



TRUNG TÂM KIỂM CHUẨN CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM Y HỌC  
- TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

# TÁCH CHIẾT RNA VIRUS SARS-CoV-2

ThS.BSNT.Lê Vũ Huyền Trang

# MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên lý chung của tách chiết RNA.
2. Trình bày được một số phương pháp tách chiết RNA virus SARS-CoV-2 được sử dụng phổ biến.



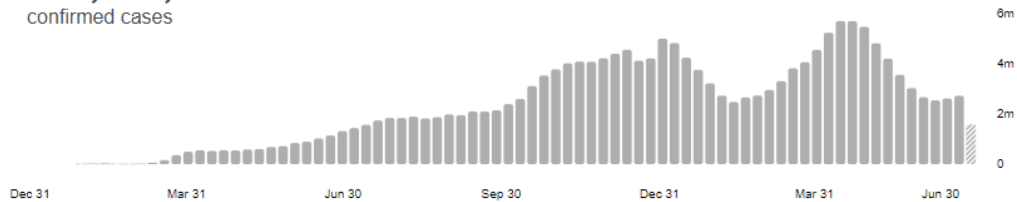
# BỆNH COVID 19

❖ COVID 19 là bệnh truyền nhiễm do virus SARS-CoV-2 (Betacoronavirus) gây ra.

Globally, as of 6:18pm CEST, 8 July 2021, there have been **184.820.132 confirmed cases** of COVID-19, including **4.002.209 deaths**, reported to WHO. As of **7 July 2021**, a total of **3.032.217.959 vaccine doses** have been administered.

## Global Situation

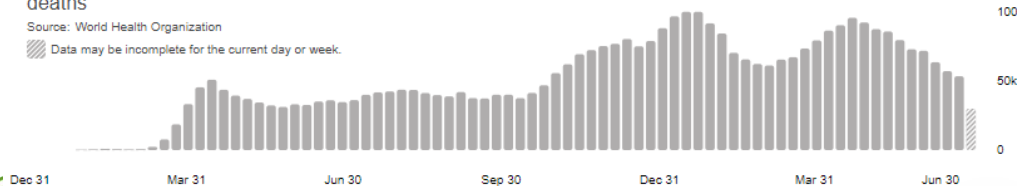
**184,820,132**  
confirmed cases



**4,002,209**  
deaths

Source: World Health Organization

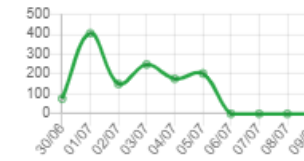
Data may be incomplete for the current day or week.



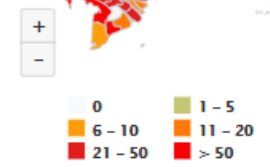
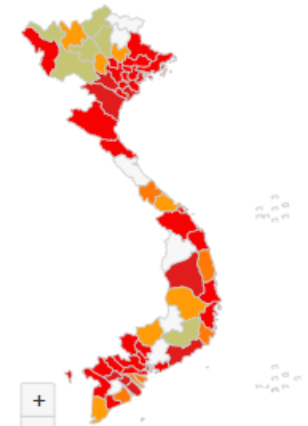
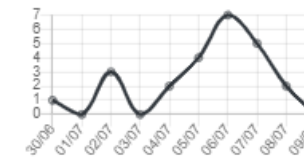
## Số ca nhiễm



## Số ca phục hồi



## Số ca tử vong



## VIỆT NAM

SỐ CA NHIỄM  
**21.560**

ĐANG ĐIỀU TRỊ  
**13.430**

KHỎI  
**8.022**

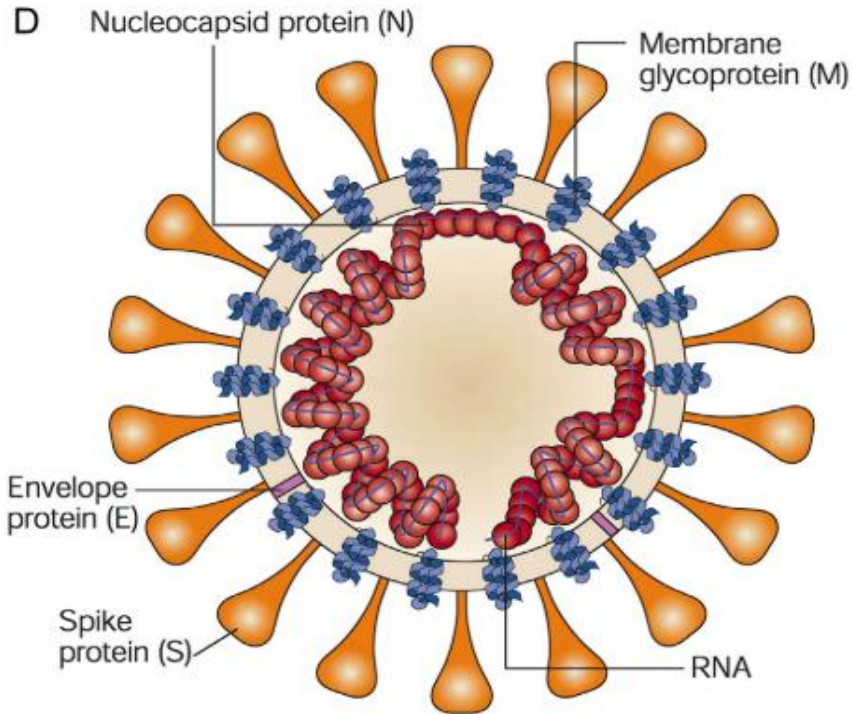
TỬ VONG  
**104**

<https://covid19.who.int/>

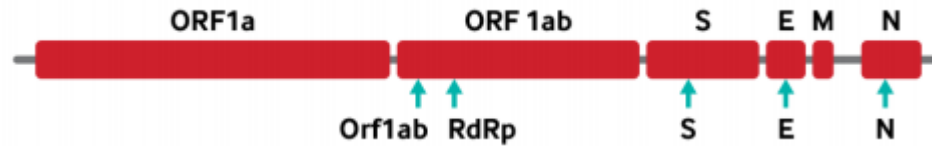
<https://ncov.moh.gov.vn/>



# TỔNG QUAN VỀ VIRUS SARS-COV-2



Cấu trúc coronaviruses



Các gen đích cho phản ứng RT-PCR



SARS - beginning to understand a new virus,  
*Nature Reviews Microbiology* (2003)

Understanding cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR, *Public Health England* (2020)

# ĐƯỜNG LÂY NHIỄM



\* Transmission routes involving a combination of hand & surface = indirect contact.

Definition of 'Droplet' and 'Droplet nuclei' from Annex C: Respiratory droplets, in Natural Ventilation for Infection Control in Health-Care Settings, Atkinson J., et al., Editors, 2009; Geneva.

© Jon Otter

# CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM SARS-COV-2

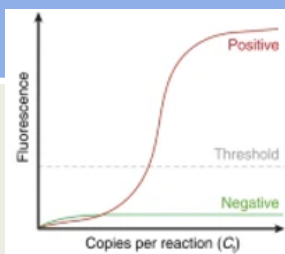
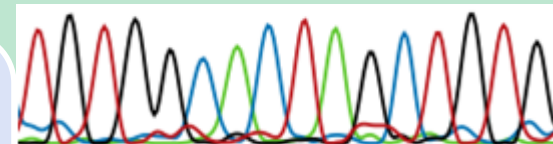
## Nuôi cấy virus:

- Phát hiện virus sống
- Nghiên cứu
- Phòng ATSH cấp III



## Giải trình tự gen:

- Xác định trình tự bộ gen virus
- Nghiên cứu, giám sát về mặt virus học, phát hiện biến thể virus



## Các PP XN SARS-CoV-2

CV 5288/BYT-TB-CT 2/7/21

## XN khuếch đại acid nucleic

### (Real time RT-PCR, PCR-LAMP)

- Phát hiện RNA virus SARS-CoV-2
- QĐ 4042/QĐ-BYT: 21/9/2020
- TH bệnh xác định: (+) với SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR

QĐ 2008/QĐ-BYT 26/4/2021

## XN miễn dịch

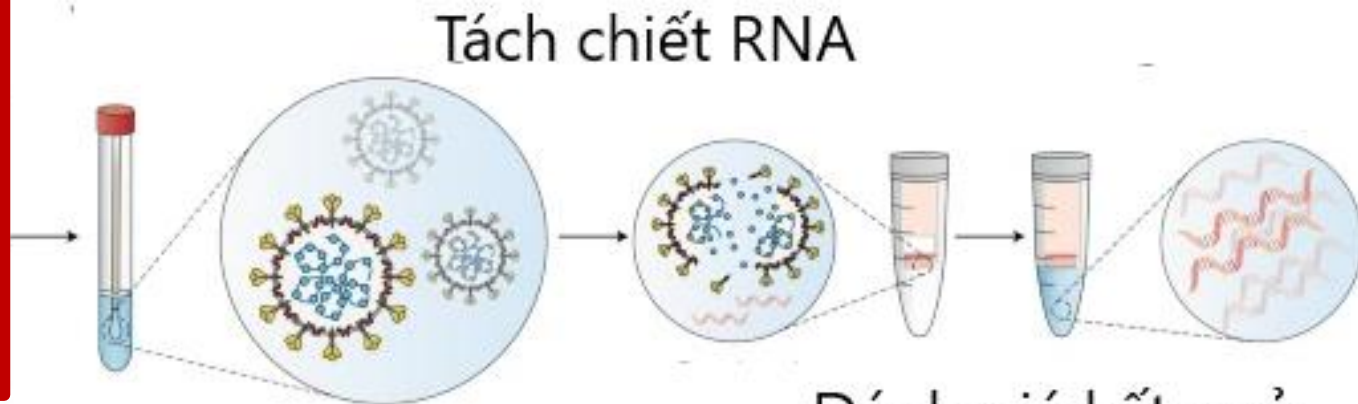
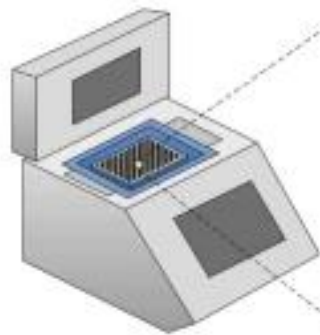
- Phát hiện kháng nguyên virus
- QĐ 2022/QĐ-BYT: 28/4/2021
- Phát hiện kháng thể kháng virus (Hiện KAD cho sàng lọc và chẩn đoán)



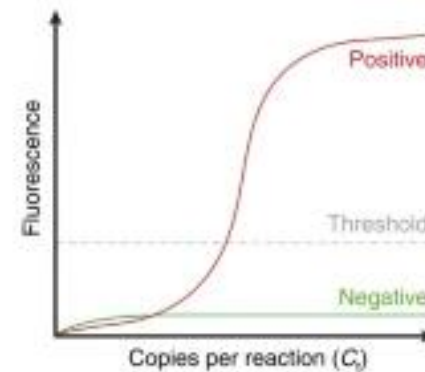
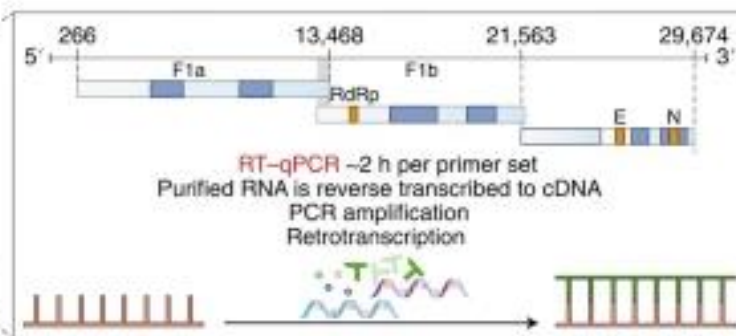
# XÉT NGHIỆM Realtime RT-PCR



RT- PCR



Đánh giá kết quả



# MẪU BỆNH PHẨM

Yêu cầu về mẫu bệnh phẩm:

- ❖ Tối thiểu 01 mẫu BP đường hô hấp
- ❖ BP đường hô hấp trên:
  - **Mẫu dịch ty hầu**
  - Mẫu dịch ngoáy họng, dịch rửa mũi...
- ❖ BP đường hô hấp dưới: đờm, dịch rửa phế quản, dịch màng phổi, tổ chức phổi...



Nguồn: Quyết định 3468/QĐ-BYT ban hành ngày 07/8/2020



# BẢO QUẢN VÀ VẬN CHUYỂN MẪU

## ❖ Bảo quản:

- Bảo quản tại 2-8°C trong vòng 48h
- Bảo quản tại -70°C nếu lưu mẫu >48h
- Không bảo quản tại ngăn đá của tủ lạnh hoặc tại -20°C.

## ❖ Vận chuyển:

- Đóng gói mẫu theo nguyên tắc 3 lớp (chất lây nhiễm loại B theo thông tư 40/2018/TT BYT)
- Đảm bảo điều kiện nhiệt độ vận chuyển như điều kiện bảo quản mẫu.

*Nguồn: Quyết định 3468/QĐ-BYT ban hành ngày 07/8/2020*



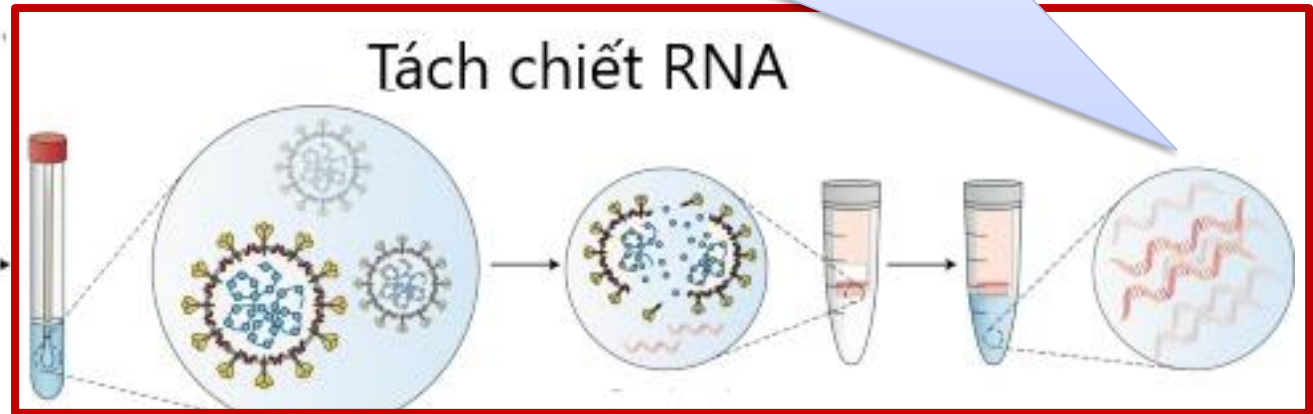
# XÉT NGHIỆM Realtime RT-PCR

Mục đích: thu được sản phẩm RNA

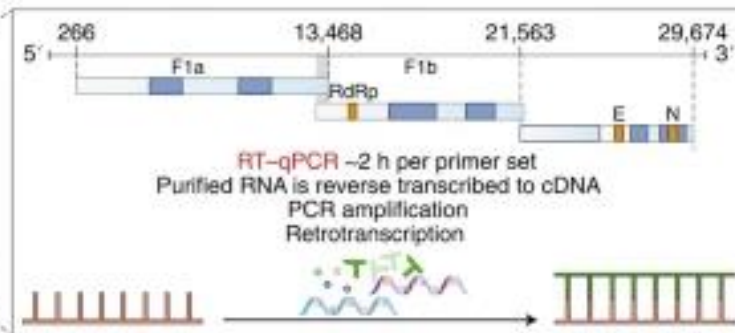
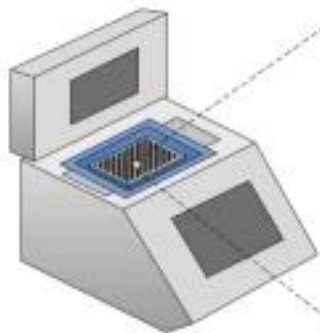
- Nguyên vẹn
- Tinh sạch

a

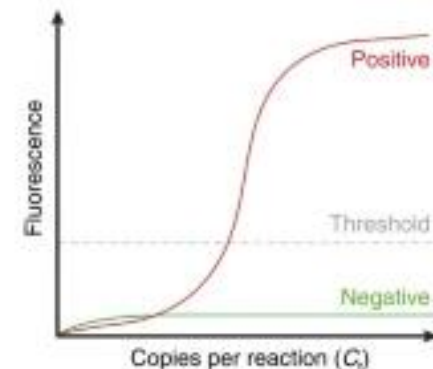
Lấy mẫu



RT-PCR



Đánh giá kết quả



# TRANG THIẾT BỊ THIẾT YẾU CHO XÉT NGHIỆM Realtime RT-PCR

## Phụ lục 1

### Danh mục trang thiết bị thiết yếu để xét nghiệm Realtime RT-PCR

(Ban hành kèm theo Quyết định số 1284/QĐ-BYT ngày 22 tháng 3 năm 2020 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

STT	Tên mặt hàng	Số lượng
1	Máy khuếch đại và phân tích kết quả Realtime PCR thuộc một trong các hệ thống máy theo khuyến cáo của WHO/CDC	1
2	Máy ly tâm	1
3	Máy trộn lắc	1
4	Bộ pipette có thể tích 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L	1
5	Tủ lạnh để lưu giữ hóa chất và sinh phẩm	1
6	Đồng hồ hẹn giờ	1
7	Máy xét nghiệm nhanh (nếu có)	1

Các trang thiết bị trên không bao gồm các trang thiết bị đảm bảo An toàn sinh học.



# TRANG THIẾT BỊ THIẾT YẾU CHO XÉT NGHIỆM Realtime RT-PCR



Bộ pipet



Đồng hồ bấm giờ



Máy ly tâm



Máy trộn lắc



Máy Realtime PCR



Tủ lạnh



Máy tách chiết tự động

# NGUYÊN LÝ TÁCH CHIẾT RNA

- ❖ Nguyên lý: Tách chiết RNA là quá trình sử dụng các biện pháp vật lý, hoá học hay sinh học để xử lý mẫu bệnh phẩm nhằm loại bỏ các tạp chất và thu sản phẩm RNA.
- ❖ Bao gồm các bước:
  - Bước 1: Ly giải tế bào
  - Bước 2: Loại bỏ các tạp chất
  - Bước 3: Hoà tan và thu RNA

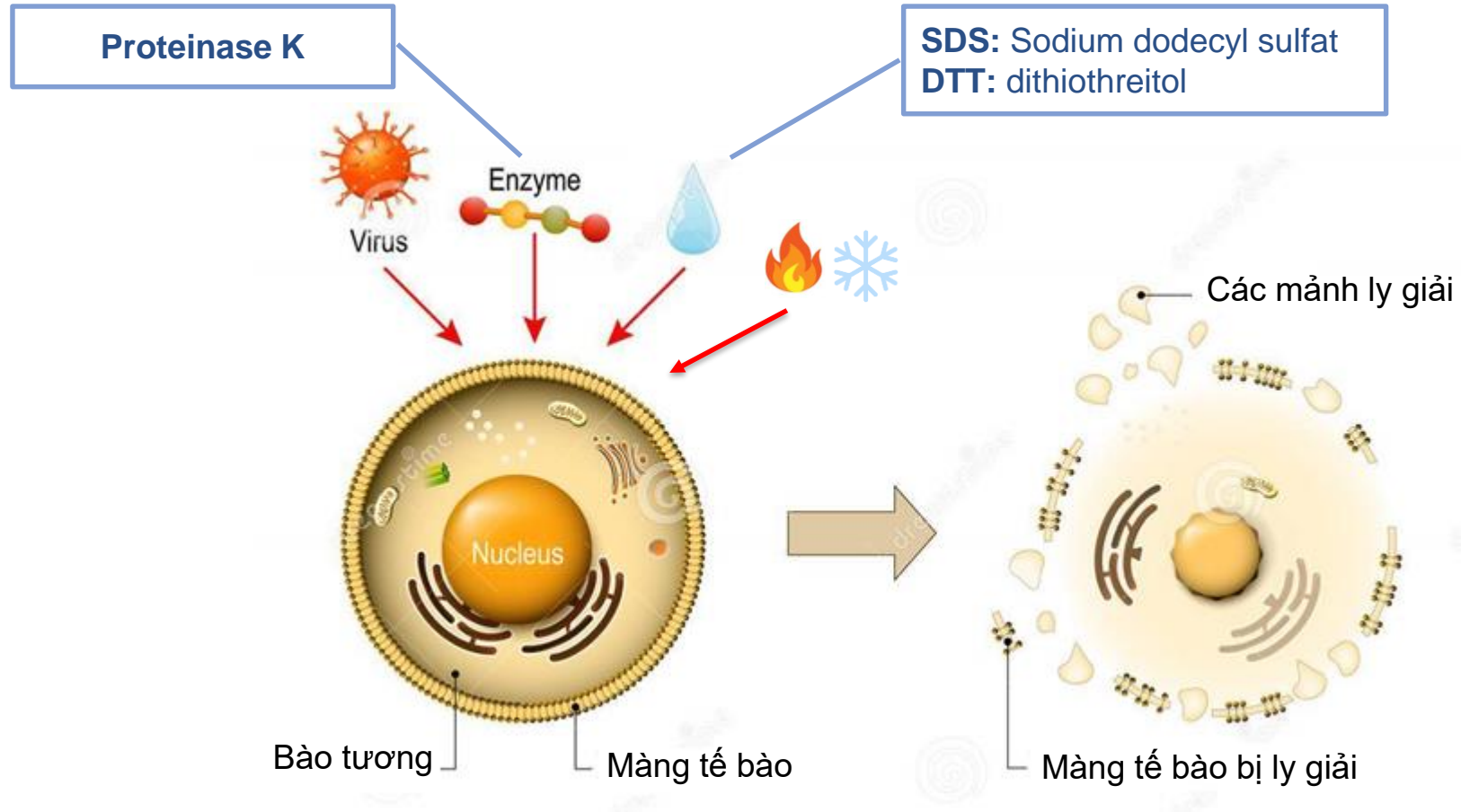


# BƯỚC 1. LY GIẢI TẾ BÀO

- ❖ Mục đích: phá huỷ màng tế bào nhằm làm bộc lộ RNA.
- ❖ Các phương pháp ly giải:
  - Vật lý: sốc nhiệt, sốc thẩm thấu,...
  - Hoá học: hoá chất ly giải, đệm ly giải (pH)
  - Sinh học: enzym



# BƯỚC 1. LY GIẢI TẾ BÀO



## BƯỚC 2. LOẠI BỎ CÁC TẠP CHẤT

- ❖ Tạp chất: protein, lipid, carbohydrat, RNase, hoá chất tách...
- ❖ Có rất nhiều phương pháp được sử dụng để loại bỏ các tạp chất.
- ❖ 3 phương pháp được sử dụng phổ biến:
  - PP sử dụng hoá chất hữu cơ (Organic extraction)
  - PP sử dụng cột Silica (Column)
  - PP sử dụng hạt từ (Magnetic beads)





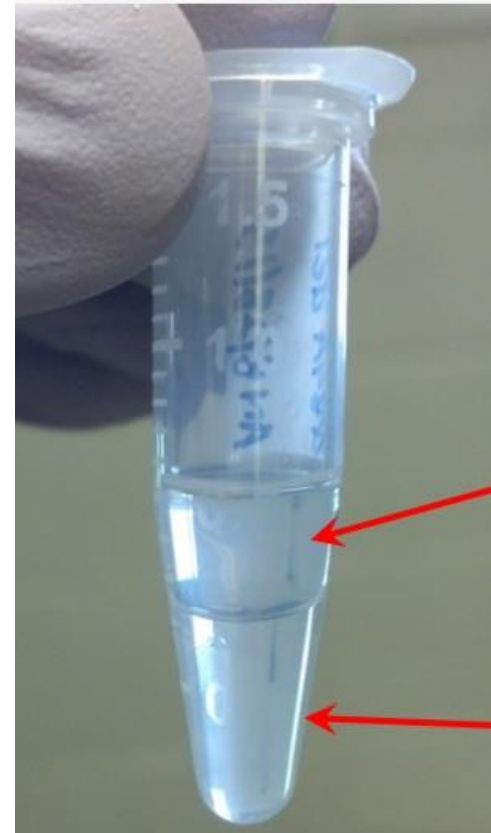
## BƯỚC 3. HOÀ TAN RNA

- ❖ Hoà tan RNA bằng nước free nuclease
- ❖ Không trộn bằng máy vortex
- ❖ Nên chạy Realtime RT-PCR ngay sau tách chiết
- ❖ Bảo quản RNA:
  - Bảo quản tại 2-8°C trong thời gian ngắn
  - Bảo quản từ -70°C hoặc thấp hơn
  - Tránh đông lạnh và rã đông mẫu nhiều lần



# PP SỬ DỤNG HOÁ CHẤT HỮU CƠ

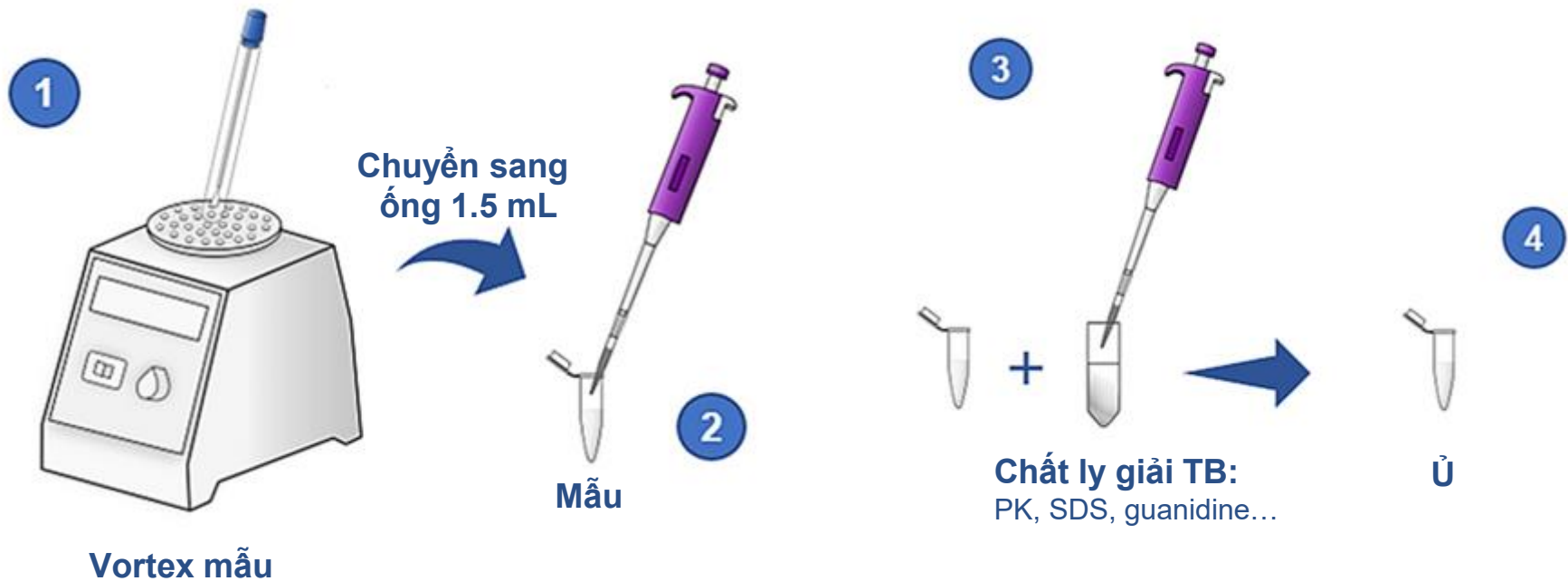
- ❖ Nguyên tắc: sử dụng các hoá chất hữu cơ và lực ly tâm để tạo ra hỗn dịch có 2 pha.
- ❖ Hoá chất:
  - Guanidine thiocyanate
  - Phenol
  - Chloroform



**Pha nước**  
(RNA)

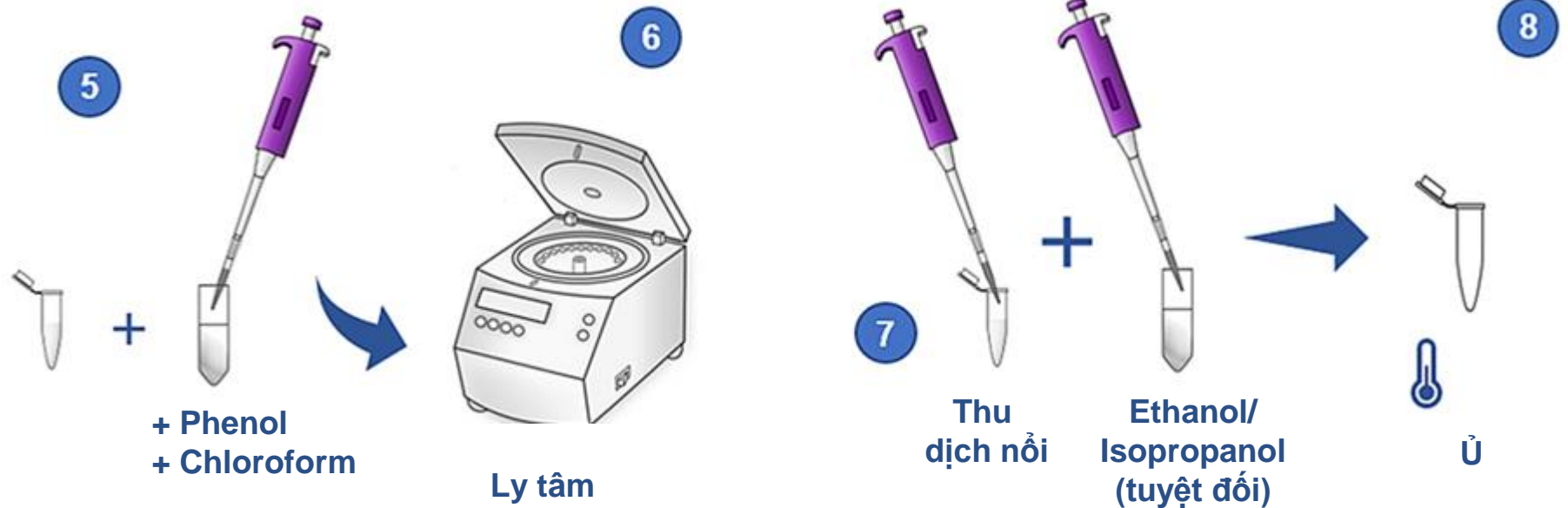
**Pha hữu cơ**  
(protein, các tp màng)

# PP SỬ DỤNG HOÁ CHẤT HỮU CƠ



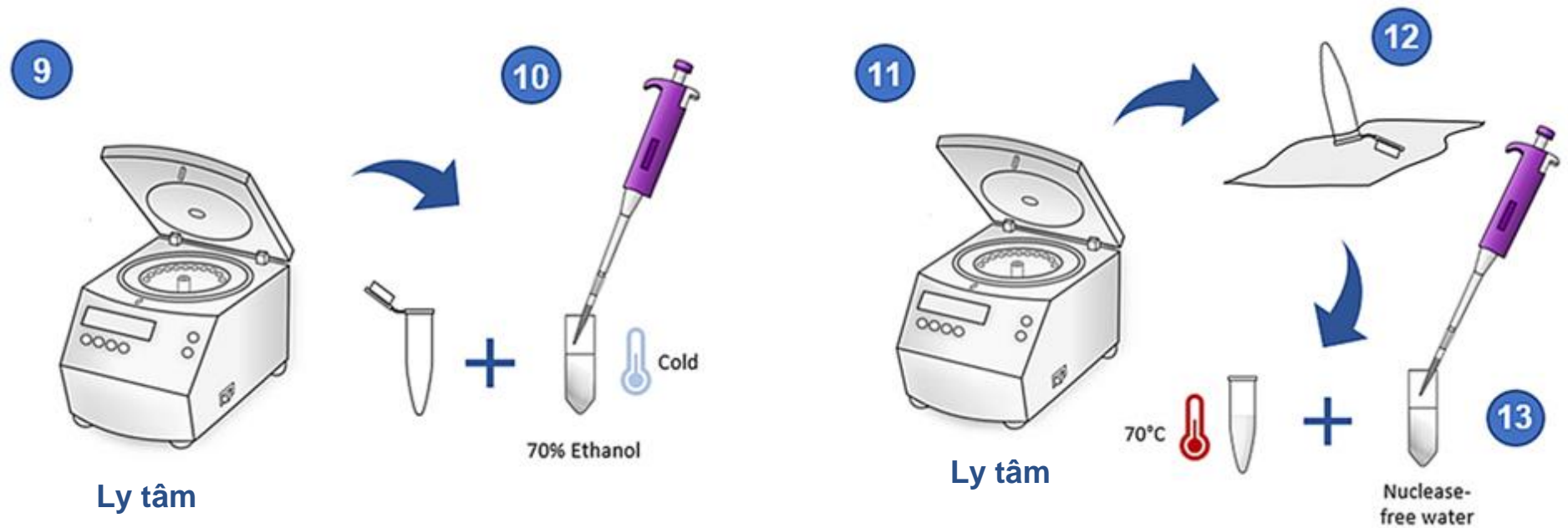
A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR,  
*Scientific Reports* (2020)

# PP SỬ DỤNG HOÁ CHẤT HỮU CƠ



A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR,  
*Scientific Reports* (2020)

# PP SỬ DỤNG HOÁ CHẤT HỮU CƠ



A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR,  
*Scientific Reports* (2020)



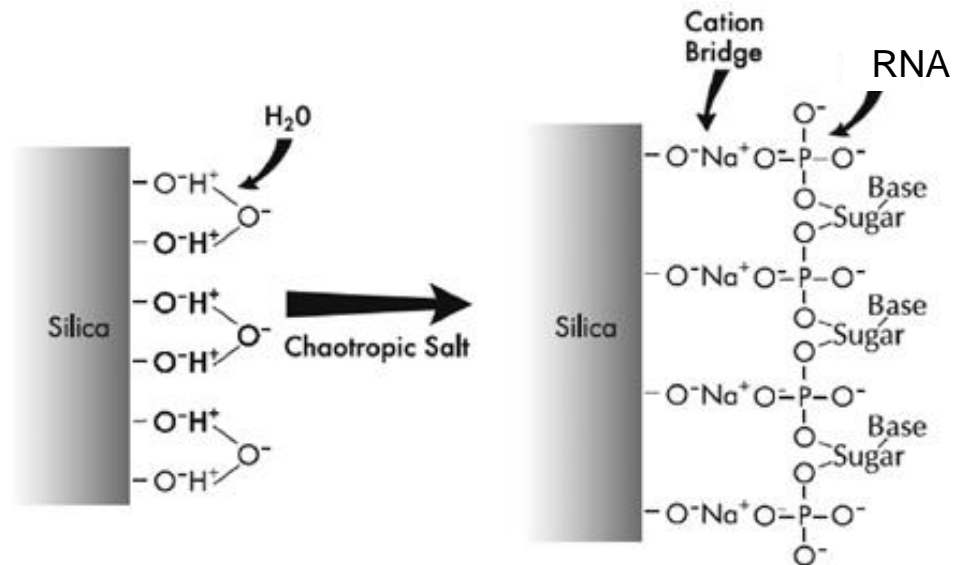
# PP SỬ DỤNG CỘT SILICA

## ❖ Nguyên tắc hoạt động:

- Cột silica
- Các muối chaotropic (guanidine thiocyanate)



Cột Silica

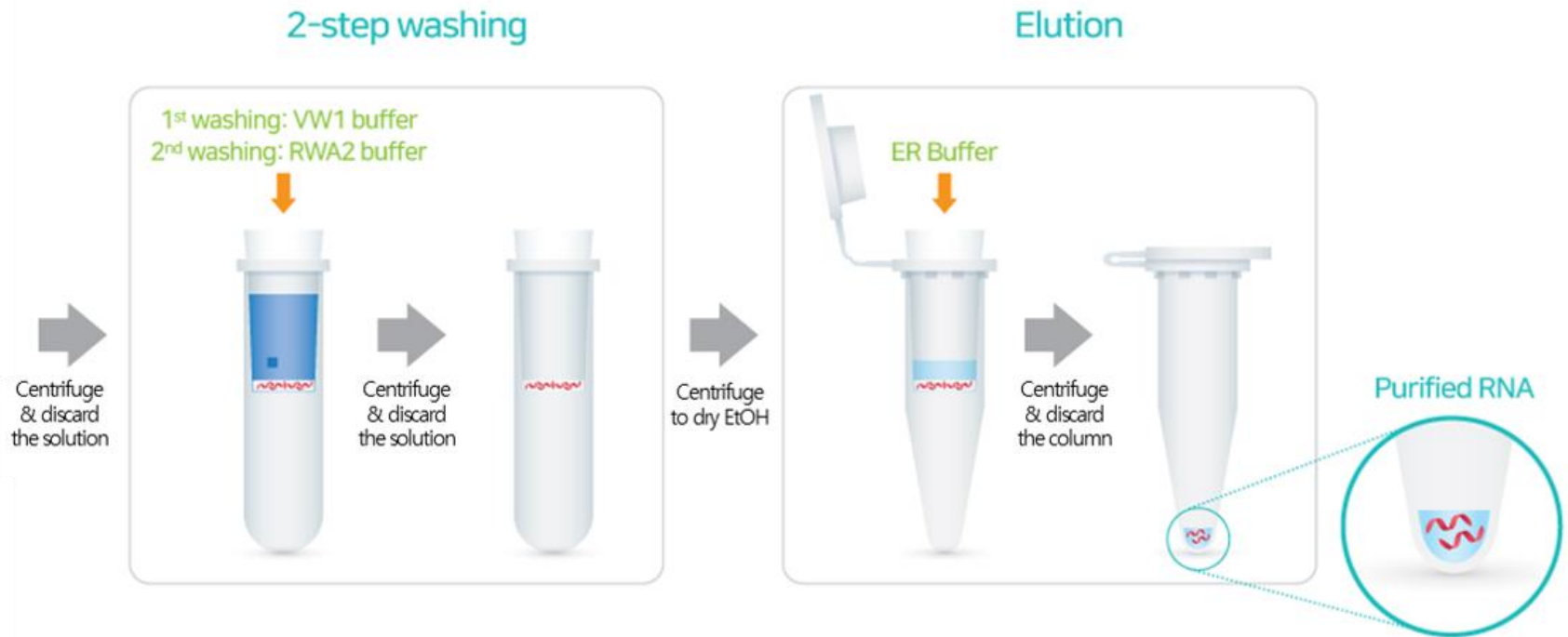


Sự gắn của RNA lên màng Silica

# PP SỬ DỤNG CỘT SILICA



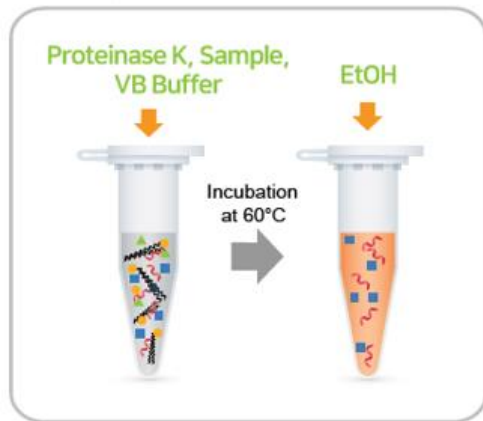
# PP SỬ DỤNG CỘT SILICA



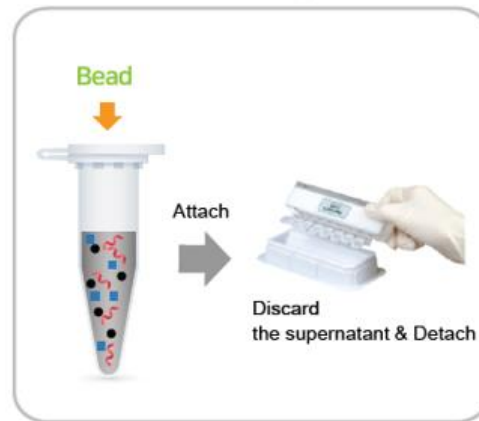


# PP SỬ DỤNG HẠT TỪ

## Lysis & Precipitation



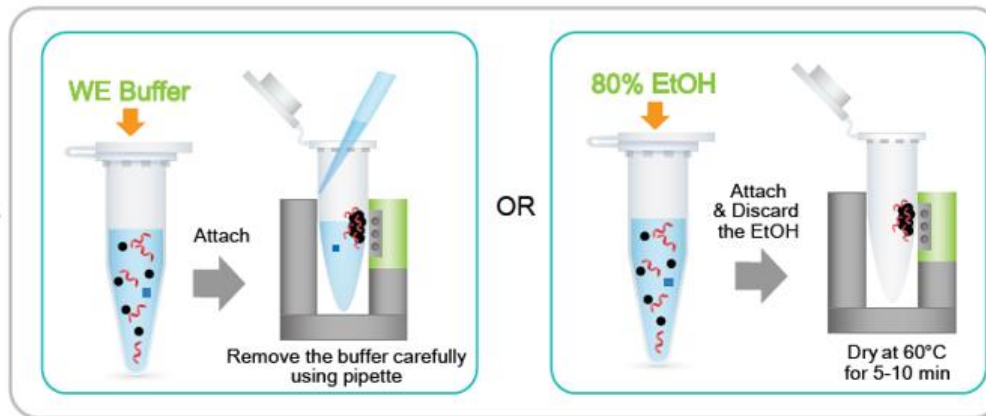
## Binding



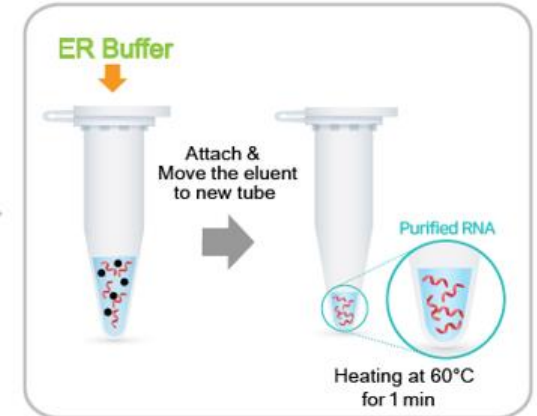
## 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> washing



## 4<sup>th</sup> washing



## Elution



# PP SỬ DỤNG HẠT TỬ

CHEMAGIC  
SEPARATION  
TECHNOLOGY

chemagen Technology

  
PerkinElmer



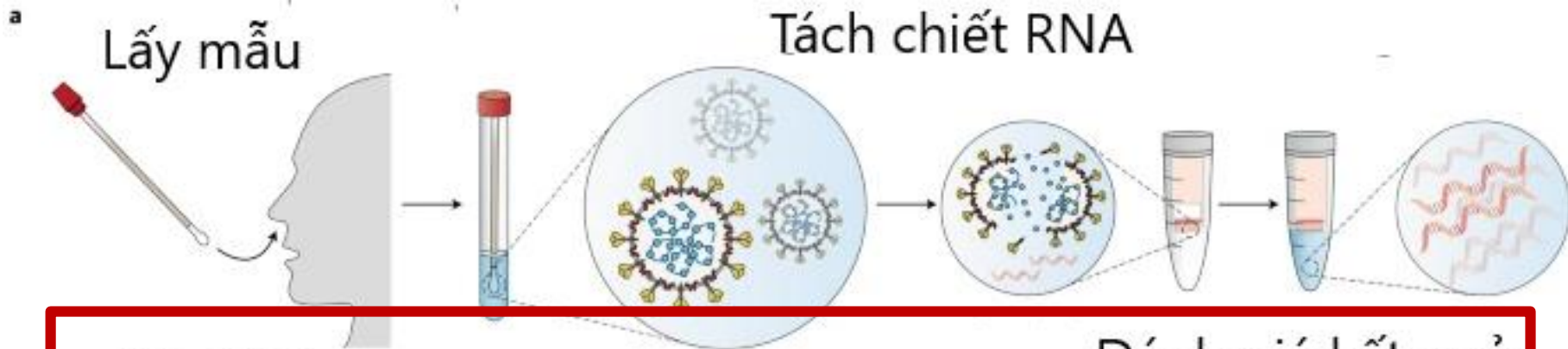
<https://www.youtube.com/watch?v=deVufNDJ4GI>

# SO SÁNH 3 PHƯƠNG PHÁP

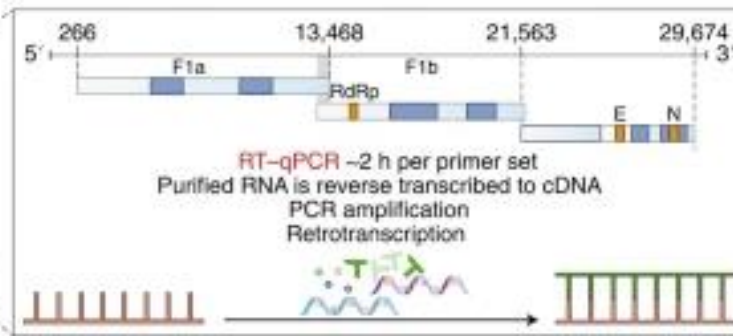
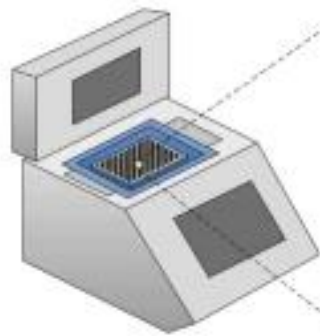
	PP sử dụng hoá chất hữu cơ	PP sử dụng cột	PP sử dụng hạt từ
Nguyên lý	Sử dụng các hoá chất hữu cơ tạo hỗn dịch 2 pha để loại bỏ tạp chất	Sử dụng cột Silica và thuốc thử tối ưu để phân lập RNA thông qua ly tâm	Sử dụng hạt từ và thuốc thử tối ưu để phân lập RNA
Độ tinh sạch	Trung bình	Cao	Cao nhất
Nồng độ RNA	Cao	Trung bình	Trung bình
Ưu điểm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tách chiết hiệu quả, có thể áp dụng cho các mẫu khó</li> <li>- Chi phí thấp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Có thể xử lý nhiều loại mẫu và thể tích</li> <li>- Nhanh, dễ sử dụng</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Không cần máy ly tâm</li> <li>- Có thể tự động hoá, năng suất cao</li> <li>- Nhanh</li> </ul>
Nhược điểm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Độc hại</li> <li>- Thời gian lâu</li> <li>- Cần máy ly tâm, khó tự động hoá</li> <li>- Quy trình thủ công</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Có nguy cơ tắc cột</li> <li>- Cần máy ly tâm, khó tự động hoá</li> <li>- Quy trình thủ công</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chi phí cao</li> </ul>



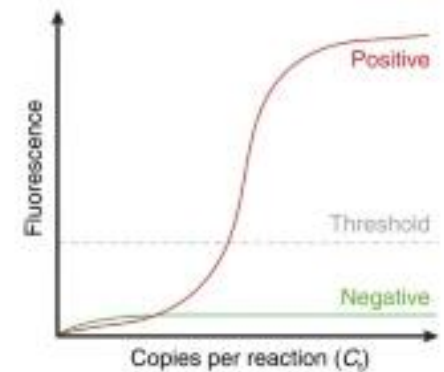
# XÉT NGHIỆM Realtime RT-PCR



## RT-PCR



## Đánh giá kết quả





TRUNG TÂM KIỂM CHUẨN CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM Y HỌC  
- TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

**Thank You !**