

## STUDY AND PRODUCE RNA-POSITIVE STANDARD REFERENCE SAMPLES OF SARS-COV-2 VIRUS FOR QUALITY CONTROL OF COVID-19 DIAGNOSTIC KIT

Phung Thi Ngoc<sup>1\*</sup>, Vu Thi Thu Huong<sup>1</sup>, Pham Thi Hong Thuy<sup>1</sup>,  
Pham Trung Duc<sup>1</sup>, Pham Thi Minh<sup>1</sup>

*National Institute for Control of Vaccine and Biologicals*

*Received on May 21<sup>st</sup>, 2022*

*Accepted on June 25<sup>th</sup>, 2022*

### Abstract

**Background/Purpose:** This study aims to establish the procedure for the production of RNA-positive reference samples of the SARS-CoV-2 virus from inactivated cultures, and to evaluate the stability of RNA samples under different storage conditions.

**Methods:** Methods of describing experiments in the laboratory.

**Results:** The study developed a procedure for the production of a SARS-CoV-2 RNA positive control based on WHO requirements for setting up a secondary RNA standard. From the culture fluid of the inactivated international strain of SARS-CoV-2, through the extraction and quantity of RNA concentration and stability assessment of samples at different concentrations, then select the lowest sample concentration that still ensures stability over real storage time. The stability assessment is conducted at 3 levels of sample concentration: 5x10<sup>4</sup>cp/μl, 10<sup>4</sup>cp/μl, and 2x10<sup>3</sup>cp/μl and under the following storage conditions: at -70°C after 3 months, 6 months, and 8 months; the number of thaws; store at 25°C and 4°C for 6 weeks.

**Conclusion:** Developed a production process and produced 15 tubes of SARS-CoV-2 RNA positive control samples at a concentration of 2x10<sup>3</sup>cp/μl with a volume of each tube of 40 μl/tube. The produced SARS-CoV-2 RNA positive controls were tested and found to be stable through 8 months of storage at -70°C, 10 times of thawing, and for at least 1 month at 25°C and 4°C.

*Keywords:* ARN, SARS-CoV-2, COVID-19.

---

\* Corresponding author

*E-mail address:* ngoc.nicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i2.36>

## NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT MẪU CHỨNG DƯƠNG ARN CỦA VIRUS SARS-COV-2 CHO ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SINH PHẨM CHẨN ĐOÁN COVID-19

Phùng Thị Ngọc<sup>1\*</sup>, Vũ Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Phạm Thị Hồng Thủy<sup>1</sup>,  
Phạm Trung Đức<sup>1</sup>, Phạm Thị Minh<sup>1</sup>

*Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế*

*Nhận ngày 21 tháng 5 năm 2022*

*Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 6 năm 2022*

### Tóm tắt

**Đặt vấn đề/ Mục tiêu:** Nghiên cứu này nhằm thiết lập quy trình sản xuất mẫu chứng dương ARN của virus SARS-CoV-2 từ dịch nuôi cấy bất hoạt, và đánh giá tính ổn định của mẫu ARN tại các điều kiện bảo quản khác nhau.

**Phương pháp:** Phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

**Kết quả:** Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 dựa trên các yêu cầu của WHO về thiết lập mẫu chuẩn ARN thứ cấp. Từ dịch nuôi cấy SARS-CoV-2 bất hoạt chủng quốc tế, qua tách chiết, định lượng nồng độ ARN và đánh giá sự ổn định của mẫu ở các nồng độ khác nhau, từ đó chọn ra một nồng độ mẫu thấp nhất mà ở đó vẫn đảm bảo sự ổn định qua thời gian bảo quản thực. Độ ổn định của mẫu được đánh giá ở 3 cấp nồng độ: 5x104cp/μl, 104cp/μl và 2x103cp/μl tại các điều kiện bảo quản như sau: ở -70°C sau 3 tháng, 6 tháng và 8 tháng; số lần tan băng; ở 25°C và 4°C trong 6 tuần.

**Kết luận:** Đã xây dựng quy trình sản xuất và thực hiện sản xuất 15 ống mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 ở nồng độ 2x103cp/μl với thể tích mỗi ống là 40μl/ống. Mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 sản xuất đã được kiểm tra và thấy ổn định qua 8 tháng bảo quản tại -70°C, qua 10 lần tan băng và qua ít nhất 1 tháng tại 25°C và 4°C.

*Từ khóa:* ARN, SARS-CoV-2, COVID-19

### 1. Đặt vấn đề

Đại dịch COVID-19 đã làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến nền kinh tế và sức khỏe cộng đồng toàn cầu trong suốt gần 3 năm qua. Cùng với tiêm vắc xin, việc chẩn đoán COVID-19 nhanh và chính xác vẫn là những biện pháp ứng phó quan trọng góp phần giám sát trọng điểm kịp thời trong kiểm soát dịch. Hiện nay, có vài trăm bộ kit sinh học phân tử chẩn đoán SARS-CoV-2 đã được phát triển và sản xuất tại Việt Nam

và nhiều nước trên thế giới [1]. Tuy nhiên, việc đánh giá chất lượng các bộ sinh phẩm chẩn đoán vẫn luôn cần được tiến hành và kiểm soát thường xuyên.

Nghiên cứu này nhằm thiết lập quy trình sản xuất mẫu chứng dương ARN của virus SARS-CoV-2 từ dịch nuôi cấy bất hoạt, và đánh giá tính ổn định của mẫu ARN tại các điều kiện bảo quản khác nhau. Kết quả nghiên cứu cung cấp bằng chứng khoa học góp phần xây dựng hướng dẫn việc thực hành bảo quản mẫu chuẩn trong kiểm định sinh phẩm y tế tại Viện kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB).

<sup>1</sup> Tác giả liên hệ:

Email: ngoc.nicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i2.36>

Nghiên cứu được tiến hành với 2 mục tiêu: 1) Xây dựng quy trình và sản xuất 15 ống mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2. 2) Đánh giá tính ổn định về nồng độ của mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 sản xuất được.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu và thời gian nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu là ARN của virus SARS-CoV-2 được tách chiết từ dịch nuôi cấy SARS-CoV-2 bất hoạt. Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế, từ tháng 6/2021-6/2022.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu và kỹ thuật thu thập số liệu:

Phương pháp mô tả thực nghiệm, sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử Realtime PCR trên hệ thống máy Quant5. Xử lý và phân tích số liệu bằng Excel.

### 2.3. Thiết kế nghiên cứu:

Từ các hướng dẫn của WHO về thiết lập mẫu chuẩn ARN thứ cấp [14], xây dựng

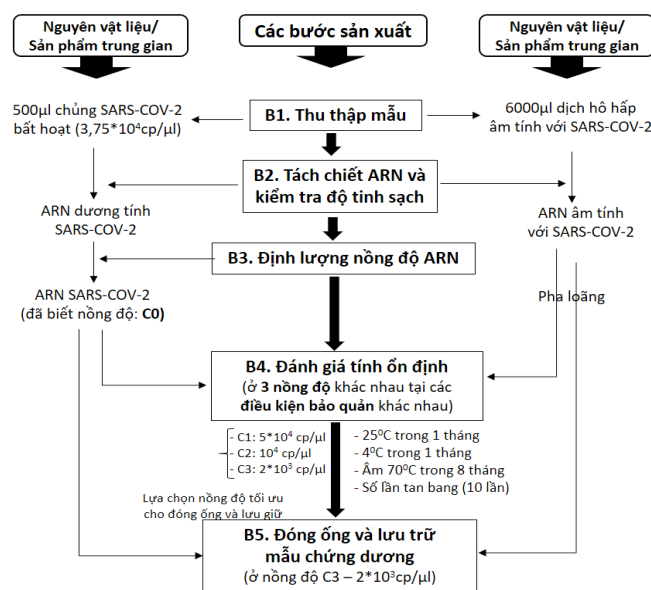
tiêu chuẩn chấp nhận và phương pháp kiểm tra với mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 dự kiến sản xuất. Từ đó xây dựng tiêu chuẩn cơ sở đối với mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 sản xuất.

Nghiên cứu đánh giá độ ổn định của mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 được thực hiện ở 3 cấp nồng độ:  $5 \times 10^4$  copies/ $\mu$ l (C1),  $10^4$  copies/ $\mu$ l (C2) và  $2 \times 10^3$  copies/ $\mu$ l (C3); lặp 2 lần/mẫu. Mẫu được đánh giá ở nhiệt độ bảo quản  $-70^\circ\text{C}$  và ở nhiệt độ lão hóa cấp tốc theo thời gian thực. Cụ thể là: (1) Bảo quản ở  $-70^\circ\text{C}$  sau 3 tháng, 6 tháng và 8 tháng; (2) Số lần tan băng của mẫu ở  $-70^\circ\text{C}$ ; (3) Bảo quản ở  $25^\circ\text{C}$  trong 1 tháng; (4) Bảo quản ở  $4^\circ\text{C}$  trong 1 tháng. Giá trị Ct của mẫu tại thời điểm T0 ban đầu và  $T0 \pm 2SD$  được sử dụng để đánh giá độ ổn định của mẫu. Theo WHO, nếu giá trị Ct của mẫu tại các thời điểm đánh giá khác vẫn nằm trong khoảng  $T0 \pm 2SD$  thì được coi là ổn định [14].

## 3. Kết quả

### 3.1. Xây dựng quy trình và sản xuất mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2

#### 3.1.1. Sơ đồ tóm tắt quy trình sản xuất



Hình 1. Sơ đồ quy trình sản xuất mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2

### 3.1.2. Mô tả các bước sản xuất

#### Bước 1. Thu thập nguyên vật liệu

- 500 $\mu$ l dịch SARS-CoV-2 bất hoạt (chuẩn chủng quốc tế, Lot 70034991, BEI Resources) được Công ty Medicon hỗ trợ cho NICVB, nồng độ lý thuyết là  $3,75 \times 10^4$  cp/ $\mu$ l.

- 6000 $\mu$ l dịch hô hấp (mũi - hầu - họng...) đã có kết quả xét nghiệm Realtime PCR âm tính với SARS-CoV-2, được cung cấp bởi TTDV Khoa học Kỹ thuật NICVB.

#### Bước 2. Tách chiết ARN

- 500 $\mu$ l dịch nuôi cấy SARS-CoV-2 -> 200 $\mu$ l ARN SARS-CoV-2.

- 6000 $\mu$ l dịch hô hấp âm tính -> 2000 $\mu$ l ARN âm tính.

#### Bước 3. Định lượng nồng độ mẫu dương ARN sau tách chiết

- Sử dụng mẫu chuẩn quốc tế (MCQT) ARN SARS-CoV-2 đã được thẩm định (NIBSC 19/304, nồng độ  $10^4$  cp/ $\mu$ l) để định lượng nồng độ của mẫu dương ARN sau tách chiết.

- Pha loãng mẫu ARN dương sau tách chiết (nồng độ dự kiến là  $A \times 3,75 \times 10^4$  cp/ $\mu$ l, trong đó A là hệ số tách chiết chưa biết) về 3 cấp nồng độ sau cho kiểm tra: C1 ( $A \times 10^4$  cp/ $\mu$ l), C2 ( $A \times 2 \times 10^3$  cp/ $\mu$ l) và C3 ( $A \times 4 \times 10^2$  cp/ $\mu$ l).

- Kết quả định lượng 3 cấp độ mẫu C1, C2, C3 tương ứng có nồng độ là: C1= $5 \times 10^4$  cp/ $\mu$ l, C2= $10^4$  cp/ $\mu$ l, và C3= $2 \times 10^3$  cp/ $\mu$ l.

#### Bước 4. Đánh giá độ ổn định của mẫu dương ARN

Đánh giá độ ổn định của mẫu dương ARN ở cả 3 cấp nồng độ đã được xác định ở trên C1, C2 và C3. Kết quả đánh giá cụ thể được trình bày ở mục 3.2.

#### Bước 5. Pha loãng, đóng ống và lưu giữ mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2

Từ kết quả đánh giá độ ổn định của cả 3 cấp nồng độ trên, nhóm nghiên cứu quyết định chọn mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 có nồng độ  $2 \times 10^3$  cp/ $\mu$ l cho sản xuất. Sử dụng chất nền ARN âm tính với SARS-CoV-2 để pha loãng mẫu ARN dương ban đầu về nồng độ sản xuất.

### 3.1.2. Kết quả sản xuất

15 ống mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 ở nồng độ  $2 \times 10^3$  copies/ $\mu$ l đã được đóng ống và lưu giữ ở tủ âm sâu  $-70^\circ\text{C}$ , đáp ứng tiêu chuẩn cơ sở đề ra như sau: ARN dương tính SARS-CoV-2, nồng độ  $2 \times 10^3$  cp/ $\mu$ l; NICVB- ngày SX 2/6/2022, STT ống từ 1-15.

### 3.2. Kết quả đánh giá độ ổn định của mẫu chứng dương

#### 3.2.1. Giá trị Ct của các mẫu tại thời điểm T0

Bảng dưới đây là kết quả giá trị Ct gen N, Ct trung bình (T0), độ lệch chuẩn SD và  $T0 \pm 2SD$  của các mẫu tại thời điểm ban đầu:

**Bảng 1. Giá trị Ct của mẫu tại thời điểm ban đầu**

Nồng độ	Ct gen N		Ct TB (T0)	SD	T0-2SD	T0+2SD
C1 5 x 10 <sup>4</sup> cp/ $\mu$ l	Lần 1	22.281	22.362	0.356	21.649	23.074
	Lần 2	22.442				
C2 10 <sup>4</sup> cp/ $\mu$ l	Lần 1	24.564	24.646	0.650	23.346	25.947
	Lần 2	24.729				
C3 2 x 10 <sup>3</sup> cp/ $\mu$ l	Lần 1	26.733	26.842	0.618	25.607	28.077
	Lần 2	26.950				

3.2.2. Độ ổn định của mẫu chứng dương khi bảo quản ở -70°C

**Bảng 2. Giá trị Ct của mẫu bảo quản ở -70°C theo thời gian**

Nồng độ	Lần lập	Thời điểm T0			Sau 3 tháng			Sau 6 tháng			Sau 8 tháng		
		Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD
C1- 5x10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	22.281			23.015			22.022			22.879		
	Lần 2	22.442	22.362	0.356	22.985	23.000	0.450	22.676	22.349	0.600	22.673	22.776	0.513
C2- 10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	24.646			25.063			25.730			25.256		
	Lần 2	24.729	24.688	0.650	25.219	25.141	0.685	25.661	25.696	0.545	25.291	25.274	0.478
C3- 2x10 <sup>3</sup> cp/μl	Lần 1	26.842			27.952			27.985			27.536		
	Lần 2	26.950	26.896	0.618	27.685	27.819	0.727	28.056	28.021	0.840	27.910	27.723	0.617

Kết quả bảng trên cho thấy, so với giá trị T0 ± 2SD (xem bảng 1), giá trị Ct của cả 3 mẫu bảo quản ở -70°C tại các thời điểm đo (sau 3 tháng, sau 6 tháng và sau 8 tháng)

vẫn nằm trong khoảng cho phép.

3.2.3. Độ ổn định sau tan băng của mẫu chứng dương

**Bảng 3. Giá trị Ct của mẫu theo số lần tan băng**

Nồng độ	Lần lập	Tan băng L3			Tan băng L5			Tan băng L7			Tan băng L9			Tan băng L10		
		Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD
C1- 5x10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	/			/			22.543			22.627			22.692		
	Lần 2								22.599	0.621	22.729	0.689	22.922	0.564		
C2- 10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	25.305			25.281			24.739			25.236			25.447		
	Lần 2	24.743	25.024	0.650	24.820	25.051	0.671	24.723	24.731	0.395	25.047	25.142	0.584	25.301	25.374	0.244
C3- 2x10 <sup>3</sup> cp/μl	Lần 1	27.422			27.666			27.370			27.305			28.077		
	Lần 2	27.679	27.551	0.359	27.675	27.670	0.485	26.773	27.072	0.520	27.520	27.413	0.671	27.575	27.826	0.655

Mẫu được bảo quản ở -70°C và đánh giá qua các lần tan băng. Kết quả cho thấy có một sự tăng hoặc giảm nhẹ về giá trị Ct tại các thời điểm đo (tan băng lần thứ 3, tan băng lần thứ 5, tan băng lần thứ 7, tan băng lần thứ 9 và tan băng lần thứ 10) so với giá

trị Ct tại T0. Tuy nhiên, giá trị Ct qua các lần tan băng của mẫu này vẫn nằm trong khoảng T0 ± 2SD cho phép (xem bảng 1).

3.2.3. Độ ổn định của mẫu chứng dương khi bảo quản ở 25°C

**Bảng 4. Giá trị Ct của mẫu bảo quản ở 25°C theo thời gian**

Nồng độ	Lần lặp	Sau 1 tuần			Sau 2 tuần			Sau 3 tuần			Sau 4 tuần			Sau 6 tuần		
		Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD
C1-5x10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	/			22.735	22.850	0.590	22.974	22.924	0.455	22.907	22.938	0.312	/		
	Lần 2				23.073			22.970								
C2-10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	25.475	25.663	0.547	25.271	25.297	0.467	25.861	25.773	0.427	25.971	25.762	0.517	25.101	25.025	0.526
	Lần 2	25.851			25.324			25.685			25.553			24.949		
C3-2x10 <sup>3</sup> cp/μl	Lần 1	27.805	27.847	0.397	27.512	27.402	0.434	27.545	27.370	0.641	27.169	27.042	0.549	26.663	26.954	0.661
	Lần 2	27.890			27.293			27.196			26.915			27.245		

Khi bảo quản ở 25°C, sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần và 6 tuần đánh giá, so với giá trị Ct tại thời điểm T0, giá trị Ct của các mẫu có sự dao động nhẹ, nhưng vẫn

nằm trong khoảng Ct cho phép ( $T0 \pm 2SD$ ).

### 3.2.4. Độ ổn định của mẫu chứng dương khi bảo quản ở 4°C

**Bảng 5. Giá trị Ct của mẫu bảo quản ở 4°C theo thời gian**

Nồng độ	Lần lặp	Sau 1 tuần			Sau 2 tuần			Sau 3 tuần			Sau 4 tuần			Sau 6 tuần		
		Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD	Ct gen N	Ct TB	SD
C1-5x10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	/			23.272	22.976	0.410	23.067	22.898	0.430	22.133	22.058	0.563	/		
	Lần 2				22.929			21.982								
C2-10 <sup>4</sup> cp/μl	Lần 1	25.795	25.564	0.568	24.817	25.015	0.479	25.351	25.283	0.543	24.971	24.809	0.581	24.985	25.058	0.611
	Lần 2	25.332			25.212			24.647			25.131					
C3-2x10 <sup>3</sup> cp/μl	Lần 1	27.661	27.731	0.784	27.893	27.843	0.514	28.131	28.039	0.438	27.463	27.313	0.812	27.392	27.392	0.422
	Lần 2	27.801			27.793			27.162			27.391					

Bảng trên cho thấy, sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần và 6 tuần đánh giá mẫu bảo quản ở 4°C, giá trị Ct của các mẫu có một sự tăng/giảm nhẹ so với giá trị Ct tại thời điểm T0. Tuy nhiên, các giá trị này vẫn nằm trong khoảng  $T0 \pm 2SD$  cho phép (bảng 1).

## 4. Bàn luận

### 4.1. Xây dựng quy trình và sản xuất mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2

Quy trình sản xuất mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 được xây dựng dựa trên các yêu cầu/hướng dẫn của WHO về việc thiết lập mẫu chuẩn ARN thứ cấp [14]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu thiết lập các tiêu chuẩn chấp nhận đối với một mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 dự kiến sản xuất.

Nguyên vật liệu ban đầu cho mẫu dương ARN SARS-CoV-2 là dịch nuôi cấy chủng SARS-CoV-2 bất hoạt chủng quốc

tế, do đó đảm bảo độ sạch và thuần khiết của nguyên vật liệu đầu vào.

Để định lượng nồng độ ARN của mẫu ban đầu, một MCQT khác (đã được thẩm định) được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Mẫu chuẩn ARN nghiên cứu có thể được coi là mẫu chuẩn thứ cấp. Do vậy, việc nói chuẩn mẫu chuẩn thứ cấp với một MCQT là đúng theo hướng dẫn của WHO và đảm bảo độ tin cậy [14].

Việc sản xuất mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 được tuân thủ theo quy trình đã xây dựng. Mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 được sản xuất dựa vào các tiêu chuẩn cơ sở đề ra.

#### 4.2. Độ ổn định của mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 sản xuất

Kết quả đánh giá độ ổn định của các mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 ở các nồng độ khác nhau (mục 3.2) cho thấy các mẫu này ổn định ở cả 3 nồng độ nghiên cứu C1 (5x10<sup>4</sup> copies/μl), C2 (10<sup>4</sup> copies/μl), và C3 (2x10<sup>3</sup> copies/μl) với các điều kiện nghiên cứu là: 8 tháng bảo quản ở -70°C, 10 lần tan băng, 6 tuần ở 25°C và 6 tuần ở 4°C. Giá trị Ct trung bình của mẫu ở cả 3 nồng độ đều nằm trong khoảng Ct cho phép (T0±2SD).

Cụ thể như sau: Nồng độ C1 (5x10<sup>4</sup> copies/μl) ổn định ở các điều kiện nghiên cứu với giá trị Ct trung bình nằm trong khoảng 22.362 ± 0.356. Nồng độ C2 (10<sup>4</sup> copies/μl) ổn định ở các điều kiện nghiên cứu với giá trị Ct trung bình nằm trong khoảng 24.646 ± 0.650. Nồng độ C3 (2x10<sup>3</sup> copies/μl) ổn định ở các điều kiện nghiên cứu với giá trị Ct trung bình nằm trong khoảng 26.842 ± 0.618. Kết quả

nghiên cứu về tính ổn định của mẫu ARN SARS-CoV-2 ở các nồng độ khác nhau là cơ sở để chọn ra nồng độ tối ưu cho sản xuất mẫu chứng dương.

Kết quả đánh giá về độ ổn định ARN SARS-CoV-2 qua 10 lần tan băng cũng tương tự với kết quả đánh giá độ ổn định của ARN virus viêm gan C theo nghiên cứu của Fusan Comert [6]. Wu J và cộng sự cũng thực hiện nghiên cứu và cho thấy mẫu ARN ổn định đến 10 lần tan băng khi bảo quản ở -20°C và -80°C [20].

Andrea Granados và cộng sự đánh giá độ ổn định của ARN virus cúm A/H1N1 ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau và qua số lần tan băng [3]. Kết quả cho thấy nồng độ ARN virus cúm A/H1N1 bắt đầu giảm 1/2 lần sau 8 lần tan băng. Nếu bảo quản ở 40°C, ARN virus cúm A/H1N1 ổn định được 21 ngày và giảm nồng độ 1/2 lần từ ngày nghiên cứu thứ 28. Còn nếu bảo quản ở 25°C, ARN virus cúm A/H1N1 ổn định được 7 ngày và giảm nồng độ 1/2 lần trở lên từ tuần thứ 2 trở đi.

Như vậy, so với kết quả đánh giá của Andrea Granados, nghiên cứu của chúng tôi thấy ARN SARS-CoV-2 ổn định hơn cả về số lần tan băng, bảo quản ở nhiệt độ phòng 25°C và ở 4°C. Sự khác nhau này có thể do bản chất ARN của loại virus, do chất lượng ARN được tách chiết hoặc một số yếu tố khác như dung dịch đệm pha loãng hay nguồn chủng nuôi cấy virus ban đầu trước khi tách chiết...

#### 4.3. Hạn chế nghiên cứu

Do lượng mẫu ARN SARS-CoV-2 cho sản xuất hạn chế, nên tại thời điểm T0 ban đầu để xác định căn cứ đánh giá độ ổn định

của mẫu theo thời gian, nghiên cứu chỉ thực hiện lặp lại 2 lần với một mẫu. Tuy nhiên, chúng tôi đã thực hiện lặp với 3 mẫu, tương ứng 3 cấp nồng độ khác nhau. Do đó xây dựng được 6 điểm số liệu, đủ đảm bảo độ tin cậy về khoa học.

Theo khuyến cáo của WHO, mẫu chuẩn thứ cấp xây dựng cần được đánh giá độ ổn định tối thiểu một năm. Trong giới hạn thời gian thực hiện đề tài, nghiên cứu mới thực hiện đánh giá độ ổn định của mẫu chứng dương được 8 tháng. Vì vậy, chúng tôi kiến nghị tiếp tục theo dõi và đánh giá độ ổn định của mẫu này theo thời gian đến một năm hoặc hơn nữa nếu có thể.

## 5. Kết luận

Đã xây dựng quy trình sản xuất và thực hiện sản xuất 15 ống mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 ở nồng độ  $2 \times 10^3 \text{cp}/\mu\text{l}$  với thể tích mỗi ống là  $40 \mu\text{l}/\text{ống}$ .

Mẫu chứng dương ARN SARS-CoV-2 sản xuất đã được kiểm tra và thấy ổn định qua 8 tháng bảo quản tại  $-70^\circ\text{C}$ , qua 10 lần tan băng và qua ít nhất 1 tháng tại  $25^\circ\text{C}$  và  $4^\circ\text{C}$ .

## References

- [1] Bộ y tế Việt Nam. 2022. <https://covid19.gov.vn/>
- [2] Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. Nghiên cứu chế tạo bộ sinh phẩm Multiplex Realtime RT-PCR phát hiện chủng vi rút Corona mới 2019 (2019-nCoV) ở quy mô phòng thí nghiệm. Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cơ sở, 2020.
- [3] Andrea Granados, Astrid Petrich, Allison McGeer, Jonathan B. Gubbay. Measuring influenza RNA quantity after prolonged storage or multiple freeze/thaw cycles. *Journal of Virological Methods*. 2017.
- [4] Azadeh Rahimi, Azin Mirzazadeh, Soheil Tavakolpour. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*. 2021 Jan 113(1): 1221–1232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7525243/>
- [5] BEI Resources. Certificate of Analysis for NR-52286. [www.beiresources.org](http://www.beiresources.org). 11 MAY 2020.
- [6] Fusun Comert, Elif Aktas, H. Agah Terzi, Canan Kulah, Yucel Ustundag, Furuzan Kokturk, Selim Aydemir. Evaluation of hepatitis C virus RNA stability in room temperature and multiple freeze–thaw cycles by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012.
- [7] Meral Yüce, Elif Filiztekin, Korin Gasia Özkaya. COVID-19 diagnosis - A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021 Jan 15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7584564/>
- [8] T Lion. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia*, 2001.
- [9] WHO. Assessment tool for laboratories implementing SARS-CoV-2 testing. Interim guidance. 2 October 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/assessment-tool-for-laboratories-implementing-covid-19-virus-testing> WHO. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance>
- [10] WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/>
- [11] WHO. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Interim guidance. 11 September 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>



- [12] WHO. Genomic sequencing of SARS-CoV-2. A guide to implementation for maximum impact on public health. 8 January 2021. <https://www.who.int/publications/item/9789240018440>
- [13] WHO. In vitro diagnostics detecting SARS-CoV-2 nucleic acid and rapid diagnostics tests detecting SARS-CoV-2 antigens. Emergency Use Listing of IVDs. 09 June 2020.
- [14] WHO. Manual for the preparation of secondary reference materials for in vitro diagnostic assays designed for infectious disease nucleic acid or antigen detection. 2016.
- [15] WHO. Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0. 28 September, 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1>
- [16] WHO. Technical Specifications Series for submission to WHO Prequalification – Diagnostic Assessment.
- [17] WHO. TGS 3 Principles of performance studies of an in vitro diagnostic for WHO prequalification
- [18] WHO. TGS 4. Guidance on test method validation for in vitro diagnostic medical devices.
- [19] WHO. TGS 6. Panels for quality assurance and quality control of in vitro diagnostic medical devices
- [20] Wu J, Kim L, Huang C, and Anekella B SeraCare Life Sciences, Gaithersburg, MD. Stability of Extracted RNA at Various Storage Temperatures and through Multiple Freeze-Thaw Cycles. International Society for Biological and Environmental Repositories 2011 Annual Meeting, Arlington, 2011.