

EVALUATION OF THE STABILITY OF SARS-CoV-2 ANTIGEN IN CLINICAL SAMPLE AFTER MULTIPLE FREEZE-THAW CYCLES

Phạm Thị Hồng Thuy, Vu Thi Thu Hương*, Phạm Thị Minh

** National Institute for Control of Vaccine and Biologicals*

Received 3 November 2022

Accepted 14 November 2022

Abstract

The standard panel for evaluation of diagnostic performance (sensitivity, specificity, etc.) is a set of samples containing different SARS-CoV-2 viral loads. Some studies have shown that antigen concentrations in clinical samples positive for SARS-CoV-2 after long-term storage at deep negative temperatures tend to be unstable [1]. We used a set of 10 positive SARS-CoV-2 for evaluating the effect of number of freeze/thaw cycles on the detection of SARS-CoV-2 by rapid antigen, testing on nasopharyngeal samples in virus transmission medium (VTM). This study showed that the nucleocapsid antigen SARS-CoV-2 remained detectable and over 5 FT cycles (without different significant and $p > 0.05$). Moreover, our study results proved that retroproductive SARS-CoV-2 clinical samples can be used as the evaluation panel for quality control of in vitro diagnostic test kits detecting SARS-CoV-2 after 5 freeze/thaw cycles.

Keywords: SARS-CoV-2, antigen, nasopharyngeal swab, freeze/thaw cycles, rapid diagnostic test.

* Corresponding author

E-mail address: huongvu.nicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i4.57>

ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA KHÁNG NGUYÊN SARS-CoV-2 TRONG MẪU LÂM SÀNG SAU CÁC CHU KỲ TAN BĂNG

Phạm Thị Hồng Thủy, Vũ Thị Thu Hương*, Phạm Thị Minh

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

Nhận ngày 3 tháng 11 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 24 tháng 11 năm 2022

Tóm tắt

Bộ mẫu chuẩn cho đánh giá hiệu quả chẩn đoán (độ nhạy, độ đặc hiệu...) là một tập hợp các mẫu có chứa tải lượng vi rút SARS-CoV-2 khác nhau. Một số nghiên cứu cho thấy nồng độ kháng nguyên trong mẫu lâm sàng dương tính với SARS-CoV-2 sau thời gian dài bảo quản ở nhiệt độ âm sâu có xu hướng thiếu ổn định[1]. Chúng tôi sử dụng 10 mẫu bệnh phẩm dương tính với SARS-CoV-2 để đánh giá ảnh hưởng của các chu kỳ tan băng tới sự phát hiện SARS-CoV-2 bằng test nhanh kháng nguyên trên mẫu dịch tỵ hầu trong môi trường vận chuyển vi rút (Virus transmission medium- VTM). Kết quả nghiên cứu cho thấy kháng nguyên vỏ nhân (nucleocapsid- N) của vi rút trong mẫu nghiên cứu vẫn có thể phát hiện được sau 5 lần tan đông (không có sự khác biệt thống kê với $p > 0,05$). Nghiên cứu đã chứng minh được các mẫu bệnh phẩm bảo quản lạnh có thể sử dụng cho đánh giá chất lượng các sinh phẩm chẩn đoán nhanh theo nguyên lý phát hiện kháng nguyên SARS-CoV-2 sau 5 lần tan đông.

Từ khoá: SARS-CoV-2, kháng nguyên, dịch tỵ hầu, chu kỳ tan băng/đông băng, test nhanh.

1. Đặt vấn đề

COVID-19 là tên gọi chính thức của bệnh đường hô hấp cấp tính (Severe acute respiratory syndrome) do chủng mới của vi rút corona (SARS-CoV-2) gây nên[2]. Triệu chứng thường gặp ở người bệnh mắc COVID-19 bao gồm sốt, ho, khó thở, đau đầu, đau cơ. Từ một vụ dịch gồm 27 ca viêm phổi nặng ở Vũ Hán, vi rút SARS-CoV-2 đã lây lan nhanh chóng và trở thành một đại dịch Toàn cầu. Tính tới tháng 7 năm 2022 đã có hơn 567 triệu người mắc COVID-19 trong đó có 6,3 triệu người đã tử vong [3].

Các phương pháp sinh học phân tử như Realtime RT-PCR (rRT-PCR) thường được sử dụng để chẩn đoán phát hiện vi rút SARS-CoV-2 ở thời điểm bắt đầu bùng phát dịch COVID-19(4). Mặc dù đây là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhất tuy nhiên lại khó tiếp cận với nhiều quốc gia. Do đó phương pháp chẩn đoán nhanh thông qua phát hiện kháng nguyên SARS-CoV-2 đã được nghiên cứu và phát triển bùng nổ với gần 100 công ty và nhà sản xuất trên toàn thế giới[2].

Với khoảng 958 bộ sinh phẩm xét nghiệm theo nguyên lý kháng nguyên trong đó xét nghiệm nhanh (Rapid diagnostic test –RDT) chiếm khoảng 96% đã được đăng ký lưu hành trên toàn thế giới, trong đó có 33 bộ sinh phẩm đã được cấp số đăng ký và cấp giấy phép nhập khẩu tại Việt Nam(5, 6). Các test nhanh thường hướng tới phát hiện kháng nguyên vỏ nhân (nucleocapsid-protein N) trong bệnh phẩm lâm sàng, tuy nhiên cũng có một số bộ sinh phẩm sử dụng protein vỏ gai (spike- S) hoặc kết hợp cả hai [7]. Phần lớn các bộ test nhanh kháng nguyên chẩn đoán chính xác trên mẫu bệnh phẩm có tải lượng vi rút cao (Giá trị $Ct \leq 25$ hay > 106 genome copies của vi rút/ mL) lấy ở thời điểm từ 1 đến 3 ngày trước khi khởi phát triệu chứng hoặc trong vòng 5 đến 7 ngày đầu kể từ khi có triệu chứng[2]. Tuy nhiên sau 7 ngày mắc COVID-19 độ nhạy của các kit thường giảm khi tải lượng vi rút giảm[2]. Do tính đa dạng về chủng loại nên trước khi cấp phép lưu hành và sử dụng khẩn cấp cần đánh giá và thẩm định các chỉ tiêu kỹ thuật của

các bộ sinh phẩm test thử nhanh trên bộ mẫu chuẩn từ bệnh phẩm dương tính và âm tính với SARS-CoV-2. Bộ mẫu chuẩn cho đánh giá hiệu quả chẩn đoán (độ nhạy, độ đặc hiệu...) là một tập hợp các mẫu có chứa tải lượng vi rút SARS-CoV-2 khác nhau tương ứng với các thời điểm trước và sau khi khởi phát triệu chứng ở người mắc COVID-19. Các mẫu này có thể là các mẫu tươi, thu thập trực tiếp từ những người đã được xác định mắc và nghi ngờ mắc COVID-19 hoặc sử dụng các mẫu hồi cứu (mẫu đã được thu thập từ trước, bảo quản lạnh và có đầy đủ hồ sơ xác định đặc tính) [8]. Theo yêu cầu của WHO, mẫu hồi cứu sử dụng cho đánh giá hiệu quả chẩn đoán của các bộ sinh phẩm cần phải được đánh giá tính ổn định trong quá trình bảo quản [8]. Một số nghiên cứu cho thấy nồng độ kháng nguyên trong mẫu lâm sàng dương tính với SARS-CoV-2 sau thời gian dài bảo quản ở nhiệt độ âm sâu có xu hướng thiếu ổn định. Trong khi giá trị Ct N1 có xu hướng ổn định qua thời gian bảo quản đông lạnh dài trong khi nồng độ kháng nguyên có xu hướng thiếu

ổn định hơn [1]. Tuy nhiên test nhanh vẫn cho kết quả đồng thuận dương tính xuyên suốt quá trình bảo quản ở âm sâu [1]. Do vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu này để đánh giá tính ổn định của mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với SARS-CoV-2 trong môi trường vận chuyển vi rút (VTM), theo dõi độ ổn định của mẫu sau 5 lần tan đông và bảo quản ở nhiệt độ -70°C trong 3 tháng.

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1 Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là mẫu bệnh phẩm tẩm bông dịch ty hầu trong môi trường VTM dương tính với SARS-CoV-2. Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kiểm định Sinh phẩm Y tế, Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế từ tháng 6 năm 2022 đến tháng 8 năm 2022

2.2 Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm

2.3 Vật liệu phục vụ nghiên cứu

2.3.1 Mẫu thử và mẫu chuẩn

Nghiên cứu sử dụng mẫu chuẩn quốc tế lần thứ nhất- WHO- RNA SARS-

CoV-2. Mã NIBSC: 20/146- hàm lượng sau khi hoàn nguyên là $7,70\log_{10}$ IU/mL.

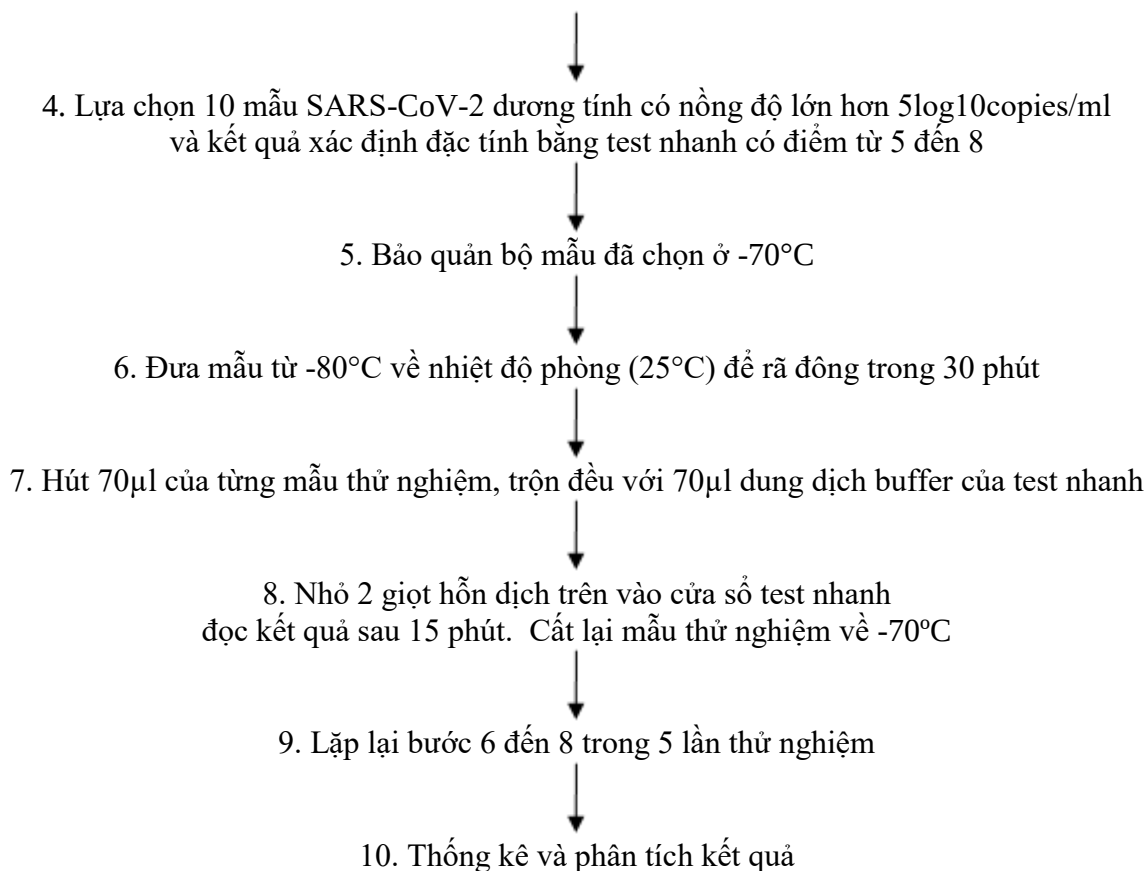
Mẫu thử nghiệm là 12 mẫu hồi cứu tăm bông dịch ty hầu từ bệnh nhân mắc COVID-19 trong môi trường VTM thu thập từ 12 bệnh nhân dương tính với SARS-CoV-2 đã được khẳng định bằng phương pháp Real-time PCR và dung dịch nền mẫu pha loãng là mẫu hỗn bệnh phẩm dịch ty hầu âm tính với SARS-CoV-2 (thu thập từ tháng 9 năm 2021).

2.3.2 Thiết bị, hóa chất và dụng cụ
Hệ thống Real-time PCR abCycler Q-AIT Biotech, tủ lạnh, micropipette, tủ an toàn sinh học cấp

II các loại đã được hiệu chuẩn hàng năm theo ISO/IEC 17025. Hóa chất dùng cho tách chiết RNA SARS-CoV-2 từ mẫu dịch ty hầu là QIAamp Viral RNA mini kit (Mã: 52906). Định lượng tương đối bằng sinh phẩm DiaplexQTM Novel Coronavirus (2019-nCoV) detection kit (đã được FDA cấp phép cho sử dụng khẩn cấp). Sử dụng sinh phẩm test nhanh NADAL[®] COVID-19 Ag Test để kiểm tra sự có mặt của kháng nguyên nucleocapsid SARS-CoV-2 trong mẫu sau mỗi chu kỳ tan băng/ đông băng.

2.4 Quy trình nghiên cứu

1. Lựa chọn 12 mẫu tăm bông dịch ty hầu SARS-CoV-2 có giá trị Ct nằm trong khoảng từ 21-22
- ↓
2. Sử dụng 100 μ l pha loãng theo tỷ lệ 1/10 với nền mẫu dịch ty hầu âm tính để được 1ml mẫu ứng viên có Ct ước lượng nằm trong khoảng từ 24-28
- ↓
3. Tách chiết mẫu trên,
Kiểm tra lại nồng độ RNA SARS-CoV-2 bằng Realtime-PCR



2.4.1 Tạo mẫu thử nghiệm

Lựa chọn 12 mẫu dịch tỵ hầu SARS-CoV-2 có giá trị Ct nằm trong khoảng từ 21-22. Sử dụng 100µl pha loãng theo tỷ lệ 1/10 với 900 µl nền mẫu dịch tỵ hầu âm tính để được 1ml mẫu thử nghiệm có Ct ước lượng nằm trong khoảng từ 24-28.

2.4.2 Tách chiết các mẫu ứng viên để định lượng nồng độ trước khi pha loãng:

Sử dụng 140µl hỗn dịch mẫu đã pha tách chiết bằng sinh phẩm QIAamp Viral RNA mini kit (Mã: 52906), thu

mỗi mẫu 80µl RNA tinh sạch. Mẫu sau khi tách chiết được bảo quản ở tủ -40°C.

2.4.3 Kiểm tra nồng độ RNA SARS-CoV-2 của các mẫu ứng viên đã pha loãng

Các mẫu sau khi tách chiết được đưa ra khỏi điều kiện trữ đông (-40°C) sau đó thực hiện quá trình tan đông bằng cách để ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 30 phút. 5µl RNA sau khi tan đông hoàn toàn được đưa vào phản ứng Real-time PCR.

Mẫu ứng viên được thực hiện định lượng nồng độ tương đối khi sử dụng dải pha loãng của mẫu chuẩn quốc tế RNA SARS-CoV-2 (Mã NIBSC: 20/146) và sinh phẩm DiaplexQTM Novel Coronavirus (2019-nCoV) detection kit (Mã SQD52-K100-Solgent). Dựa vào nồng độ chuẩn xây dựng phương trình tuyến tính bậc nhất thể hiện mối tương quan giữa nồng độ RNA SARS-CoV-2 của mẫu chuẩn và chu kỳ ngưỡng. Từ đó suy ra nồng độ RNA SARS-CoV-2 của mẫu theo đơn vị quốc tế IU/ml.

2.4.5 Lựa chọn mẫu cho bộ mẫu thử nghiệm độ ổn định

Mẫu cho thử nghiệm độ ổn định được lựa chọn từ mẫu dương tính yếu với SARS-CoV-2 có nồng độ lớn hơn 5log₁₀ copies/ml (là giới hạn phát hiện của test nhanh NADAL COVID-19 Ag test đối với các chủng Alpha (B.1.1.7), Gamma (P1), Delta (B.1617.2), Omicron(BA.1) và kết quả khi thử bằng test nhanh NADAL COVID-19 Ag test có điểm từ 5 đến 8 khi đánh giá bằng thang màu (colormetric scale).

2.4.5 Kiểm tra độ ổn định của kháng nguyên SARS-CoV-2 bằng test nhanh

Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất test nhanh NADAL® COVID-19 Ag. Hút 70µl của từng mẫu thử nghiệm, trộn đều với 70µl dung dịch buffer của test nhanh theo tỷ lệ 1:1. Nhỏ 2 giọt hỗn dịch trên vào cửa sổ test nhanh. Đọc kết quả sau 15 phút. Lặp lại quá trình trên trong 5 lần thử nghiệm. Kết quả được đánh giá theo đậm độ của vạch thử (T) so với thang màu chuẩn (colormetric scale) khi nhìn bằng mắt thường và cho điểm từ 1 (âm tính) đến 10 (dương tính rất mạnh) bởi 2 kỹ thuật viên. Sau đó hình ảnh kết quả test nhanh được chụp lại và chuyển đổi sang định dạng grayscale sử dụng phần mềm Image J, cường độ đậm màu (intensity) của vạch thử T (TL) và vạch chứng C (CL) được đo lường sử dụng phần mềm Image Lab (Bio-rad) version 6.0.1. Tính toán tỷ lệ TL/CL cho mỗi mẫu thử nghiệm và từng lần thử nghiệm. Thống kê lại kết quả.

	1
	2
	3
	4
	5
	6
	7
	8
	9
	10

Hình 1: Thang màu (colormetric scale)

2.5. Xử lý và phân tích số liệu

Các dữ liệu điểm của các mẫu và tỷ lệ TL/CL được ghi nhận lại bằng excel. Số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm SPSS 22.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Phép thử Friedman sử dụng để so sánh sự dao động của giá trị TL/CL qua các chu kỳ tan băng. Phép thử Wilcoxon được sử dụng làm phép kiểm tra post hoc khi thống kê kiểm tra của Friedman thu được có ý nghĩa. Giá trị P nhỏ hơn 0,05 được mô tả là có ý nghĩa về mặt thống kê.

2.6. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này sử dụng mẫu hồi cứu từ đề tài: “Thử nghiệm lâm sàng khay thử xét nghiệm định tính kháng nguyên SARS-CoV-2 Ninonasal” và “Thử nghiệm lâm sàng khay thử xét nghiệm định tính kháng nguyên NG Test/ SARS-CoV-2 Ag” được thông qua hội đồng đạo đức ngày 18/9/2021.

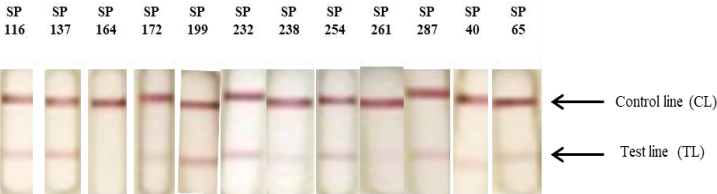
3. Kết quả

3.1 Kết quả kiểm tra lại đặc tính của các mẫu ứng viên sau khi pha loãng

Kết quả định lượng nồng độ RNA SARS-CoV-2 và kết quả test nhanh các mẫu được thể hiện trong bảng 1. 12 mẫu đều có nồng độ trung bình 2 gen lớn hơn 5log10 IU/ml. Tuy nhiên có 2 mẫu có điểm khi đánh giá bằng test nhanh dưới 5 là mẫu SP164 và SP261. Do đó 2 mẫu này không được lựa chọn để đưa vào bộ mẫu đánh giá độ ổn định.

Bảng 1: Kết quả xác định đặc tính của các mẫu ứng viên cho thiết lập bộ mẫu đánh giá độ ổn định

Kí hiệu mẫu	Giá trị Ct			Nồng độ RNA SARS-CoV-2 IU/ml			Kết quả test nhanh NADAL® COVID-19 Ag
	Gen N	Gen Orf1ab	Giá trị trung bình 2 gen	Gen N	Gen Orf1ab	Giá trị trung bình 2 gen	
SP116-*	23,04	23,18	23,11	4,2E+06	3,8E+06	4,0E+06	8
SP137*	22,91	23,20	23,05	4,6E+06	3,7E+06	4,1E+06	8
SP164*	26,14	26,32	26,23	5,2E+05	4,3E+05	4,7E+05	3
SP172*	26,86	27,36	27,11	3,2E+05	2,1E+05	2,6E+05	6
SP199*	22,84	22,93	22,88	4,8E+06	4,5E+06	4,6E+06	8
SP232*	25,03	25,40	25,21	1,1E+06	8,1E+05	9,5E+05	6
SP238*	27,68	27,84	27,76	1,8E+05	1,5E+05	1,7E+05	6
SP254*	26,06	26,47	26,27	5,4E+05	3,9E+05	4,7E+05	6
SP261*	27,87	28,15	28,01	1,6E+05	1,2E+05	1,4E+05	4
SP287*	25,40	25,49	25,45	8,5E+05	7,6E+05	8,0E+05	5
SP40*	24,24	24,62	24,43	1,9E+06	1,4E+06	1,6E+06	6
SP65*	26,50	26,57	26,54	4,0E+05	3,6E+05	3,8E+05	7



Hình 2: Kết quả test nhanh kháng nguyên của 12 mẫu sử dụng sinh phẩm NADAL® COVID-19 Ag

3.2. Kết quả độ ổn định của bộ mẫu sau quá trình tan đông

Kết quả đọc bằng mắt thường 10 mẫu bằng test nhanh qua từng lần tan đông được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Kết quả đánh giá bằng mắt thường

Ký hiệu mẫu	Kết quả khi đọc bằng mắt thường					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5
SP116	8	8	8	7	7	8
SP137	8	8	8	8	8	8
SP172	6	7	7	6	6	5
SP199	8	9	9	8	8	9
SP232	6	8	8	7	7	7

SP238	6	6	6	5	5	5
SP254	6	7	7	6	6	6
SP287	5	8	8	6	6	6
SP40	6	8	8	6	6	6
SP65	7	8	7	6	6	6

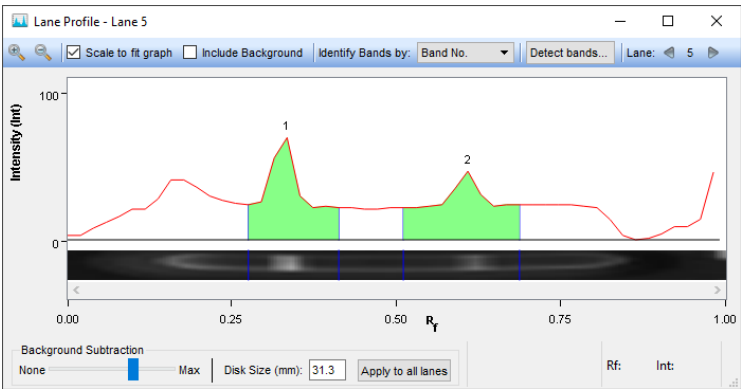
Chú thích: T: chu kỳ tan băng

Không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ TL/CL của các mẫu giữa lần thứ 5 tan băng và thời điểm 0 ($p = 0,575$) (bảng 3). Hệ số biến thiên giữa các lần thử nghiệm dao động trong khoảng dưới 20%. Mẫu 137 có kết quả khi đọc bằng mắt thường đồng nhất giữa các lần thử nghiệm cũng như kết quả phân tích bằng phần mềm và có hệ số biến thiên nhỏ nhất là 7,09%.

Bảng 3: Giá trị TL/CL của 10 mẫu sau mỗi lần tan băng

Ký hiệu mẫu	Kết quả khi đọc bằng mắt thường						Mean	SD	CV%
	T0	T1	T2	T3	T4	T5			
SP116	0,41	0,39	0,50	0,38	0,51	0,37	0,43	0,06	14,52
SP137	0,42	0,45	0,38	0,39	0,45	0,42	0,42	0,03	7,09
SP172	0,30	0,30	0,39	0,30	0,39	0,32	0,33	0,04	13,35
SP199	0,41	0,52	0,59	0,41	0,56	0,66	0,53	0,10	19,11
SP232	0,37	0,39	0,50	0,32	0,39	0,33	0,38	0,06	16,74
SP238	0,35	0,46	0,46	0,31	0,32	0,35	0,37	0,07	18,30
SP254	0,55	0,56	0,43	0,40	0,40	0,36	0,45	0,08	18,73
SP287	0,35	0,41	0,40	0,34	0,31	0,42	0,37	0,04	11,29
SP40	0,36	0,40	0,42	0,35	0,32	0,41	0,38	0,04	10,55
SP65	0,41	0,56	0,46	0,33	0,39	0,44	0,43	0,08	17,92

Chú thích: T: chu kỳ tan băng



Hình 3: Hình ảnh phân tích độ đậm của vạch chứng (C) và vạch thử (T) bằng phần mềm Image Lab (Biorad)

Kết quả định lượng mẫu sau 5 lần tan đông cho thấy tải lượng vi rút không thay đổi (Bảng 4).

Bảng 4: Kết quả định lượng bộ mẫu đánh giá độ ổn định sau 5 lần tan đông

Kí hiệu mẫu	Giá trị Ct			Nồng độ RNA SARS-CoV-2 IU/ml		
	Gen N	Gen Orf1ab	Giá trị trung bình 2 gen	Gen N	Gen Orf1ab	Giá trị trung bình 2 gen
SP116	22,72	22,74	22,73	5,2E+06	5,1E+06	5,1E+06
SP137	22,72	23,22	22,97	5,2E+06	3,7E+06	4,4E+06
SP172	26,55	27,14	26,84	3,9E+05	2,4E+05	3,2E+05
SP199	23,71	24,04	23,87	2,7E+06	2,1E+06	2,4E+06
SP232	24,35	24,80	24,57	1,7E+06	1,2E+06	1,5E+06
SP238	27,42	27,73	27,57	2,2E+05	1,6E+05	1,9E+05
SP254	25,78	26,43	26,11	6,6E+05	4,0E+05	5,3E+05
SP287	25,29	25,61	25,45	9,1E+05	7,0E+05	8,1E+05
SP40	25,59	26,45	26,02	7,5E+05	3,9E+05	5,7E+05
SP65	26,36	26,65	26,51	4,4E+05	3,4E+05	3,9E+05

4.Bàn luận

Với sự bùng nổ đa dạng của các loại test nhanh nhằm ứng phó với đại dịch COVID-19 thì các bộ mẫu chuẩn, mẫu tham chiếu là công cụ

giám sát chất lượng hữu hiệu trong đánh giá hiệu năng của các sinh phẩm chẩn đoán. Ngoài các bộ mẫu chuẩn của các cơ quan kiểm định của các nước và tổ chức Y tế thế giới, một số công ty thương mại

cũng sản xuất các bộ mẫu phục vụ cho việc phát triển và kiểm định sinh phẩm chẩn đoán kháng nguyên như Seracare, Zeptometric (Mỹ). Số lượng, cơ cấu và đặc tính của các mẫu cho thẩm định hiệu quả chẩn đoán của các bộ sinh phẩm phụ thuộc vào từng điều kiện thu thập mẫu của từng vùng, từng quốc gia. Một số yếu tố trong quá trình thực nghiệm có thể ảnh hưởng tới kết quả đánh giá như điều kiện bảo quản mẫu, sử dụng mẫu đông băng [9]. Quá trình đông lạnh / tan băng, kháng nguyên protein có thể bị tổn thương cấu trúc ở một mức độ nào đó có khả năng dẫn đến mất tính khả dụng của epitope hoặc giảm ái lực của liên kết epitope / paratope[9]. Nghiên cứu của Valentin Parvu cho thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê về độ nhạy của test nhanh kháng nguyên khi đánh giá trên mẫu tươi (75,3% (95%CI: 70,8-79,3); n=9666) và mẫu hồi cứu (70,9% (95%CI: 61,0-79,1); n=3307) cho 133 bộ test nhanh[9]. Do đó theo yêu cầu của tổ chức Y tế thế giới (WHO) cũng như cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) trước khi

sử dụng để đánh giá và kiểm soát chất lượng các bộ sinh phẩm cần tiến hành các thử nghiệm chứng minh độ ổn định của các mẫu lâm sàng trong các điều kiện thực tế(8). Trường hợp sử dụng mẫu hồi cứu đã đông băng cho các đánh giá lâm sàng thì cần tiến hành các thử nghiệm chứng minh độ ổn định và tính toàn vẹn trong thời gian bảo quản và điều kiện tan băng/ đông băng nhiều lần[8].

Một số nghiên cứu so sánh cho thấy việc đánh giá độ nhạy của sinh phẩm chẩn đoán kháng nguyên nhanh phụ thuộc vào tải lượng vi rút có trong mẫu. Giá trị RT-qPCR Ct xấp xỉ 25 và tải lượng vi rút xấp xỉ 1×10^5 được lựa chọn là giá trị cutoff cho đánh giá độ nhạy test nhanh[10]. Bộ mẫu sử dụng trong nghiên cứu đánh giá của chúng tôi có 4 mẫu cho giá trị Ct <25, 2 mẫu có giá trị trong khoảng 25 và 4 mẫu cho giá trị $30 > Ct > 25$ và tải lượng vi rút $> 10^5$. Hai mẫu bị loại không đưa vào thử nghiệm mặc dù nồng độ RNA lớn hơn $5 \log_{10}$ IU/ml, tuy nhiên kết quả test nhanh dưới 5 có thể do độ nhạy của test nhanh có sự khác biệt giữa các

chúng vi rút SARS-CoV-2 theo công bố của hãng sản xuất test.

Chúng tôi cũng nhận thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ độ đậm bằng TL/CL của các mẫu giữa lần thứ 5 tan băng và thời điểm 0 ($p = 0,575$) cho thấy hàm lượng kháng nguyên của vi rút không có sự thay đổi nhiều khi mẫu tan băng nhiều lần. Trong khi kết quả từ nghiên cứu inhouse của BD-IDS trên 2 bộ sinh phẩm kháng nguyên nhanh đã được cấp phép cho thấy độ đậm của vạch thử T giảm theo từng chu kì đông băng/tan băng của mẫu[10]. Mặc dầu vậy kết quả đọc bằng mắt thường có sự giao động mạnh trên các mẫu có nồng độ thấp (mẫu SP172, SP287, SP65)

5. Kết luận

Nghiên cứu đã chứng minh được số lần tan đông mẫu lâm sàng dịch ty hầu có thể lên tới 05 lần mà không làm thay đổi đặc tính mẫu và không ảnh hưởng đến kết quả đánh giá và so sánh tiêu chí độ nhạy lâm sàng trong quá trình kiểm định các sinh phẩm chẩn đoán phát hiện kháng nguyên nhanh SARS-CoV-2.

Tài liệu tham khảo

- [1] Frediani JK, McLendon KB, Westbrook A, Gillespie SE, Wood A, Baugh TJ, et al. SARS-CoV-2 reliably detected in frozen saliva samples stored up to one year. PLoS One. 2022;17(8):e0272971.
- [2] [Internet] WHO. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. 6 October 2021.
- [3] [Internet] WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update 27 July 2022 [Available from: <https://covid19.who.int/>].
- [4] [Internet] WHO. Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities [2021 June 25] [Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021>].
- [5] [Internet] FIND. Test directory [Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/test-directory/>].
- [6] [Internet] Bộ Y tế. Danh sách sinh phẩm/trang thiết bị y tế chẩn đoán in vitro xét nghiệm SARS-CoV-2 đã được cấp số đăng ký lưu hành, cấp giấy phép nhập khẩu 2021 [Available from: <https://medinet.gov.vn/thong-bao/danh-sach-cac-sinh-phamtrang-thiet-bi-y-te-chan-doan-in-vitro-xet-nghiem-vi-rut-cmobile1046-63886.aspx>].
- [7] Giri B, Pandey S, Shrestha R, Pokharel K, Ligler FS, Neupane BB. Review of analytical performance of COVID-19 detection methods. Anal Bioanal Chem. 2021;413(1):35-48.
- [8] Organization WH. Instructions and requirements for Emergency Use Listing (EUL) Submission: In vitro diagnostics detecting SARS-CoV-2 nucleic acid or antigen 2022 [Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/PQDx-347-version-4>].
- [9] Valentin Parvu DSG, Joseph Mann. Factors that Influence the Reported Sensitivity of Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2. Frontiers in Microbiology. 05 October 2021;12:714242.

[10] Valentin Parvu DSG, Joseph Mann, Yu-Chih Lin, Dorsey Mills, Lauren Cooper, Jeffrey C. Andrews, Yukari C. Manabe, Andrew Pekosz, Charles K. Cooper. Clinical and

experimental factors that affect the reported performance characteristics of rapid testing for SARS-CoV-2. 2021.