Hex* và *nusG-FAM*;

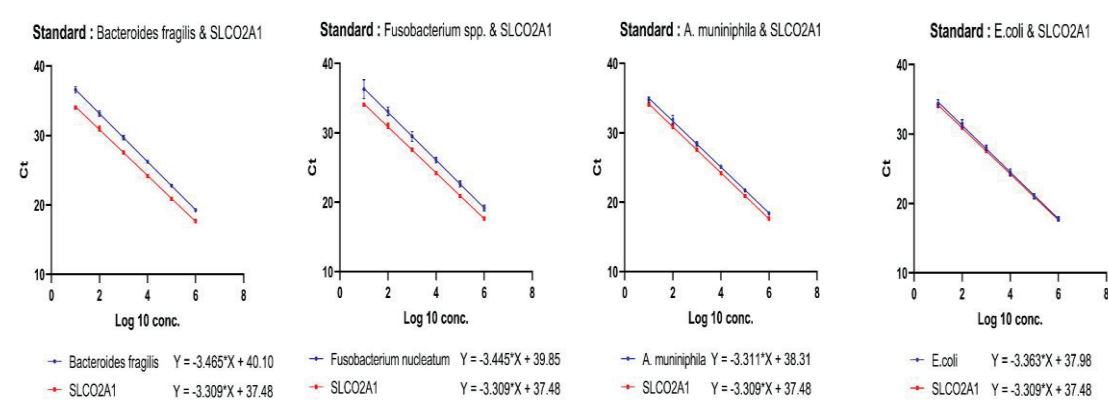
(B) Phản ứng 2: Gene *RluA-Hex*, *eae-FAM* và *SLCO2A1-Cy5*.

Các đường chuẩn được trình bày trên hình 5 có hiệu suất ổn định trong khoảng từ 90 - 105% và giá trị  $R^2 > 0,99$  (Hình 5 và Bảng 3); điều này chứng minh phản ứng qPCR có hiệu suất khuếch đại tốt và ổn định. Mỗi đường chuẩn đều đạt ngưỡng

phát hiện 10 bản sao vi khuẩn trên một phản ứng. Để xác nhận việc ghép đa môi cho phản ứng qPCR không bị ảnh hưởng đến việc khuếch đại của từng gene, chúng tôi quan tâm đến giá trị  $C_t$  của mỗi gene trong từng phản ứng đa môi. Giá trị  $C_t$  của các đường

chuẩn được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD) được trình bày trong bảng 4. Các giá trị Ct của dải nồng độ pha loãng từ plasmid (*p.Bft-1*; *p.nusG*) trong phản ứng 1; phản ứng 2 (*p.RluA*; *p.eae* và *p.SLCO2A1*) đều không chênh lệch nhau quá 0,5 Ct. Điều này, cho thấy hiệu suất khuếch đại của các gene là như nhau trong mỗi phản ứng. Dựa vào

đường chuẩn của trình tự tham chiếu *SLCO2A1* (màu đỏ - Hình 5), các mẫu có Ct  $\geq 34,1$  được coi là không đủ lượng khuôn để xác định vi khuẩn. Với đường chuẩn của *p.Bft-1*; *p.nusG*; *p.RluA* và *p.eae* cho thấy các mẫu có Ct lớn hơn lần lượt 36,6; 36,3; 34,7 và 34,4 được coi là âm tính với vi khuẩn hoặc mẫu nằm ngoài giới hạn phát hiện.



Hình 5. Đường chuẩn *Fn*, *ETBF*, *Am* và *E.coli* lần lượt được so sánh với gen *SLCO2A1*.

Bảng 3. Các thông số của đường chuẩn.

| Chỉ tiêu nghiên cứu | Hiệu suất phản ứng | Hệ số tuyến tính | Độ dốc |
|---------------------|--------------------|------------------|--------|
| <i>B. fragilis</i>  | 94,37%             | 1                | -3,465 |
| <i>Fn</i>           | 95,12%             | 0,9998           | -3,445 |
| <i>Am</i>           | 100,45%            | 0,9995           | -3,311 |
| <i>E.coli</i>       | 98,32%             | 0,9995           | -3,363 |
| <i>SLCO2A1</i>      | 100,55%            | 0,9998           | -3,309 |



**Bảng 4.** Giá trị Ct trung bình của đường chuẩn *Fn*, *ETBF*, *Am*, *E.coli* và *SLCO2A1*.

| Target          | <i>B.fragilis</i> |       |    | <i>Fn</i> |       |    | <i>Am</i> |       |    | <i>E.coli</i> |       |    | <i>SLCO2A1</i> |       |    |
|-----------------|-------------------|-------|----|-----------|-------|----|-----------|-------|----|---------------|-------|----|----------------|-------|----|
| Copy            | Ct                | SD    | n  | Ct        | SD    | n  | Ct        | SD    | n  | Ct            | SD    | n  | Ct             | SD    | n  |
| 10 <sup>6</sup> | 19,272            | 0,171 | 13 | 19,157    | 0,405 | 13 | 18,394    | 0,160 | 13 | 17,795        | 0,315 | 13 | 17,668         | 0,240 | 13 |
| 10 <sup>5</sup> | 22,796            | 0,208 | 13 | 22,639    | 0,418 | 13 | 21,702    | 0,145 | 13 | 21,074        | 0,398 | 13 | 20,893         | 0,233 | 13 |
| 10 <sup>4</sup> | 26,271            | 0,171 | 13 | 26,073    | 0,409 | 13 | 25,188    | 0,161 | 13 | 24,513        | 0,455 | 13 | 24,157         | 0,244 | 13 |
| 10 <sup>3</sup> | 29,693            | 0,332 | 13 | 29,480    | 0,699 | 13 | 28,443    | 0,337 | 13 | 27,976        | 0,407 | 13 | 27,598         | 0,194 | 13 |
| 10 <sup>2</sup> | 33,193            | 0,394 | 13 | 33,124    | 0,611 | 13 | 31,896    | 0,612 | 13 | 31,465        | 0,614 | 13 | 31,029         | 0,384 | 13 |
| 10              | 36,602            | 0,454 | 12 | 36,297    | 1,373 | 12 | 34,791    | 0,369 | 12 | 34,408        | 0,535 | 12 | 34,059         | 0,203 | 10 |

#### 4. Khảo sát tải lượng vi khuẩn trên mẫu phẩm

Với điều kiện đã được tối ưu, chúng tôi tiến hành định lượng vi khuẩn ở 100 mẫu mô UTĐTT. Sử dụng cho phản ứng qPCR đa môi, chúng tôi thu được tỷ lệ dương tính *Fn*, *ETBF*, *Am* và *E.coli* lần lượt là 61%, 60%, 44% và 39% ở BN UTĐTT. So sánh với các công bố trước đây, tỷ lệ này tương đồng với các quốc gia châu Á như Malaysia, Trung Quốc, Iran [6, 7, 8].

#### KẾT LUẬN

Thiết kế được bốn plasmid tái tổ hợp (*Bft-1*, *nusG*, *eae*, *RluA*) nhằm định lượng vi khuẩn *Fn*, *ETBF*, *Am* và *E.coli*. Xây dựng và tối ưu các thông số của đường chuẩn (hệ số tuyến tính R<sup>2</sup>, hiệu suất khuếch đại E) phản ứng qPCR đa môi, ngưỡng phát hiện đạt 10 bản sao trên một phản ứng, với hệ số tuyến tính R<sup>2</sup> > 0,99; hiệu suất phản ứng > 94% và có thể sử dụng làm đối chứng chuẩn để phân tích trên mẫu bệnh phẩm. Khảo sát 100 mẫu mô UTĐTT thấy tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Fn*, *ETBF*, *Am* và *E.coli* lần lượt là 65%, 66%, 62% và 36%. Kết quả này bước

đầu cho thấy những thay đổi của hệ vi sinh vật có tiềm năng trở thành dấu ấn sinh học để phát hiện sớm UTĐTT.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Morgan E, Arnold M, Gini A, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. 2022; 72(2):338-344. DOI:10.1136/gutjnl-2022-327736
2. Pandey H, Tang DWT, Wong SH, Lal D. Gut Microbiota in colorectal cancer: Biological role and therapeutic opportunities. *Cancers (Basel)*. 2023; 15(3). DOI:10.3390/CANCERS15030866

3. Wang Q, Ye J, Fang D, et al. Multi-omic profiling reveals associations between the gut mucosal microbiome, the metabolome, and host DNA methylation associated gene expression in patients with colorectal cancer. *BMC Microbiol.* 2020; 20(1). DOI:10.1186/S12866-020-01762-2
4. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* 2016; 14(8). DOI:10.1371/JOURNAL.PBIO.1002533
5. Zhou Y, He H, Xu H, et al. Oncotarget 80794 www.impactjournals.com/oncotarget Association of oncogenic bacteria with colorectal cancer in South China. *Oncotarget.* 2016; 7(49):80794-80802. www.impactjournals.com/oncotarget/
6. Osman MA, Neoh H min, Ab Mutalib NS, et al. Parvimonas micra, Peptostreptococcus stomatis, Fusobacterium nucleatum and Akkermansia muciniphila as a four-bacteria biomarker panel of colorectal cancer. *Sci Rep.* 2021; 11(1):1-12. DOI:10.1038/s41598-021-82465-0
7. Shariati A, Razavi S, Ghaznavi-Rad E, et al. Association between colorectal cancer and Fusobacterium nucleatum and Bacteroides fragilis bacteria in Iranian patients: A preliminary study. *Infect Agent Cancer.* 2021; 16(1):1-10. DOI:10.1186/s13027-021-00381-4
8. Tran HNH, Thu TNH, Nguyen PH, et al. Tumour microbiomes and Fusobacterium genomics in Vietnamese colorectal cancer patients. *npj Biofilms Microbiomes* 2022 81. 2022; 8(1):1-13. DOI:10.1038/s41522-022-00351-7
9. Tran CT Du, Nguyen MVT, Tran MT, et al. Findings from the first colorectal cancer screening among 103 542 individuals in Vietnam with systematic review of colorectal cancer screening programs in Asia-Pacific region. *Jpn J Clin Oncol.* 2022; 52(7):699-707. DOI:10.1093/JJCO/HYAC043
10. Hou Y, Zhang H, Miranda L, Lin S. Serious overestimation in quantitative pcr by circular (supercoiled) plasmid standard: Microalgal pcna as the Model Gene. *PLoS One.* 2010; 5(3):e9545. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0009545