

ASSESSMENT OF COMPARISONS BETWEEN REALTIME PCR SYSTEMS USED FOR EVALUATING THE QUALITY OF DIAGNOSTIC PRODUCTS

**Dinh Thi Phuong Thao^{1*}, Pham Thi Hong Thuy, Vu Thi Thu Huong,
Nguyen Thi Tuong An, Vu Thi Phuong**

** The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

Received 27 February 2023

Accepted 24 March 2023

Abstract: Diagnostic kits based on Realtime PCR assay are commonly used in laboratory testing. Nowadays, there are various types of Realtime PCR system which differ in the amplification, fluorogenic excitation source and detection sections. As a result, the outcome of the same exam may differ depending on the system. In this study, we use in vitro experimental descriptive research method to evaluate the similarity of 04 Realtime PCR device systems being used at the National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB) including ABI7500; Realtime PCR CFX96 Touch Bio-Rad; abCyclerQ (AIT Biotech) and QuantStudioTM5. The study was carried out with the aim of comparing the results on limit of detection (LOD) between 04 these Real-time PCR systems using the same reference standards and chemicals. Study method and results calculation were conducted in compliance with the standard operating procedure of the Department of Biologicals Quality control, NICVB. The LOD results of 04 equipment systems are 5.2 RNA copies/reaction (95%CI: 3.3-8.0 RNA copies/reaction), 10.77 RNA copies/reaction (95% CI: 7.62-15.24 RNA copies/reaction), 14.86 RNA copies/reaction (95% CI: 10.71-20.64 RNA copies/reaction), 10.04 RNA copies/reaction (95%CI: 7.06-14.30 RNA copies/reaction). The LODs of 04 surveyed Realtime PCR systems are all in the range of 1-3xLOD compared to the reference LOD. According to the research results, it showed that 04 surveyed Realtime PCR systems give similar results. Therefore, it is possible to use interchangeably in 04 ABI7500 equipment systems; QuantStudioTM5; Realtime PCR system CFX96 Touch Bio-Rad and abCyclerQ (AIT biotech) in evaluating the quality of diagnostic biological products using Realtime PCR technique.

Keywords: Realtime PCR assay; Detection limit; ABI7500; QuantStudioTM5; Realtime PCR system CFX96 Touch Bio-Rad; and abCyclerQ (AIT biotech).

* Corresponding author

E-mail address: dinhphuongthao39c@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i1.77>.

ĐÁNH GIÁ TƯƠNG ĐỒNG GIỮA CÁC THIẾT BỊ REALTIME PCR SỬ DỤNG TRONG KIỂM ĐỊNH CHẤT LƯỢNG SINH PHẨM CHẨN ĐOÁN

**Đinh Thị Phương Thảo*, Phạm Thị Hồng Thúy, Vũ Thị Thu Hương,
Nguyễn Thị Tường An, Vũ Thị Phượng**

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

Nhận ngày 27 tháng 2 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 24 tháng 3 năm 2023

Tóm tắt: Realtime PCR là kỹ thuật phổ biến trong các bộ sinh phẩm chẩn đoán sinh học phân tử sử dụng trên một hoặc nhiều hệ thống thiết bị Realtime PCR khác nhau. Hiện nay cũng có nhiều loại hệ thống realtime PCR, mỗi loại lại khác nhau về hệ thống khuếch đại, nguồn kích thích và phát hiện huỳnh quang, có thể dẫn đến các sai lệch kết quả khi đánh giá chất lượng sinh phẩm. Chúng tôi sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả thực nghiệm in vitro cho đánh giá sự tương đồng thiết bị của 04 hệ thống Realtime PCR đang sử dụng tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB) bao gồm ABI7500; Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad; abCyclerQ (AIT biotech) và QuantStudio™5. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu so sánh kết quả giới hạn phát hiện (LOD) trên 04 hệ thống Realtime PCR khác nhau trên cùng mẫu chuẩn và hóa chất sinh phẩm. Phương pháp và tính toán kết quả theo quy trình chuẩn của khoa Sinh phẩm Y tế, NICVB. Kết quả LOD của 04 hệ thống thiết bị lần lượt là 5,2 RNA copies / phản ứng (95%CI: 3,3-8,0 RNA copies/phản ứng), 10,77 RNA copies/phản ứng (95%CI: 7,62-15,24 RNA copies/phản ứng), 14,86 RNA copies/phản ứng (95%CI: 10,71-20,64 RNA copies/phản ứng), 10,04 RNA copies/phản ứng (95%CI: 7,06-14,30 RNA copies/phản ứng). LOD của 04 thiết bị Realtime đều nằm trong khoảng 1-3xLOD so với LOD tham chiếu. Thông qua kết quả nghiên cứu cho thấy 04 hệ thống thiết bị Realtime PCR đều cho kết quả tương đồng với nhau. Vì vậy, có thể sử dụng thay thế lẫn nhau trong 04 hệ thống thiết bị ABI7500; QuantStudio™5; Hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad và abCyclerQ (AIT biotech) trong đánh giá chất lượng sinh phẩm chẩn đoán sử dụng kỹ thuật Realtime PCR.

Từ khoá: kỹ thuật Realtime PCR; tương đồng thiết bị; ABI7500; QuantStudio™5; Hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad và abCyclerQ (AIT biotech); Giới hạn phát hiện.

1. Đặt vấn đề

PCR là thử nghiệm nhân bản một đoạn DNA trong ống nghiệm dựa vào các chu kỳ nhiệt. Thử nghiệm thường được thực hiện trong ống nghiệm nhỏ chứa dung dịch phản ứng (gọi là PCR mix). Tuy nhiên, kỹ thuật PCR thông thường sau khi hoàn tất khuếch đại đoạn DNA đích người thực hiện thử

nghiệm cần làm thêm một số bước để đọc kết quả sản phẩm mong muốn trong ống nghiệm có phải ứng hay không (giai đoạn sau PCR). Hiện nay có một kỹ thuật không cần người làm thử nghiệm phải thực hiện các bước sau PCR mà có thể xác định kết quả sau khi phản ứng kết thúc. Đó là kỹ thuật realtime PCR. Realtime PCR là kỹ

thuật là kết quả khuếch đại DNA đích hiển thị được ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt phản ứng, do đó kỹ thuật này được gọi realtime. Về thành phần của phản ứng Realtime PCR cơ bản sẽ giống PCR thường nhưng sẽ có thêm chất huỳnh quang.

Kỹ thuật Realtime PCR được sử dụng phổ biến trong các bộ sinh phẩm chẩn đoán (như các bệnh truyền nhiễm, ung thư và các bất thường di truyền) và nghiên cứu cơ bản (PCR định lượng được sử dụng với mục đích chính là định lượng số bản phiên mã của gen). Để thực hiện được phản ứng Realtime PCR thì cần có hệ thống máy realtime PCR, hoá chất và thuốc thử cho phản ứng Realtime PCR (chính là chất được thêm vào PCR mix). Nhưng trên thực tế hiện nay có rất nhiều loại máy Realtime PCR khác nhau về cách phát nguồn sáng kích thích và cách ghi nhận ánh sáng huỳnh quang được phát ra từ các ống phản ứng. Một bộ sinh phẩm chẩn đoán có thể thực hiện trên các hệ thống khác nhau. Dao động kết quả cho mỗi thiết bị có thể khác nhau. Sự dao động kết quả có thể ảnh hưởng tới việc kiểm định các sinh phẩm chẩn đoán sinh học phân tử, nhất là khi hệ thống thiết bị đang có tại NICVB khác biệt so với hệ thống thiết bị như khuyến cáo của nhà sản xuất sinh phẩm.

Do vậy, để phục vụ nhu cầu sử dụng thiết bị Realtime PCR cho đánh giá chất lượng các sinh phẩm chẩn đoán sử dụng nguyên lý Sinh học phân tử tại khoa kiểm định Sinh phẩm Y tế - Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế. Chúng tôi tiến hành đánh giá tính tương đồng giữa các thiết bị Realtime PCR phổ biến và hiện có tại NICVB. Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu sau: So sánh kết quả xác định giới hạn phát hiện trên 04 hệ thống máy Realtime PCR bao gồm: ABI7500; QuantStudioTM5; Hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad và

abCyclerQ (AIT biotech) tại NICVB khi sử dụng cùng sinh phẩm tách chiết, cùng mẫu chuẩn quốc tế của vi rút bất hoạt SARS-CoV-2 (Mã: NR-52286- Loạt: 70034991) cùng nền mẫu để pha loãng và cùng sinh phẩm thực hiện phản ứng theo quy trình phát hiện gen E SARS-CoV-2 của WHO- Charité/Berlin đã được công bố.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm nghiên cứu: khoa Kiểm định Sinh phẩm Y tế - Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.

2.2. Nguyên vật liệu phục vụ nghiên cứu:

2.2.1 Mẫu chuẩn, đối tượng nghiên cứu

Mẫu chuẩn quốc tế vi rút bất hoạt SARS-CoV-2 có nồng độ $3,75 \times 10^8$ copies/mL, mã NR-52286, loạt 70034991. Đối tượng nghiên cứu bao gồm 04 hệ thống máy Realtime PCR ABI7500; QuantStudioTM5; Hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad và abCyclerQ (AIT biotech).

2.2.2 Mẫu thử

Sinh phẩm chẩn đoán phát hiện gen E của SARS-CoV-2 theo quy trình Charité/Berlin (WHO): SuperScripTM III Platinum® One step qRT-PCR Kits (hãng sản xuất ThermoFisher Scientific, loạt sử dụng 2327282, hạn dùng 31/08/2023). Trình tự môi/ huỳnh quang được sử dụng là dùng cho tách chiết RNA SARS-CoV-2 từ mẫu dịch tỵ 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.

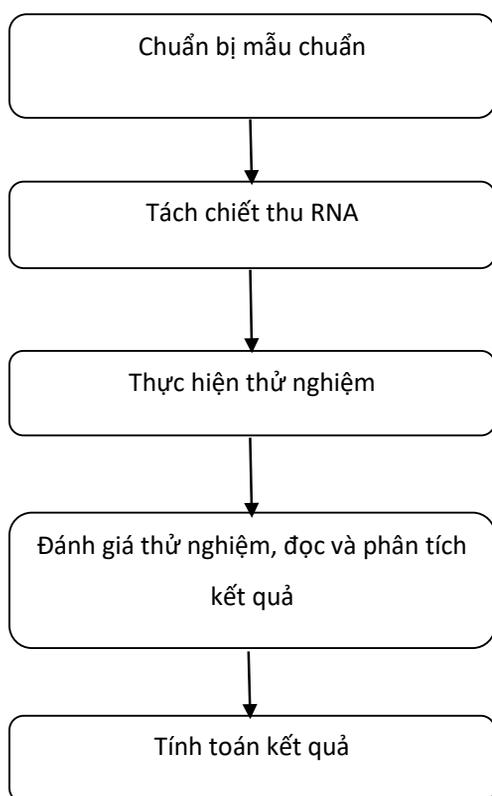
Tên loại	Primer/ probe	Trình tự (theo chiều 5'-3')
E gen	E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
	E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ

2.2.3. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống máy Realtime PCR bao gồm: ABI7500; QuantStudio™5; Hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad và

abCyclerQ (AIT biotech), tủ lạnh âm sâu, máy ly tâm spindown, hood vô trùng, máy lắc tuýp, hệ thống micropipet các loại (đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025)

2.3. Quy trình thực hiện thử nghiệm



Mẫu chuẩn được tách RNA theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit QIAamp VIRAL RNA mini kit. Thu được sản phẩm cuối cùng là 40µl RNA. Tiến hành thực hiện phản ứng Realtime RT-PCR theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm SuperScrip™ III Platinum® One step qRT-PCR Kits. Thành phần phản ứng bao gồm: Nước

(RNase free) 3,6µl; 2X Reaction mix 12,5µl; MgSO4 (50mM) 0,4µl; Primer E_F1 (10µM) 1,0µl; Primer E_R2 (10µM) 1,0µl; Probe E_P1 (10µM) 0,5µl; SSIII/ Taq EnzymeMix 1,0µl. Tổng thể tích Master mix cho mỗi phản ứng là 20µl. Kênh màu huỳnh quang sử dụng FAM cho gen mục tiêu E gene.

Bảng 1: Chu kỳ luân nhiệt đối với máy Realtime PCR

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
RT	55°C	10 phút	1
Kích hoạt Polymerase	94°C	03 phút	1
Khuếch đại	94°C	15 giây	45
	58°C	30 giây	

Xác định giá trị của thử nghiệm

Thử nghiệm được coi là có giá trị khi tuân thủ đúng quy trình (các yếu tố, điều kiện của quá trình thực hiện là đảm bảo, không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm).

Chứng âm PCR và chứng âm tách chiết: sẽ không có tín hiệu huỳnh quang hoặc tín hiệu huỳnh quang > 40, nếu có tín hiệu huỳnh quang < 40 tại các giếng chứng âm chứng tỏ các phản ứng đã bị nhiễm. Khi đó nên làm lại từ giai đoạn tách chiết RNA hoặc pha mix tùy trường hợp.

Mẫu chứng dương: tín hiệu huỳnh quang thu nhận được trước chu kỳ thứ 32 của phản ứng ($Ct < 32$)

Đọc và đánh giá kết quả

Mẫu dương tính: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận trước chu kỳ thứ 40 của phản ứng ($Ct < 40$)

Mẫu âm tính: không có tín hiệu huỳnh quang hoặc tín hiệu huỳnh quang được thu nhận sau chu kỳ thứ 40 của phản ứng ($Ct \geq 40$)

2.4. Thiết kế nghiên cứu và phương pháp tính toán kết quả

Thử nghiệm được bố trí gồm thử nghiệm dò và thử nghiệm khẳng định

Thử nghiệm dò: Tiến hành trên 5 bậc pha loãng nồng độ của mẫu chuẩn quốc tế thành các nồng độ: 1 copies/phản ứng; 2,5 copies/phản ứng; 5 copies/phản ứng; 10 copies/phản ứng; 15 copies/phản ứng. Chạy lặp lại 5 lần cho mỗi nồng độ. Tính số lượng dương tính ở từng nồng độ. Xác định nồng độ thấp nhất trong dải pha loãng cho kết quả 5/5 lần dương tính.

Thử nghiệm khẳng định: Sau khi hoàn thành thử nghiệm dò, tiến hành thử nghiệm khẳng định với 4 nồng độ bao quanh nồng độ thấp nhất trong dải pha loãng cho kết quả 5/5 lần dương tính. Lặp lại 20 lần cho mỗi nồng độ.

Phần mềm phân tích Realtime RT-PCR trên hệ thống ABI 7500: 7500 software ver 2.0.6, trên hệ thống QuantStudioTM5: QuantStudio Design and Analysis ver 1.0.6, trên hệ thống CFX 96 Bio-Rad: Bio-Rad CFX Masetro; abCyclerQ Realtime PCR System: abCyclerQ Realtime PCR System version 1.

Phương pháp tính toán kết quả: giới hạn phát hiện tính số lượng dương tính ở từng nồng độ. Sử dụng phần

mềm PODLOD version 9 để dựng mô hình hồi quy probit, từ đó tính giới hạn phát hiện của quy trình kèm theo 95% khoảng tin cậy.

2.5. Giá trị tham chiếu

Theo khuyến cáo của Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm (the Food and Drug Administration's - FDA), LOD có thể được coi là tương đồng nếu chúng nằm trong khoảng 1 đến 3 lần LOD (1-3xLOD). Nghiên cứu này chúng tôi sử dụng quy trình của quy trình phát hiện gen E SARS-CoV-2 của WHO- Charité/ Berlin đã được công bố. Vì vậy, khoảng giá trị tham chiếu 1-3xLOD là 5,2 -15,6 RNA copies / phản ứng [1]

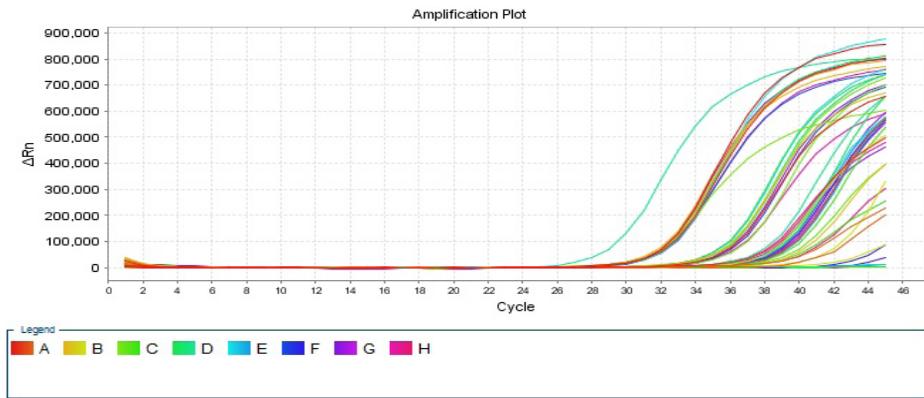
3. Kết quả

3.1. Giới hạn phát hiện trên hệ thống máy ABI7500

Dựa vào báo cáo kết quả thẩm định quy trình “Thẩm định quy trình xác định giới hạn phát hiện sinh phẩm chẩn đoán SARS-CoV-2 bằng phương pháp Realtime RT-PCR” đã được thực hiện năm 2021 trên hệ thống máy ABI7500 khi sử dụng mẫu chuẩn quốc tế của vi rút bất hoạt SARS-CoV-2-Mã: NR-52286- Loạt: 70034991, cùng nền mẫu để pha loãng và cùng sinh phẩm thực hiện phản ứng Realtime PCR được công bố của quy trình của quy trình phát hiện gen E SARS-CoV-2 của WHO- Charité/ Berlin. Thử nghiệm giới hạn phát hiện được thực hiện trên các nồng độ 50 copies/phản ứng; 10 copies/phản ứng; 5 copies/phản ứng; và 1 copies/phản ứng mỗi nồng độ được chạy lặp lại 20 lần ứng. Kết quả như sau:

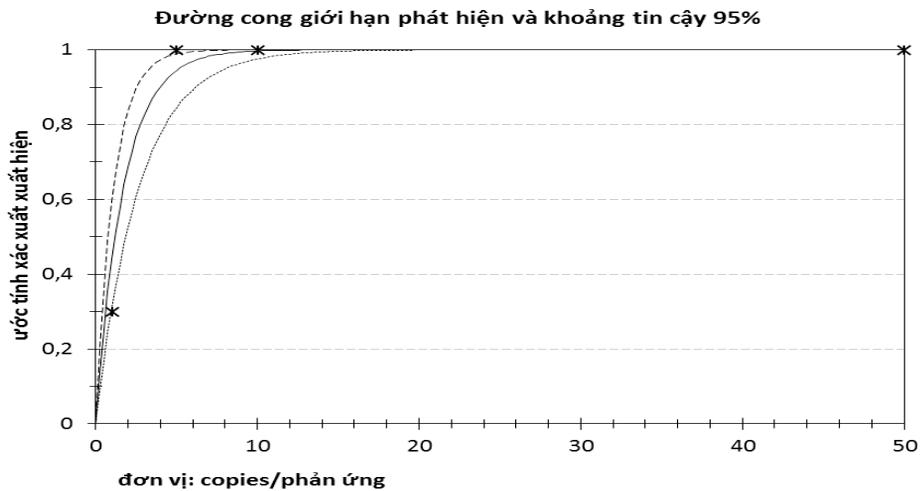
Bảng 2: tổng hợp kết quả giới hạn phát hiện

Nồng độ (copies/ phản ứng)	Số lần thực hiện	Số lần cho kết quả dương tính
50	20	20
10	20	20
5	20	20
1	20	6



Hình 1: Hình ảnh tín hiệu khuếch đại cho thử nghiệm giới hạn phát hiện

Sử dụng phần mềm PODLOD version 9 để tính LOD 95 đạt được kết quả LOD 95= 5,2 copies/phản ứng (95%CI 3,3-8,0 RNA copies/phản ứng)



Hình 2: Biểu đồ phân tích probit

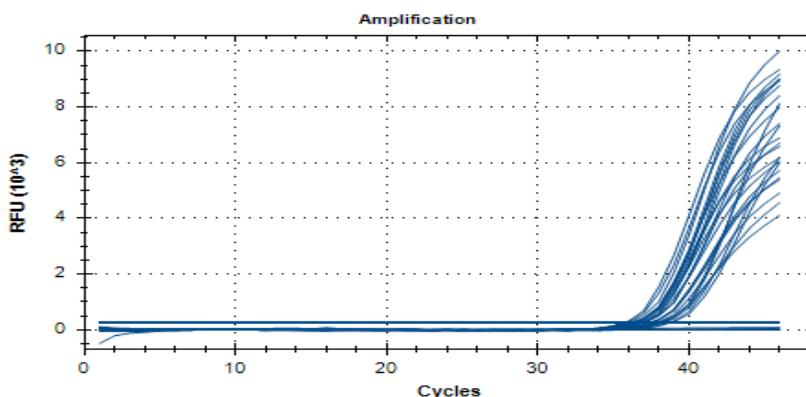
Theo biểu đồ phân tích probit thì xác suất phát hiện virus SARS-CoV-2 của quy trình ở nồng độ 15 copies/phản ứng là 100%. Do vậy, giới hạn phát hiện khi tính bằng phần mềm PODLOD version 9 trên 4 nồng độ 15 copies/phản ứng; 10 copies/phản ứng; 5 copies/phản ứng; và 1 copies/phản ứng vẫn là: 5,2 RNA copies/phản

ứng (95%CI: 3,3-8,0 RNA copies/phản ứng). So sánh với giá trị tham chiếu ta thấy kết quả giới hạn phát hiện trên hệ thống Realtime PCR ABI7500 nằm trong khoảng 1-3xLOD.

3.2. Kết quả thực hiện giới hạn phát hiện trên hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad

Bảng 3: tổng hợp kết quả giới hạn phát hiện

Nồng độ (copies/phản ứng)	Số lần thực hiện	Số lần cho kết quả dương tính
50	20	20
10	20	20
5	20	11
1	20	7



Hình 3: Tín hiệu khuếch đại thử nghiệm khẳng định giới hạn phát hiện trên hệ thống máy Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad

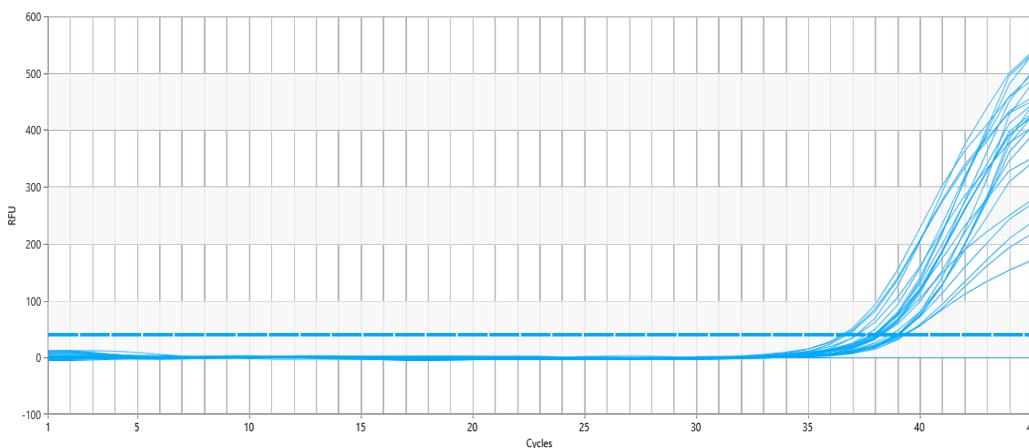
Giới hạn phát hiện gen E SARS-CoV-2 sau khi tính toán bằng phần mềm PODLOD version 9 trên hệ thống máy Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad là: 10,77 RNA copies/phản ứng (95%CI: 7,62-15,24RNA copies/phản ứng). So sánh với giá trị tham chiếu ta thấy kết quả giới hạn

phát hiện trên hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad nằm trong khoảng 1-3xLOD

3.3 Kết quả thực hiện giới hạn phát hiện trên hệ thống máy Realtime PCR abCyclerQ (AIT biotech)

Bảng 4: tổng hợp kết quả giới hạn phát hiện

Nồng độ (copies/phản ứng)	Số lần thực hiện	Số lần cho kết quả dương tính
50	20	19
10	20	17
5	20	13
1	20	7



Hình 4: Tín hiệu khuếch đại thử nghiệm khẳng định giới hạn phát hiện trên hệ thống máy Realtime PCR abCyclerQ (AIT biotech)

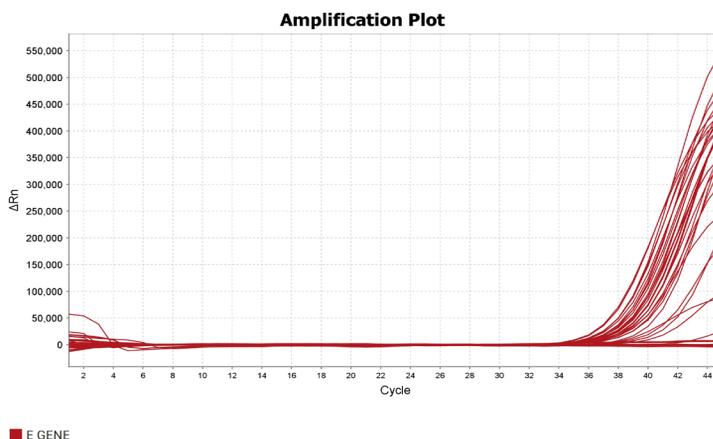
Giới hạn phát hiện gen E SARS-CoV-2 sau khi tính toán bằng phần mềm PODLOD version 9 trên hệ thống máy Realtime PCR abCyclerQ (AIT biotech) là: 14,86 RNA copies/phản ứng (95%CI: 10,71-20,64 RNA copies/phản ứng). So sánh với giá trị tham chiếu ta chiếu kết quả

giới hạn phát hiện trên hệ thống Realtime PCR abCyclerQ (AIT biotech) nằm trong khoảng 1-3xLOD

3.4. Kết quả thực hiện giới hạn phát hiện trên hệ thống máy Realtime PCR QuantStudio™5

Bảng 5: tổng hợp kết quả giới hạn phát hiện

Nồng độ (copies/phản ứng)	Số lần thực hiện	Số lần cho kết quả dương tính
50	20	20
10	20	20
5	20	11
1	20	9



Hình 5: Tín hiệu khuếch đại thử nghiệm khẳng định giới hạn phát hiện trên hệ thống máy Realtime PCR QuanStudio™5

Giới hạn phát hiện gen E SARS-CoV-2 sau khi tính toán bằng phần mềm PODLOD version 9 trên hệ thống Realtime PCR QuanStudio™5 là: 10,04 RNA copies/phản ứng (95%CI: 7,06-14,30 RNA copies/phản ứng). So sánh với giá trị tham chiếu ta chiếu kết quả giới hạn phát hiện trên hệ thống Realtime PCR QuanStudio™5 nằm trong khoảng 1-3xLOD

4. Bàn luận

Phản ứng chuỗi theo thời gian thực Realtime PCR là một kỹ thuật sinh học phân tử ngày càng phổ biến, được ứng dụng ngày càng nhiều trong cả chẩn đoán và nghiên cứu. Để thực hiện được kỹ thuật này thì cần hệ thống máy realtime PCR. Tuy nhiên, có rất nhiều hãng sản xuất máy real-time PCR, các dòng máy phổ biến trên thị trường như ABI, Biorad, Thermo Fisher scientific, Qiagen, Agilent... các hệ thống Realtime PCR ở mỗi hãng sản xuất lại khác nhau về cách phát nguồn sáng kích thích và cách ghi nhận ánh sáng huỳnh quang được phát ra từ các ống phản ứng.

Mỗi bộ sinh phẩm chẩn đoán có thể thực hiện trên các hệ thống khác nhau.

Dao động kết quả cho mỗi thiết bị có thể khác nhau. Sự dao động của kết quả có thể ảnh hưởng tới việc kiểm định các sinh phẩm chẩn đoán, nhất là khi hệ thống thiết bị đang có tại NICVB khác biệt so với hệ thống thiết bị như khuyến cáo của nhà sản xuất sinh phẩm hoặc thiết bị trong quá trình kiểm định có thể xảy ra tình trạng hỏng hóc, cần thay thế hoặc sửa chữa làm chậm trễ tiến trình kiểm định. Vì vậy, việc đánh giá sự tương đồng giữa các thiết bị Realtime PCR có tại NICVB để phục vụ nhu cầu kiểm định chất lượng các sinh phẩm chẩn đoán sử dụng nguyên lý sinh học phân tử là điều hết sức cần thiết.

Theo khuyến cáo của Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm (the Food and Drug Administration's - FDA) việc thẩm định tính tương đồng của các thiết bị Realtime PCR có thể thực hiện trên một quy trình thử nghiệm bằng nghiên cứu so sánh thông qua chỉ tiêu giới hạn phát hiện. Đây cũng là một trong các tiêu chuẩn chất lượng quan trọng của một bộ sinh phẩm chẩn đoán.

Với kết quả của nghiên cứu so sánh giới hạn phát hiện là tương đương giữa các dòng

máy: ABI7500; QuantStudio™5; abCyclerQ (AIT biotech) (sử dụng hệ thống ống 0,2ml) và hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad (sử dụng hệ thống ống chạy 0,1ml) có tại NICVB cho thấy có thể sử dụng một trong các dòng máy trên cho kiểm định chất lượng một bộ sinh phẩm chẩn đoán. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu trên thế giới khi thẩm định quy trình phát hiện gen E của WHO cho thấy sự tương đồng với kết quả của chúng tôi. Ví dụ như kết quả thực hiện thử nghiệm giới hạn phát hiện cho hệ thống Realtime PCR ABI7500 ở một phòng thí nghiệm ở Hàn Quốc trên cùng quy trình phát hiện gen E của WHO là 8 copies/phản ứng (nằm trong khoảng 1-3xLOD của quy trình)[3]. Đồng thời trong quy trình của Corman (Charite/ Berlin) cập nhật năm 2020 thực hiện tại một labo khác trên hệ thống thiết bị QuantStudio 7 system (thế hệ mới của QuantStudio 5) cho kết quả là 3.2 RNA copies/reaction (95% CI: 2.2–6.8 RNA copies / phản ứng) [4]. Những điều này cho thấy nghiên cứu của chúng tôi có độ tin cậy cao khi các kết quả về giới hạn của các hệ thống máy Realtime PCR tại NICVB đều đáp ứng tiêu chuẩn của FDA khi khẳng định các hệ thống thiết bị có tính tương đồng (nằm trong khoảng 1-3xLoD (5,2 -15,6 RNA copies / phản ứng). Trong đó hệ thống ABI7500 cho kết quả tốt nhất tương ứng với LOD bằng 5,2 RNA copies / phản ứng (95%CI: 3,3-8,0 RNA copies/phản ứng).

Điểm hạn chế của đề tài này là chưa đánh giá được tất cả các dòng máy Realtime PCR hiện đang có mặt tại Việt Nam. Tuy nhiên với việc thực hiện 4 hệ thống mang tính đại diện tiêu biểu và phổ biến cho các dòng máy và hãng Realtime PCR hiện có, chúng tôi hoàn toàn có thể khẳng định độ tin cậy và lặp lại của số liệu.

5.Kết luận

Kết quả thực hiện thử nghiệm giới hạn phát hiện trên cả 04 hệ thống máy Realtime PCR bao gồm: ABI7500 là 5,2 RNA copies/phản ứng (95%CI: 3,3-8,0 RNA copies/phản ứng); QuantStudio™5 là 10,04 RNA copies/phản ứng (95%CI: 7,06-14,30 RNA copies/phản ứng) ; Hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad là 10,77 RNA copies/phản ứng (95%CI: 7,62-15,24 RNA copies/phản ứng) và abCyclerQ (AIT biotech) là 14,86 RNA copies/phản ứng (95%CI: 10,71-20,64 RNA copies/phản ứng) cho thấy LOD đều nằm trong khoảng tham chiếu 1-3xLoD; Do đó, 04 hệ thống máy Realtime PCR đều tương đồng nhau. Vì vậy, có thể sử dụng thay thế 04 hệ thống máy Realtime PCR bao gồm: ABI7500; QuantStudio™5; Hệ thống Realtime PCR CFX96 Touch Bio- Rad và abCyclerQ (AIT biotech) cho nhau trong trường hợp cần thiết

Tài liệu tham khảo

- [1] Instructions and requirements for Emergency Use Listing (EUL) submission: In vitro diagnostics detecting SARS-CoV-2 nucleic acid and rapid diagnostics test detecting SARS-CoV-2 antigens. <https://www.who.int/publications/m/item/PQDx-347-version-4>
- [2] Victor Corman, Tobias Bleicker et al. Charité Virology, Berlin, Germany Diagnostic detection of 2019-nCoV by realtime RT-PCR <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6988269/>
- [3] Validation of real-time RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in the early stages of the COVID-19 outbreak in the Republic of Korea; <https://link.springer.com/content/pdf/10.1038/s41598-021-94196-3.pdf>
- [4] Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR; <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>