



KỸ THUẬT REALTIME RT-PCR TRONG CHẨN ĐOÁN COVID-19



ThS. Phan Văn Hiếu

www.qcc.edu.vn

NỘI DUNG

1. Phương pháp gộp mẫu
2. Kỹ thuật Realtime RT-PCR



Gộp mẫu

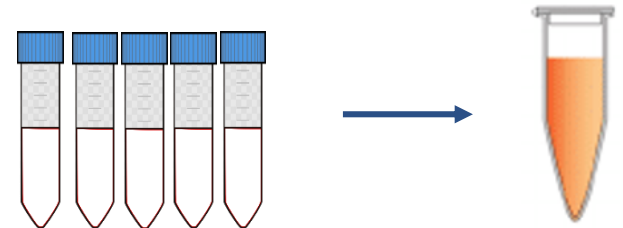
❖ Gộp que:

- Không bị ảnh hưởng bởi việc pha loãng mẫu
- Khi mẫu gộp dương tính, phải lấy lại mẫu đơn lẻ

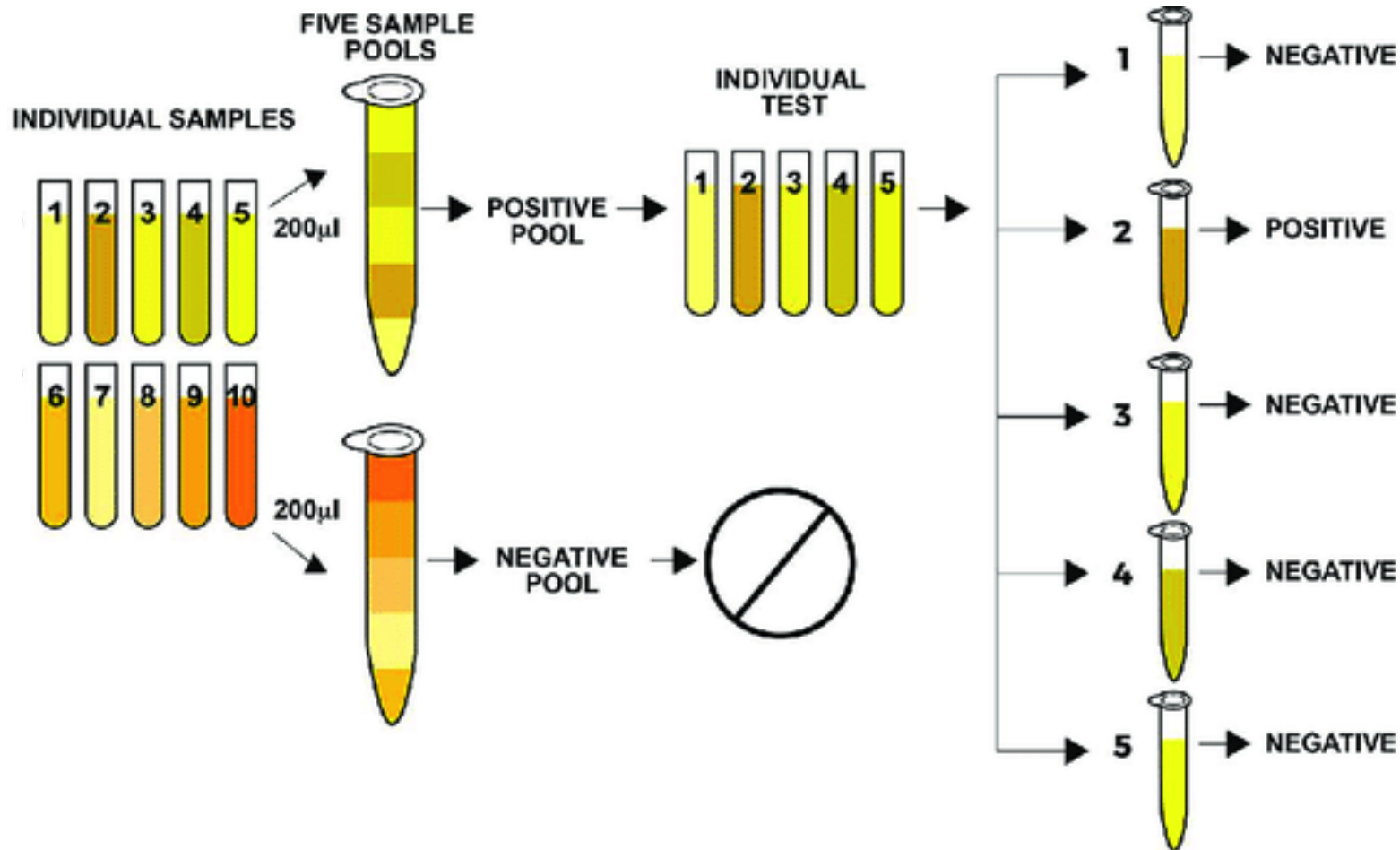


❖ Gộp mẫu:

- Có thể không phát hiện được mẫu dương tính yếu
- Khi mẫu gộp dương có thể thực hiện XN lại các mẫu lẻ ngay



Gộp mẫu



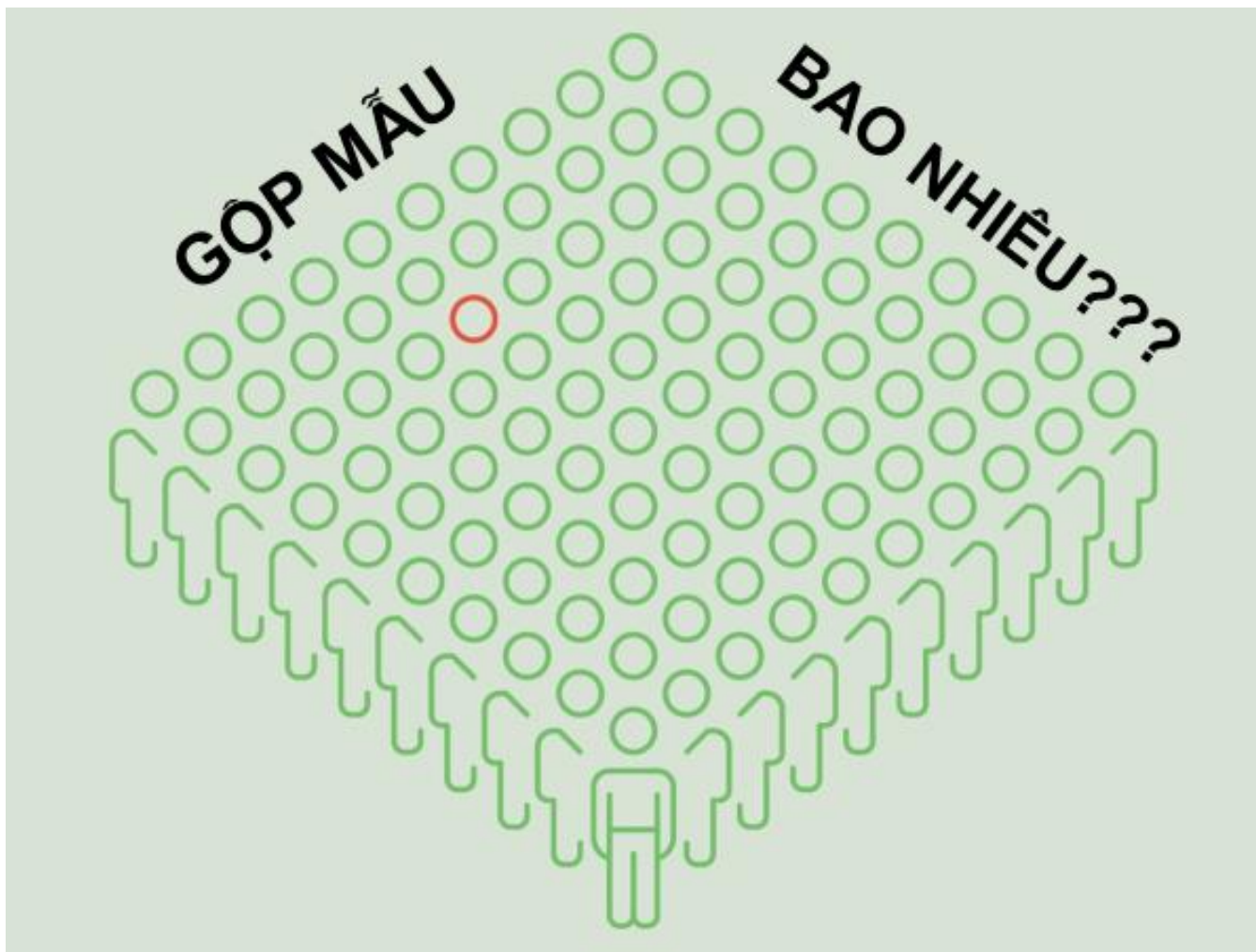
Gộp mẫu

Gộp mẫu khi nào?

Áp dụng	Không áp dụng
<ul style="list-style-type: none">➤ Giám sát dịch tễ tại cộng đồng.➤ Nhóm nguy cơ thấp.➤ Sử dụng kỹ thuật RT-PCR.	<ul style="list-style-type: none">➤ TH có triệu chứng, có nguy cơ cao.➤ BN COVID đang điều trị.



Gộp mẫu



Gộp mẫu

- ❖ Theo QĐ 1817/QĐ-BYT ngày 07/04/2021
- Số lượng mẫu gộp từ 5-10 mẫu
- Căn cứ vào tình hình dịch bệnh, tỷ lệ dương tính
- Độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp



Gộp mẫu

❖ Nguồn FDA

- Christopher Bilder – Trường đại học Nebraska – Hoa Kỳ đã xây dựng trang web

R-based, xác định cỡ mẫu tối ưu dựa trên tỷ lệ nhiễm bệnh (tỷ lệ dương tính), độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp xét nghiệm
<https://bilder.shinyapps.io/PooledTesting/>



Gộp mẫu

(Tiếp)

Tỷ lệ nhiễm (%)	Cỡ mẫu gộp tối ưu*	Giá trị Ct thay đổi lý thuyết theo $\log_2(n)$ **	Số xét nghiệm giảm (%)
1	11	3.46	80
3	6	2.58	67
5	5	2.32	57
7	4	2.00	50
10	4	2.00	41
15	3	1.58	28

* Dựa trên Phương pháp có độ nhạy 95%, độ đặc hiệu 100%, và chiến lược xét nghiệm gộp mẫu (Dorfman approach)

** Ct (giá trị ngưỡng) là số chu kỳ được tạo ra. Giá trị Ct thay đổi về mặt lý thuyết theo $\log_2(n)$ n = số mẫu gộp, có thể được ước tính cho hầu hết các kỹ thuật real-time RT-PCR



Gộp mẫu

❖ Lưu ý

- Không gộp các loại mẫu khác nhau.
- PXN phải thực hiện thẩm định phương pháp trước khi tiến hành gộp mẫu.
- Chỉ áp dụng cho RT-PCR.



Kỹ thuật Realtime RT-PCR chẩn đoán COVID-19



Tách chiết RNA

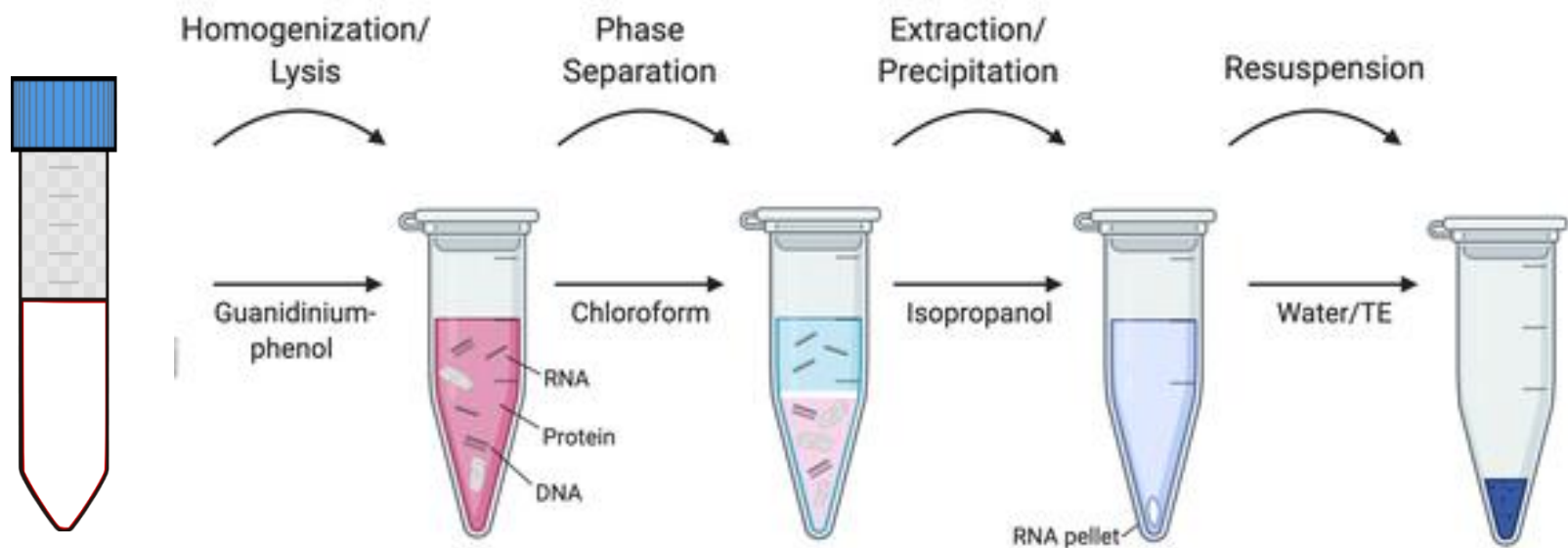
❖ Một số phương pháp tách chiết:

- Phenol-Chloroform
- Tách cột
- Tách bằng hạt từ



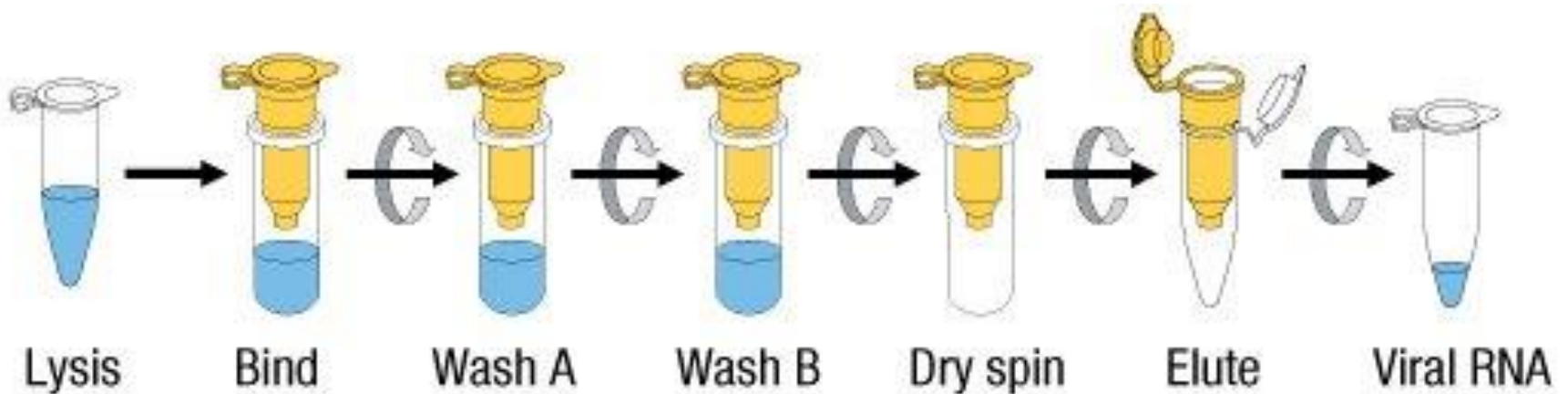
Tách chiết RNA

❖ Tách bằng Phenol-Chloroform



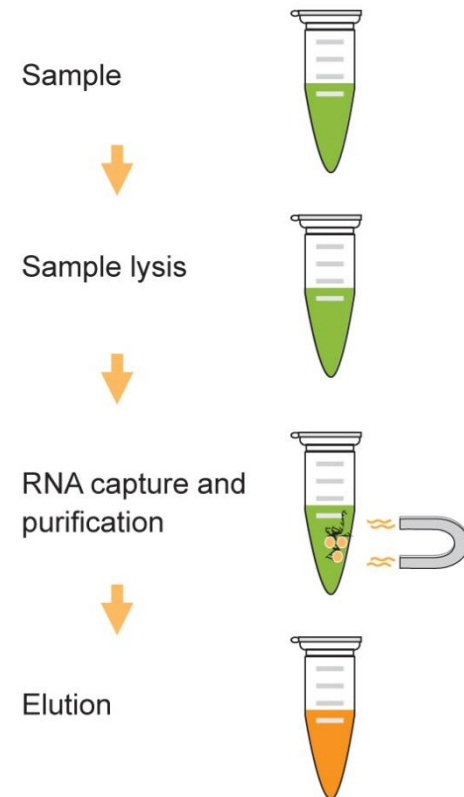
Tách chiết RNA

❖ Tách cột



Tách chiết RNA

❖ Tách hạt từ (thực hiện trên máy tự động)

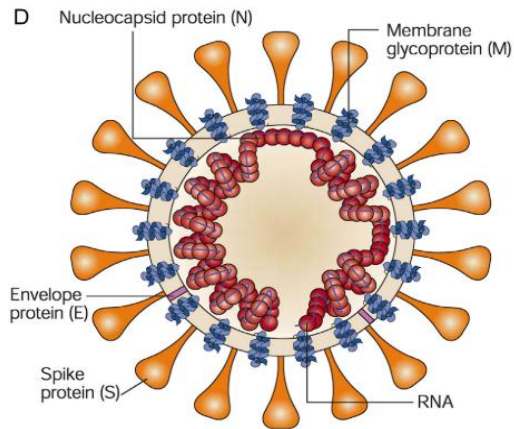


Lưu ý

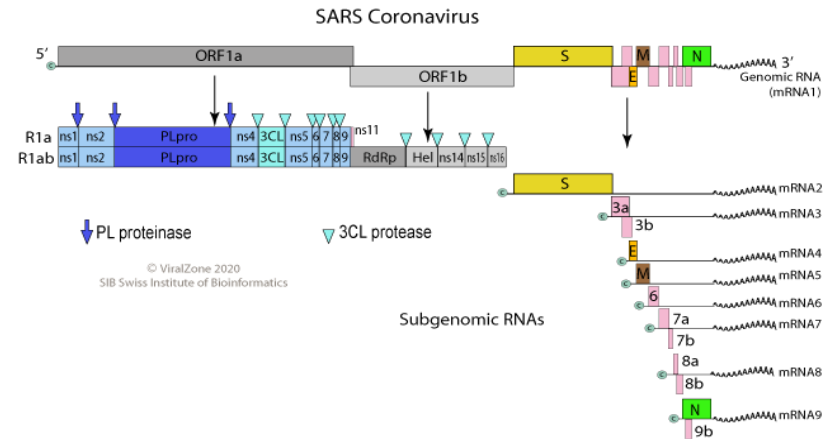
- Tuân thủ quy trình.
- Thực hiện trong tủ ATSH.
- Xếp mẫu theo size pool và giữ nguyên thứ tự cho đến khi có kết quả.
- Đánh mã tránh sai sót thông tin.



Cấu tạo và bộ gen SARS-CoV-2



- Chứa 4 protein cấu trúc chính; protein gai (S), protein màng (M), protein vỏ (E), và nucleocapsid (N)



- Bộ gen RNA sợi đơn dương tính, không phân đoạn ~30 kb.
- Mã hóa 4 protein cấu trúc và từ 3 đến 10 protein không cấu trúc, gồm polymerase RNA phụ thuộc vào RNA (RdRp)

Các hình thức xét nghiệm SARS-CoV-2

Nuôi cấy virus

- Dùng cho chẩn đoán và nghiên cứu
- Phát hiện virus sống
- Phòng ATSH cấp 3

SHPT

- Chẩn đoán bệnh
- Phát hiện vật chất di truyền SARS-CoV-2

Kháng nguyên

- Chẩn đoán bệnh
- Phát hiện sự có mặt của virus SARS-CoV-2

Kháng thể

- Không dùng để chẩn đoán
- Phát hiện sự có mặt của kháng thể kháng virus SARS-CoV-2



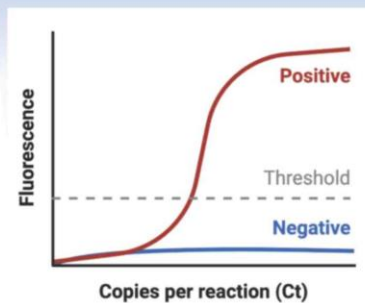
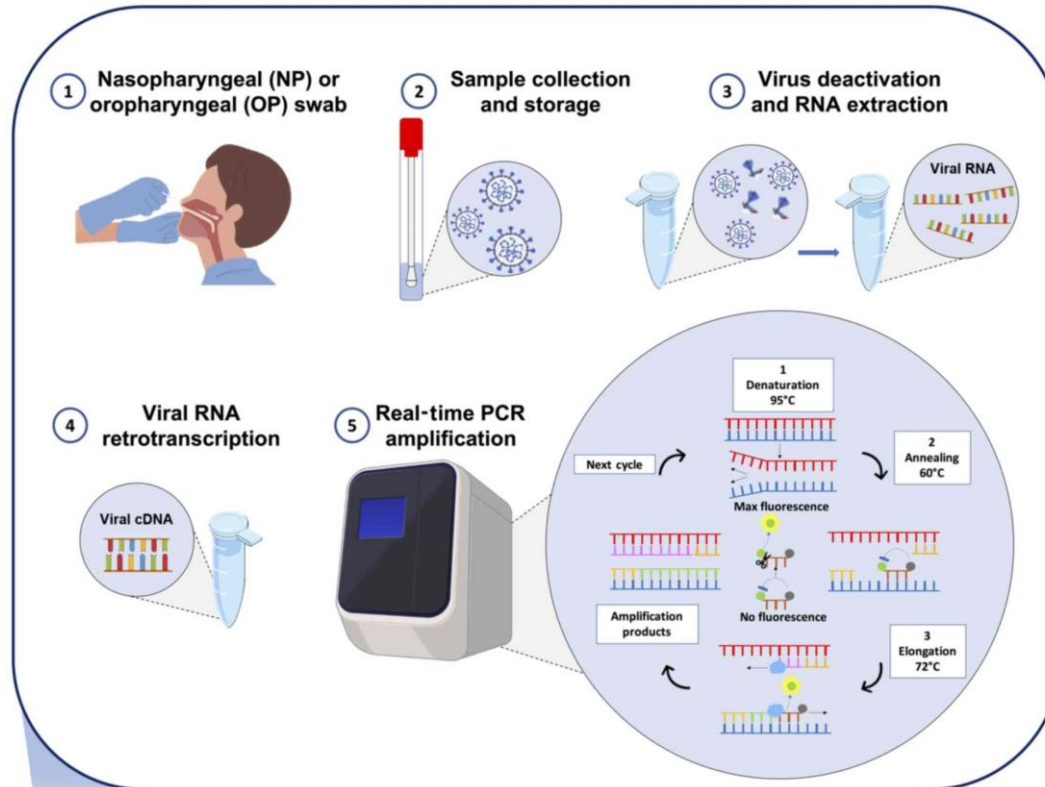
Xét nghiệm RT-PCR

❖ Realtime RT–PCR

- Là sự kết hợp 2 quá trình: phiên mã ngược (RT) và PCR.
- Quá trình phiên mã ngược: tạo ra được số lượng cDNA (DNA bổ sung) bằng số phân tử RNA ban đầu.
- Quá trình PCR tiếp đó sẽ khuếch đại số lượng cDNA tạo thành.
- Phát hiện vật liệu di truyền của SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm nhằm chẩn đoán bệnh.



Xét nghiệm RT-PCR



6 RT-PCR results

Xét nghiệm RT-PCR

Ưu điểm	Hạn chế
<ul style="list-style-type: none">➤ Độ nhạy và độ đặc hiệu cao➤ Xét nghiệm nhiều mẫu cùng lúc➤ PP khuyến cáo để khẳng định SARS-CoV-2	<ul style="list-style-type: none">➤ Cần phòng xét nghiệm chuyên biệt➤ Đào tạo nhân lực➤ Chi phí cao➤ Thời gian dài: 6-8 tiếng

Các yếu tố ảnh hưởng

I. Số lượng, chất lượng các thành phần:

1. Khuôn

- ❖ Nồng độ: Khuyến cáo 50-100 ng/ μ l
- ❖ Nồng độ cao quá: lãng phí, có thể gây ức chế phản ứng
- ❖ Nồng độ thấp quá: không đủ để khuếch đại
- ❖ Chất lượng: Đảm bảo không lẫn các chất ức chế phản ứng hay RNA ngoại lai khác



Các yếu tố ảnh hưởng

2. Mồi (Primers)

- ❖ Nồng độ: Hai mồi phải có nồng độ tương đương nhau
- ❖ Nồng độ cao quá: có thể hình thành nhiều sản phẩm phụ không mong muốn
- ❖ Nồng độ thấp quá: không đủ để khuếch đại cDNA



Các yếu tố ảnh hưởng

3. Enzym *Taq* polymerase

4. Dung dịch đệm (Buffer): Tris-HCL, KCl, Mg²⁺

5. dNTPs

- ❖ 4 loại dNTP phải có nồng độ bằng nhau, khoảng 50-200uM
- ❖ Nồng độ cao: ảnh hưởng độ chính xác của *Taq* polymerase
- ❖ Nồng độ thấp: Giảm hiệu suất phản ứng.



Các yếu tố ảnh hưởng

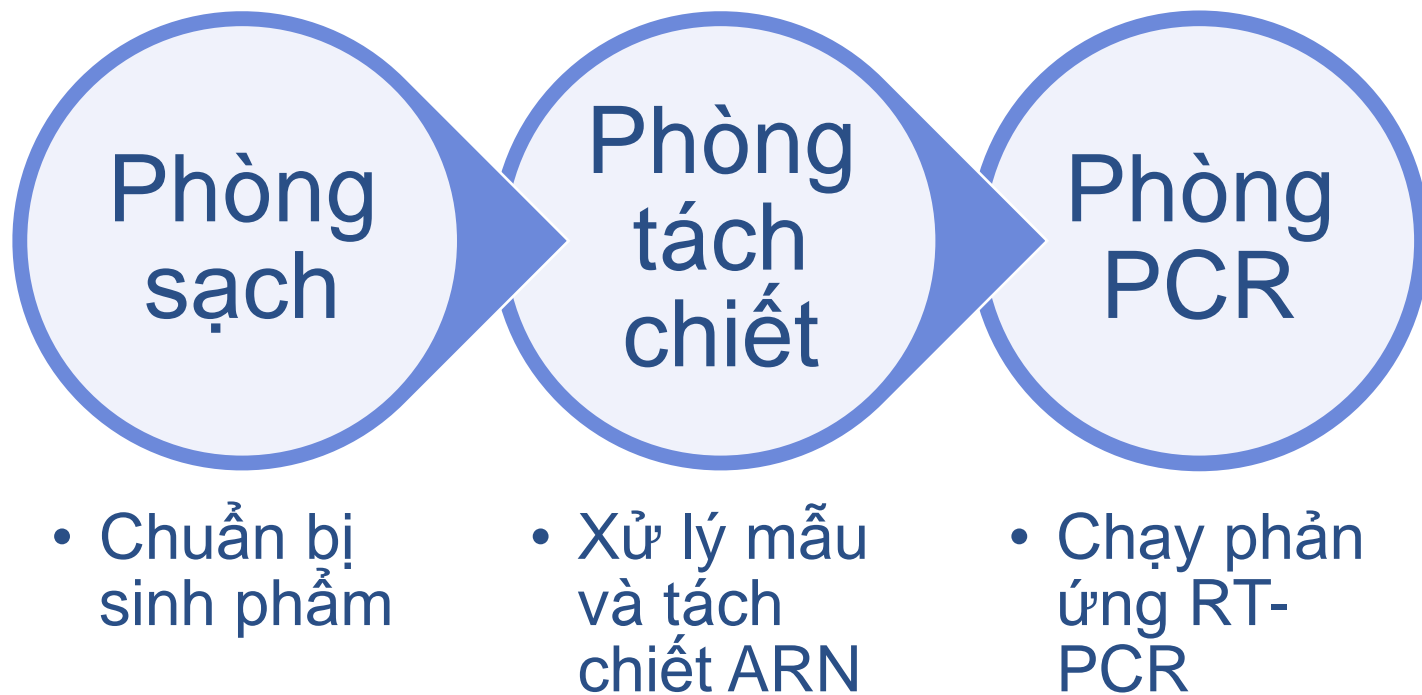
II. Chu trình nhiệt

PCR	RT-PCR
1. Biến tính: 90-95 ⁰ C	1. Phiên mã ngược: 50 ⁰ C
2. Gắn mồi: 55-60 ⁰ C	2. Biến tính: 90-95 ⁰ C
3. Kéo dài: 72 ⁰ C	3. Gắn mồi, kéo dài: 55-60 ⁰ C
4. Số chu kỳ: 40-45	4. Số chu kỳ: 40-45



Kiểm soát chất lượng

I. Bố trí PXN



Kiểm soát chất lượng

II. Chuẩn bị sinh phẩm

- ❖ Khu vực sạch, không có khả năng lây nhiễm.
- ❖ Mặc trang phục bảo hộ phù hợp.
- ❖ Không mặc PPE hay áo choàng ở phòng chiết tách, chạy máy vào khu vực này.
- ❖ Không làm cùng với mẫu bệnh phẩm, chứng dương



Kiểm soát chất lượng

III. Mix mẫu

- ❖ Tủ ATSH hoặc box chuyên dụng.
- ❖ Pipet hiệu chuẩn.
- ❖ Găng tay mới, không bột.
- ❖ Mix giữ ở khay lạnh hoặc đá đang tan, lấy đủ số lượng rồi cất lại ngay.
- ❖ Tránh tạo bọt. Ly tâm sau khi mix.
- ❖ Mix chứng dương sau cùng, tốt nhất thực hiện ở khu vực riêng biệt.
- ❖ Sử dụng ống mix phù hợp.
- ❖ Đánh mã và cài đặt thông tin tránh sai sót.



Kiểm soát chất lượng

IV. Các loại mẫu chứng

1. Chứng âm tách: Mẫu nước tinh sạch/MT vận chuyển được tách chiết như mẫu BN.

2. Chứng âm PCR: Mẫu nước tinh sạch được cho vào MasterMix (làm khuôn thay thế khuôn DNA thử).



Kiểm soát chất lượng

IV. Các loại mẫu chứng

4. Chứng dương: Mẫu DNA đã cho kết quả chắc chắn dương tính.

5. Chứng nội chuẩn:

- ❖ Là một đoạn gen được khuếch đại song song với gen đích.
- ❖ Thường là các gen giữ nhà: Rnase, GADPH, beta-actin, 18S rARN.
- ❖ Đánh giá quá trình lấy mẫu, tách chiết, PCR và loại bỏ âm tính giả.



Kiểm soát chất lượng

V. Tham gia ngoại kiểm

- ❖ Đánh giá khách quan từ bên thứ 3.
- ❖ Một số tổ chức: CAP, CMPT, UKNEQAS, RIQAS.
- ❖ Điều kiện cần để công nhận PXN khẳng định SARS-CoV-2.

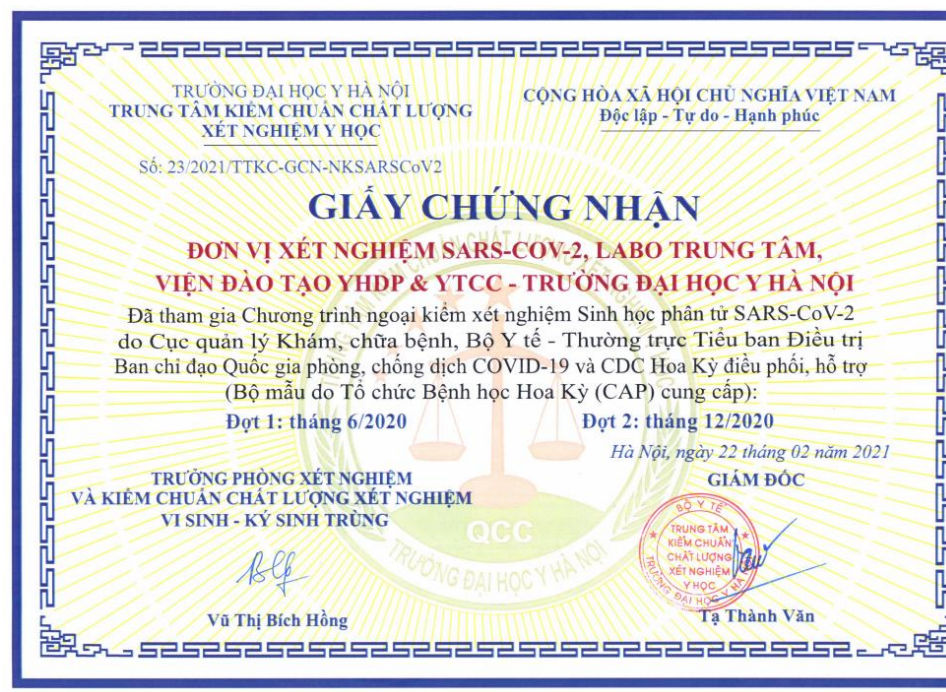


Kiểm soát chất lượng

V. Tham gia ngoại kiểm

❖ Chương trình do QCC-CDC-Cục QLKCB:

- Nguồn mẫu: CAP
- Năm 2020: 80 PXN
tỷ lệ đạt gần 100%.
- Năm 2021: 150 PXN



Kiểm soát chất lượng

V. Tham gia ngoại kiểm

❖ QCC triển khai năm 2022

- Sinh học phân tử
- Kháng nguyên
- Kháng thể



Phiên giải kết quả

- ❖ Đọc kết quả chứng nội (HEX). Nếu đạt mới thực hiện các bước phiên giải kết quả tiếp theo. Nếu không đạt tách lại/lấy lại mẫu để thực hiện lại.

Trường hợp	Chứng âm	Chứng dương	Mẫu	Kết luận
1	-	+	+	Dương tính
2	-	+	-	Âm tính
3	-	-	-	Hồng, thực hiện lại
4	+	+/-	+/-	Nhiễm, thực hiện lại



Xử lý sự cố

1. Chứng nội không đạt

- ❖ Không thu được ARN do kỹ thuật lấy mẫu/tách
- ❖ Kiểm tra chất lượng hóa chất, sinh phẩm, quy trình.
- ❖ Tách lại mẫu và thực hiện lại phản ứng.

2. Chứng dương cho kết quả âm tính/mẫu âm tính giả

- ❖ Hóa chất, sinh phẩm/máy hỏng
- ❖ Kiểm tra hóa chất, sinh phẩm/thiết bị..
- ❖ Chạy lại phản ứng sau khi xử lý nguyên nhân



Xử lý sự cố

3. Chứng âm cho kết quả dương tính hoặc mẫu dương tính giả

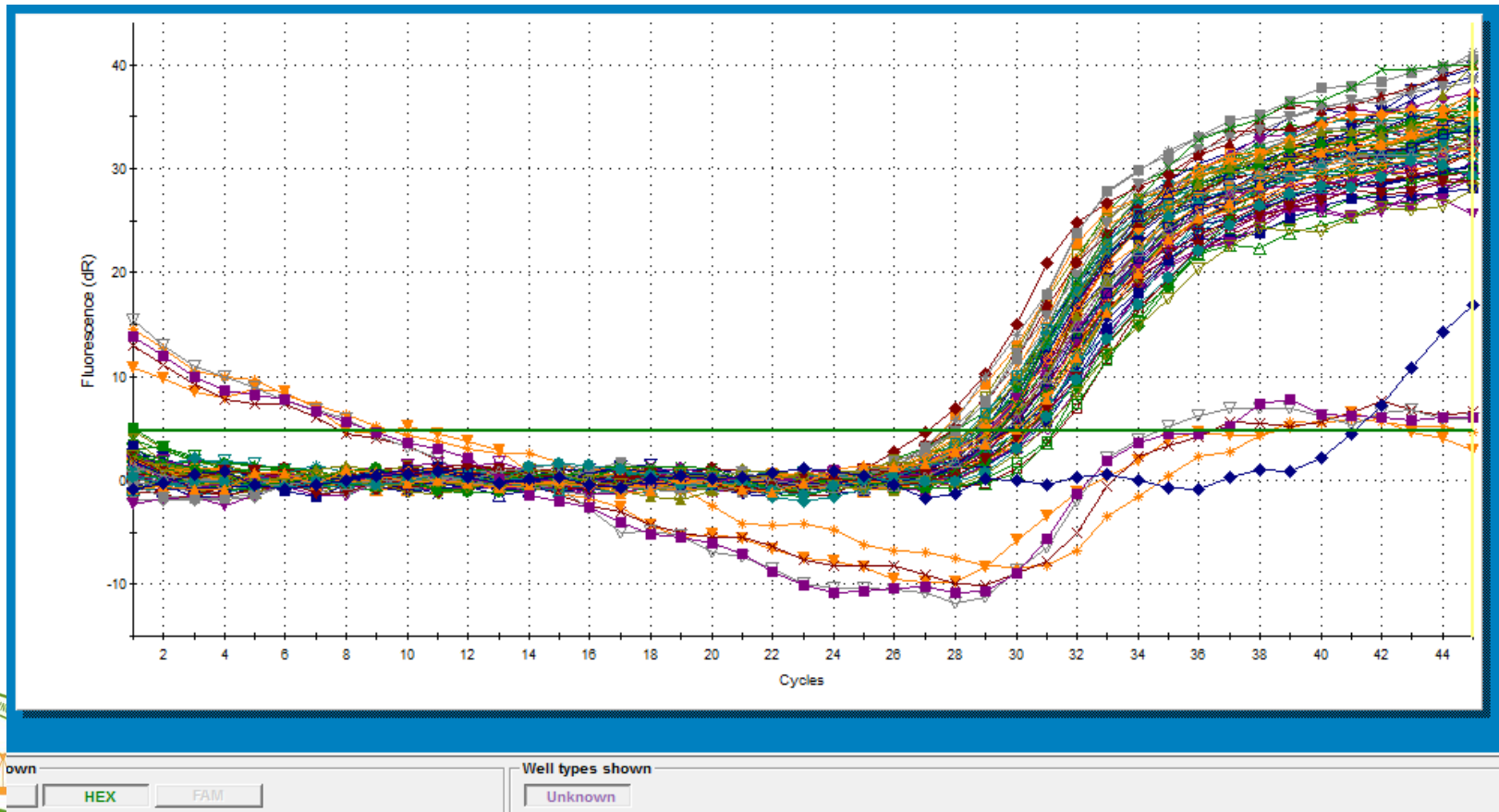
- ❖ Có khả năng bị ngoại nhiễm/nhiễm chéo.
- ❖ Kiểm tra lại hóa chất, sinh phẩm, quy trình.
- ❖ Kiểm tra acid nucleic tồn dư tại các nơi có nguy cơ
- ❖ Cần thực hiện nghiêm ngặt công tác khử nhiễm (Chiếu UV, Javel)



Xử lý sự cố

4. Một số ví dụ sự cố thường gặp

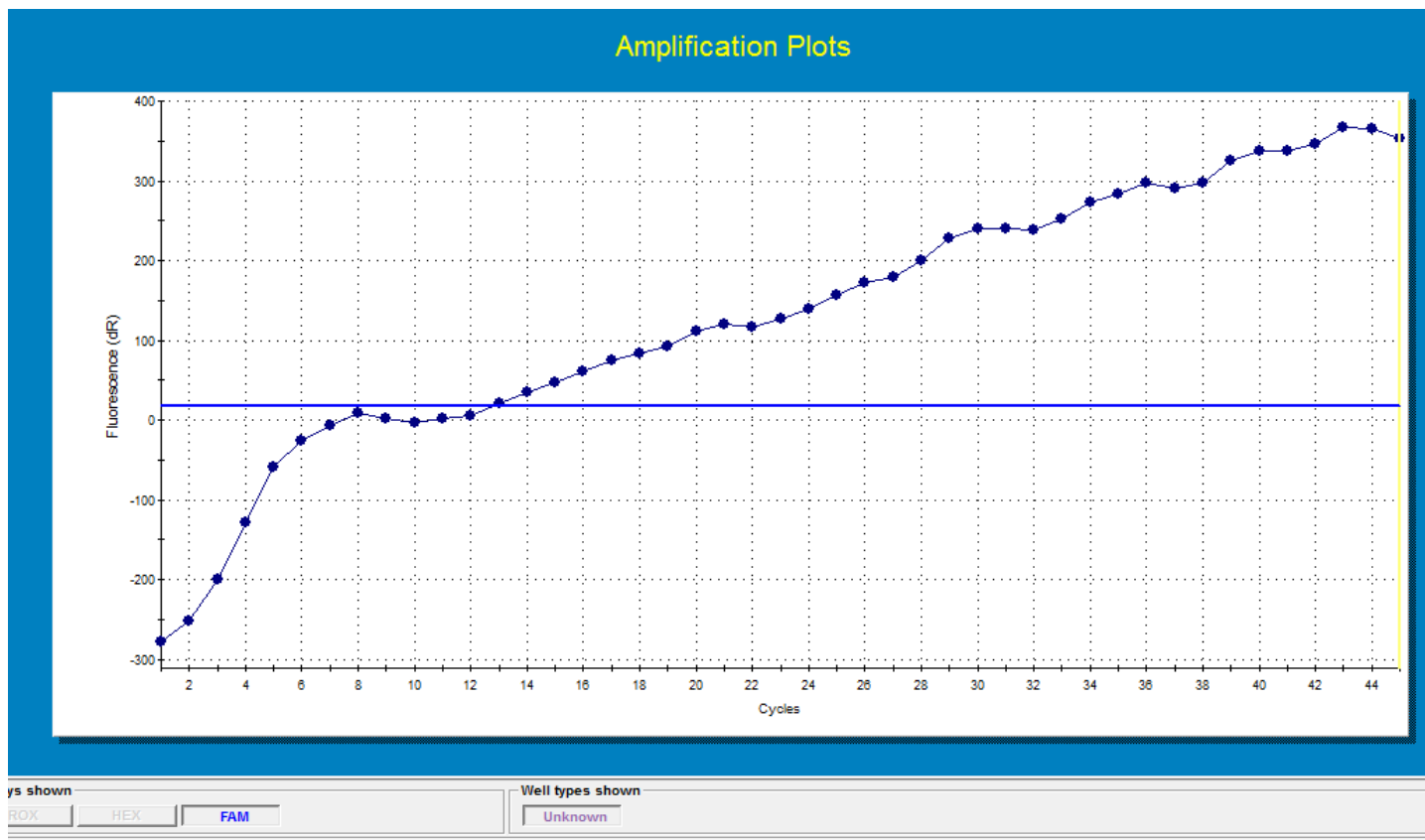
❖ Chứng nội không đạt



Xử lý sự cố

4. Một số ví dụ sự cố thường gặp

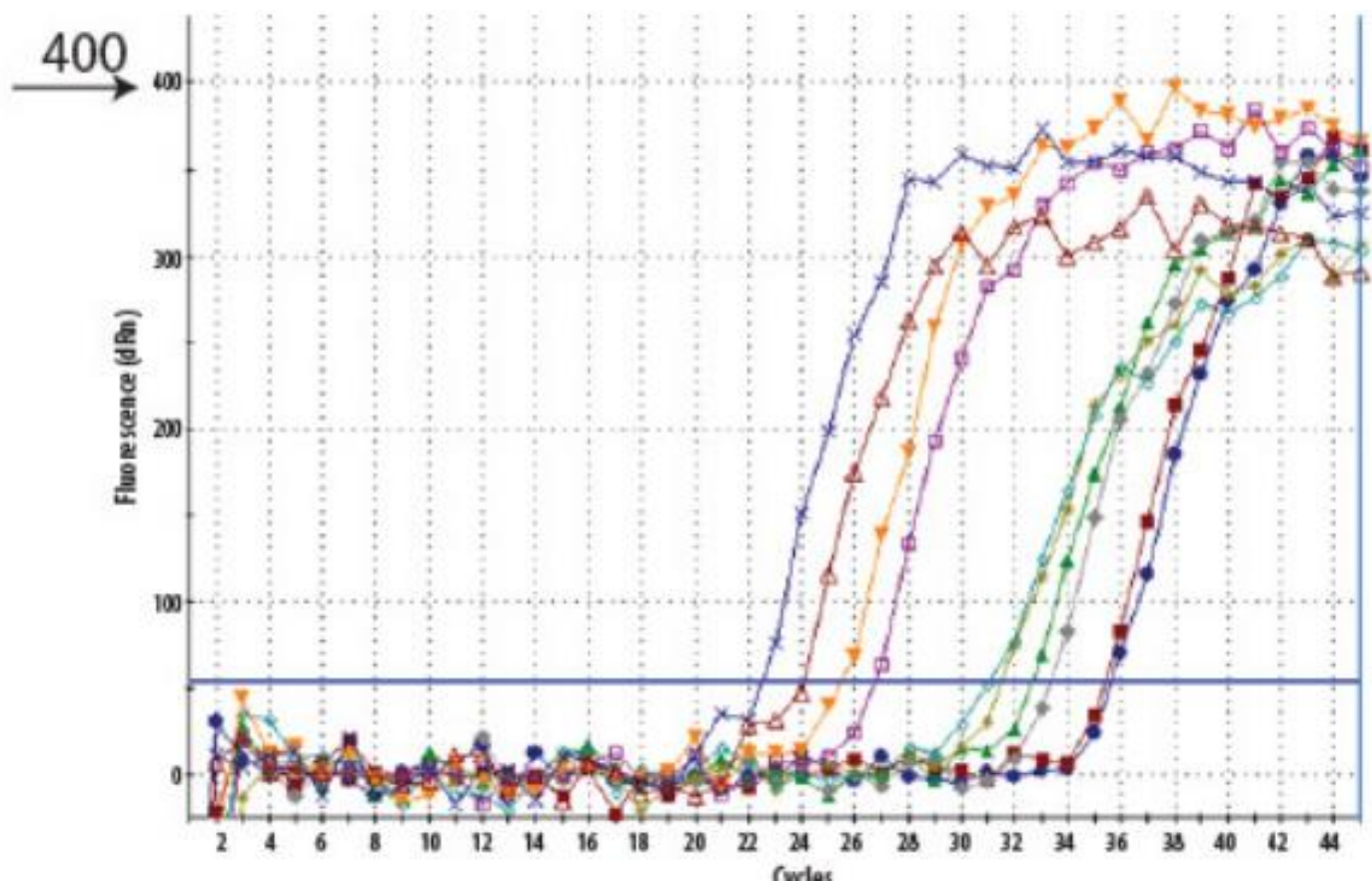
❖ Tín hiệu nhiễu (dù Ct bé)



Xử lý sự cố

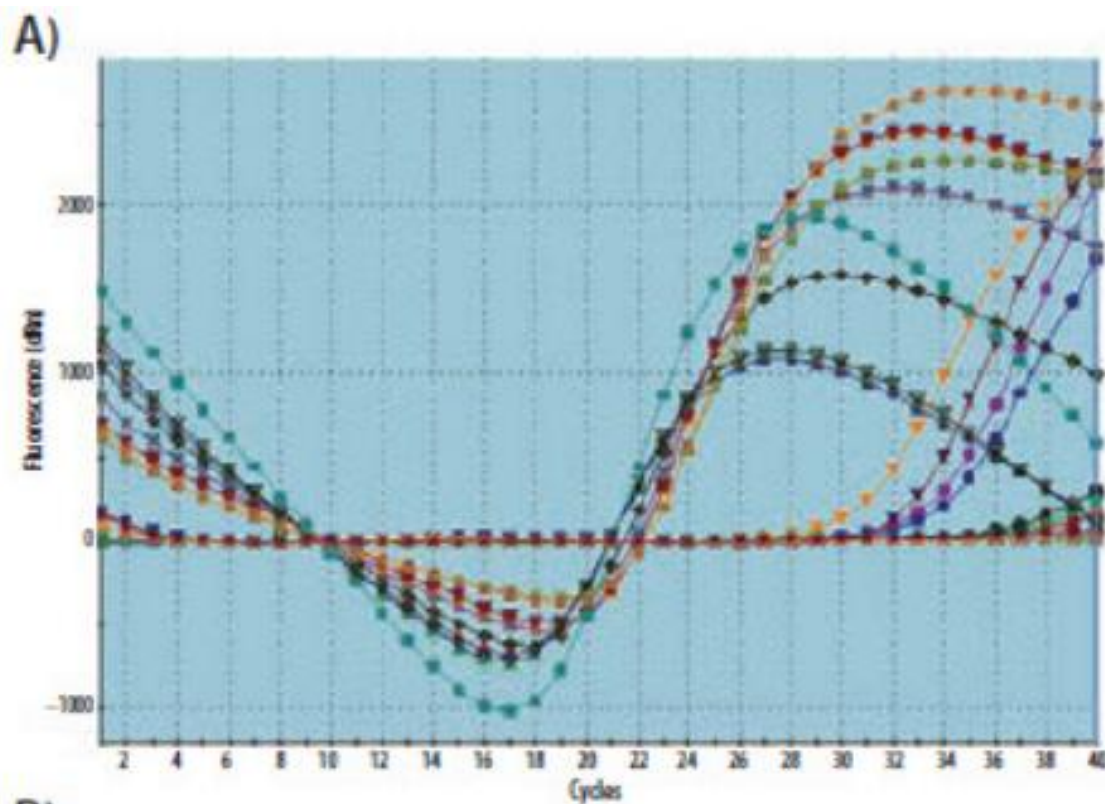
4. Một số ví dụ sự cố thường gặp

❖ Tín hiệu nhiễu



Xử lý sự cố

4. Một số ví dụ sự cố thường gặp



Một số quy trình chẩn đoán

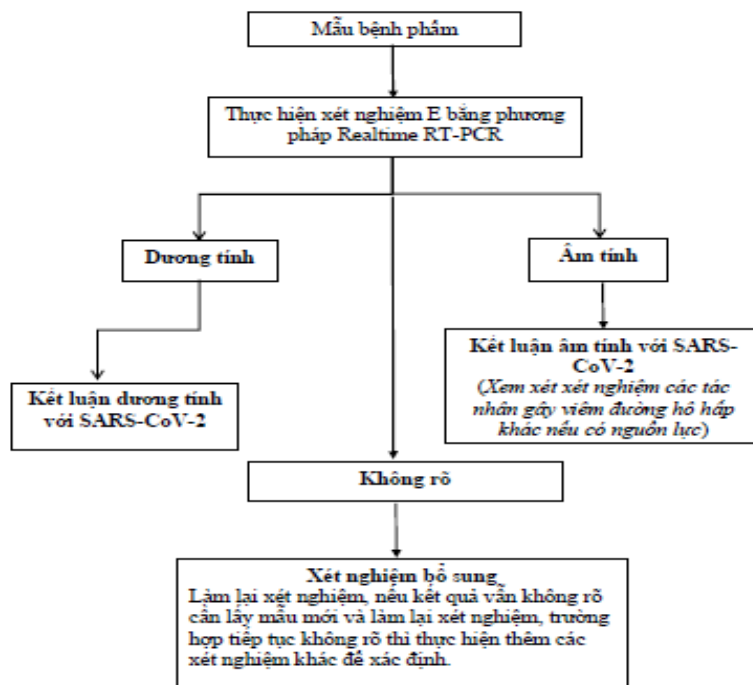
Quốc gia	Gene targets
US-CDC	N1, N2
Đức-Charite Berlin	E
Trung Quốc-CDC	ORF1ab and N
Hong Kong	ORF1b-nsp14, N
Nhật Bản	N, E, RdRp, S
Thái Lan	N
Pháp	RdRp



Ví dụ sơ đồ quy trình xét nghiệm

PHỤ LỤC 2

(Ban hành kèm theo Quyết định số 4042/QĐ-BYT ngày 21/09/2020 của Bộ Y tế)
1. Sơ đồ quy trình xét nghiệm Realtime RT-PCR theo Charite Berlin (một trong các quy trình được WHO khuyến cáo)

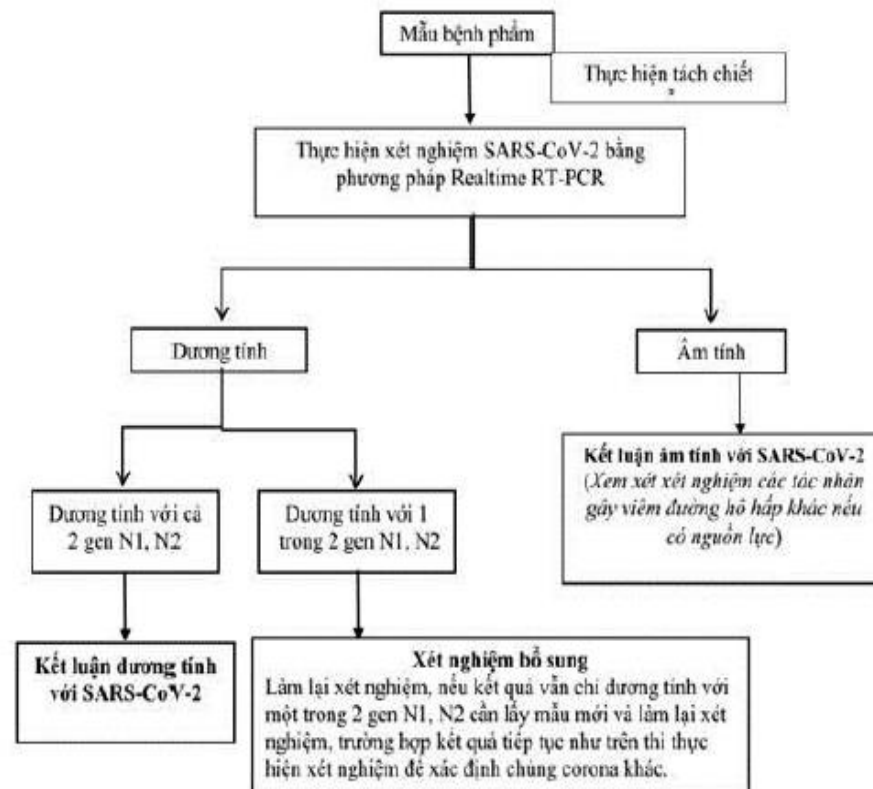


* Sơ đồ trên mang tính tham khảo, các đơn vị dựa trên khuyến cáo của WHO và tình hình thực tế để xây dựng quy trình kỹ thuật cụ thể tại đơn vị đảm bảo chất lượng xét nghiệm



Ví dụ sơ đồ quy trình xét nghiệm

2. Sơ đồ quy trình xét nghiệm Realtime RT-PCR theo CDC Hoa Kỳ khuyến cáo



◆ **KHẨU TRANG**

◆ **KHÔNG TỤ TẬP**

◆ **KHOẢNG CÁCH**



◆ **KHỬ KHUẨN**

◆ **KHAI BÁO Y TẾ**

Khi có dấu hiệu sốt, ho, khó thở

gọi ngay

19009095

hoặc cơ quan y tế địa phương để được hướng dẫn
đi khám bệnh an toàn

HÃY GIỮ AN TOÀN CHO BẠN VÀ CHÚNG TA TRƯỚC ĐẠI DỊCH COVID 19

TRÂN TRỌNG CẢM ƠN!

