KTV NGUY□N ĐÀO HI□U – Khoa HHTM

I. Đ□I C□□NG

Vi rút là m□t trong nh□ng nguyên nhân gây ra m□t s□ b□nh nghiêm tr□ng □ ng□□i. Trong đó vi rút viêm gan B (HBV: Hepatitis B virus), vi rút viêm gan C (HCV: Hepatitis C virus), vi rút gây suy gi□m mi□n d□ch □ ng□□i (HIV: Human immunodeficiency virus) là vi rút gây b□nh thông qua đ□□ng máu. Các vi rút này bi□n đ□i liên t□c v□ c□u trúc và h□ gen đ□ tr□n thoát các lo□i sinh ph□m xét nghi□m, h□u qu□ là tăng t□ l□ lây nhi□m trong c□ng đ□ng.

Hình 1: Hệ thống Cobas s 201 phiên bản 2.0 tại Khoa Huyết học- Truyền máu BVĐK Quảng Nam

Phương pháp xét nghiệm dùng cho sàng lọc HIV, HBV và HCV trong truyền máu là xác định tác nhân gây bệnh gián tiếp dựa trên kết quả của phản ứng miễn dịch "kháng nguyên-kháng thể". Ưu điểm của xét nghiệm là đơn giản, tốn ít thời gian, giá thành hợp lý, song phương pháp này có nhược điểm là trong giai đoạn "cửa sổ" khi đó kháng thể hoặc kháng nguyên chưa đạt ngưỡng phát hiện, do vậy xét nghiệm sẽ cho ra kết quả âm tính. Bên cạnh đó, tương tác không đặc hiệu của kháng thể hoặc kháng nguyên với những bất thường protein khác trong máu có cấu trúc gần giống với kháng nguyên hoặc kháng thể có thể dẫn đến kết quả dương tính giả. Cùng với sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử, kỹ thuật NAT đã được đưa vào sử dụng, kỹ thuật này có độ nhạy cao cho phép phát hiện và nhân bản đặc hiệu theo hàm mũ các trình tự đích của tác nhân gây bệnh tới một lượng nhỏ vi rút, do đó, cho phép phát hiện sớm và chính xác các tác nhân gây bệnh. Hơn thế nữa, NAT có thể được sử dụng để phát hiện đồng thời HIV, HBV và HCV thông qua một xét nghiệm trong thời gian là 4-5 giờ, đảm bảo an toàn cho đơn vị máu truyền.

Trên thế giới, khi sàng lọc máu, các nước phát triển thực hiện song song giữa phương pháp xét nghiệm gián tiếp kháng nguyên – kháng thể và xét nghiệm NAT cho đơn vị máu từ cuối những năm 1990 đầu những năm 2000. Ở Việt Nam, hầu hết các phòng xét nghiệm sàng lọc HIV, HBV và HCV đều sử dụng phương pháp xét nghiệm miễn dịch kháng nguyên kháng thể hay còn gọi là xét nghiệm huyết thanh học, xét nghiệm NAT chưa được sử dụng. Đến năm 2015, Viện HHTMTW thực hiện theo Thông tư 26 TT-BYT ngày 16/9/2013 hướng dẫn hoạt động truyền máu, triển khai xét nghiệm NAT để đảm bảo an toàn truyền máu.

II XÉT NGHIỆM NAT

NAT (nucleic acid test) hay NAAT (nucleic acid amplification test) là kỹ thuật sinh học phân tử dùng trong chẩn đoán, mục tiêu của xét nghiệm là phát hiện sự có mặt vật liệu di truyền (RNA hoặc DNA) của tác nhân gây bệnh tồn tại trong mẫu nghiệm qua đó xác định sự hiện diện của tác nhân gây bệnh. Tùy vào mục đích mà có những ứng dụng kỹ thuật khác nhau, các nhóm kỹ thuật phổ biến là:

- PCR (polymerase chain reaction)
- LCR (Ligase chain reaction)
- bDNA (Branched DNA)
- NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification)

- TMA (Transcription mediated amplification)

Xét nghi□m NAT có nhi□u □u đi□m nh□:

- Có th□ phát hi□n n□ng đ□ r□t th□p RNA hay DNA (10copys/ml).
- Rút ng□n th□i gian c□a s□ trong xét nghi□m sàng l□c an toàn truy□n máu vì nó có th□ phát hi□n tác nhân gây b□nh trong th□i k□ □ b□nh.
- Có kh□ năng phát hi□n đ□□c các ch□ng đ□t bi□n cũng nh□ th□ □n vi rút.
- Đ□ nh□y và đ□ đ□c hi□u c□c cao đ□i v□i a xít nucleic c□a vi rút.

Trong xét nghi□m sàng l□c cho an toàn truy□n máu, xét nghi□m NAT có th□ rút ng□n th□i gian c□a s□ phát hi□n so v□i các k□ thu□t mi□n d□ch. Tuy nhiên, nó không th□ thay th□ hoàn toàn đ□□c cho các xét nghi□m này do có nh□ng th□i đi□m xét nghi□m NAT không th□ phát hi□n DNA hay RNA vi rút trong m□u ng□□i hi□n máu, ví d□ khi c□ th□ sinh ra nhi□u kháng th□ trung hòa h□t toàn b□ vi rút trong máu thì xét nghi□m NAT s□ âm tính, trong khi các xét nghi□m mi□n d□ch v□n có th□ phát hi□n đ□□c.

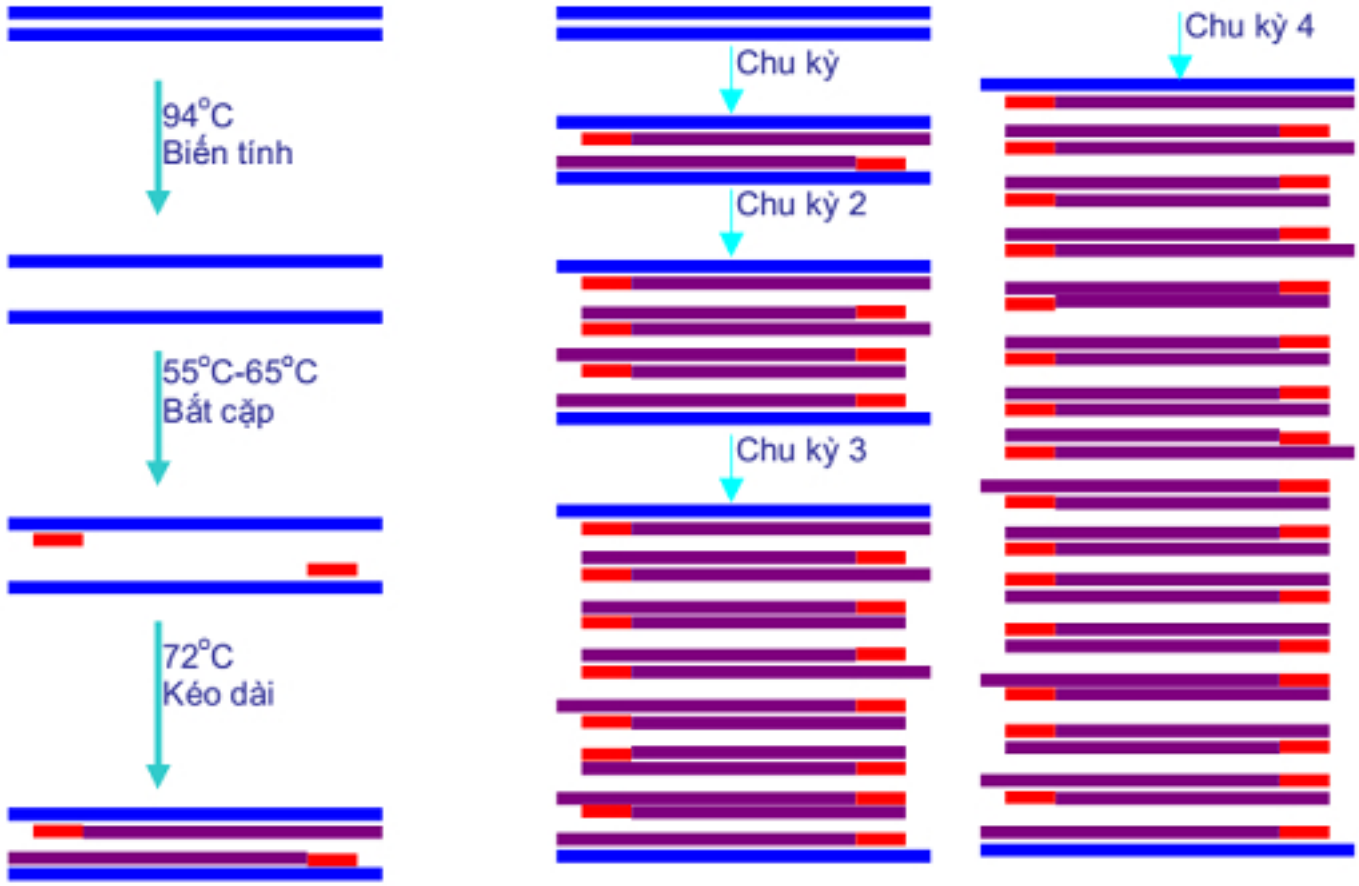
Hi□n nay, hai k□ thu□t đang đ□□c □ng d□ng ph□ bi□n trong xét nghi□m sàng l□c máu □ Vi□t Nam và trên th□ gi□i là RT-PCR (Real time PCR) và TMA.

1. Xét nghi□m PCR

PCR là m□t th□ nghi□m d□a trên c□ s□ ph□n □ng m□ r□ng primer nh□ enzyme DNA polymerase ch□u nhi□t (th□□ng là Taq polymerase) đ□ khu□ch đ□i in vitro các nucleic acid đ□c tr□ng v□i các thành ph□n ch□ y□u c□a ph□n □ng là: (1) enzyme polymerase ch□u nhi□t, có ho□t tính t□i đa □ 72oC và b□n đ□□c v□i nhi□t đ□; (2) 4 lo□i desoxyribonucleotide (dNTP) là Adenine, Thymine, Guanine, và Cytosine (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); (3) DNA ch□a các đo□n DNA đích s□ đ□□c nhân b□n trong □ng ph□n □ng; (4) các đo□n m□i (primer) xuôi và ng□□c là các đo□n oligonucleotide có chi□u dài kho□ng 20 - 30 nucleotide có trình t□ b□ sung m□t cách đ□c hi□u v□i trình t□ c□a 2 đ□u đo□n DNA s□ đ□□c nhân b□n; (5) ion Mg2+ trong mu□i MgCl--2 □ n□ng đ□ thích h□p, (6) dung d□ch đ□m Tris-KCl đ□ làm dung môi thích h□p cho ph□n □ng. Khi □ng nghi□m ph□n □ng này đ□□c cho vào bu□ng □ chu k□ nhi□t c□a máy luân nhi□t (thermal cycler), mà chúng ta th□□ng g□i là máy PCR, ch□□ng trình nhi□t đ□ trong máy s□ làm cho nhi□t đ□ trong bu□ng □ nhi□t c□a máy thay đ□i theo chu k□, nh□ v□y mà ph□n □ng nhân b□n DNA s□ x□y ra.

Nguyên lý

Về mặt nguyên tắc, một chu kỳ nhiệt độ sẽ bao gồm 3 giai đoạn nhiệt độ. (1) Đầu tiên nhiệt độ sẽ được đưa lên 94oC, ở nhiệt độ này các liên kết hydro của mạch đôi DNA sẽ bị mất đi, như vậy DNA đích bị biến tính thành các mạch đơn; giai đoạn nhiệt độ này được gọi là giai đoạn biến tính. (2) Kế đó nhiệt độ sẽ được hạ đến 55oC- 65oC là nhiệt độ thích hợp để các đoạn mồi tìm đến bắt cặp bổ sung vào hai đầu của đoạn DNA đích, giai đoạn nhiệt độ này được gọi là giai đoạn bắt cặp. (3) Cuối cùng, nhiệt độ được đưa lên 72oC là nhiệt độ thích hợp cho hoạt tính của enzyme Taq polymerase để kéo các dNTP lại đầu 3' của đoạn mồi đang bắt cặp trên đầu 5' của sợi DNA đích để bắt nguồn cho sự tổng hợp nên mạch bổ sung. Như vậy, qua một chu kỳ nhiệt, một DNA đích đã được nhân bản thành hai bản sao; và nếu chu kỳ này được lặp đi lặp lại liên tục 30 đến 40 lần thì từ một DNA đích đã nhân bản được thành 230 đến 240 bản sao, tức là đến hàng tỷ bản sao. Phát hiện các sản phẩm khuếch đại này bằng phương pháp điện di và nhuộm màu.



Hình 2: Nguyên t□c PCR là nhân b□n qua các chu k□ nhi□t

Real-time PCR là k□ thu□t PCR mà k□t qu□ khu□ch đ□i DNA đích hi□n th□ đ□□c ngay sau m□i chu k□ nhi□t c□a ph□n □ng nh□ tín hi□u hu□nh quang, chính vì v□y nên đ□□c g□i là real-time; và do đ□c đi□m này nên v□i real-time PCR ng□□i làm thí nghi□m không c□n thi□t ph□i làm ti□p các thí nghi□m đ□ đ□c và phân tích k□t qu□ đ□ xác đ□nh có s□n ph□m khu□ch đ□i đích hay không vì k□t qu□ cu□i cùng c□a ph□n □ng khu□ch đ□i cũng đ□□c hi□n th□ ngay sau khi hoàn t□t ph□n □ng khu□ch đ□i. Nh□ v□y, có th□ nói real-time PCR là k□ thu□t nhân b□n DNA đích trong □ng nghi□m thành hàng t□ b□n sao d□a vào các chu k□ nhi□t và k□t qu□ khu□ch đ□i trong □ng ph□n □ng đ□□c hi□n th□ cùng lúc v□i ph□n □ng khu□ch đ□i x□y ra đ□ ng□□i làm thí nghi□m có th□ th□y đ□□c.

2. H□ th□ng xét nghi□m Cobas s 201

2.1. Ph□m vi s□ d□ng

Xét nghi□m đ□nh tính in vitro phát hi□n tr□c ti□p acid nucleic trong huy□t t□□ng ng□□i:

- RNA c□a HIV-1 Nhóm M,
- RNA c□a HIV-1 nhóm O,
- RNA c□a HIV-2,
- RNA c□a HCV,
- DNA c□a HBV

M□u có th□ đ□□c xét nghi□m d□□i d□ng m□u đ□n l□ hay m□u g□p t□ nhi□u túi m□u máu ban đ□u và đ□□c đánh giá cùng v□i các xét nghi□m huy□t thanh h□c.

M□u huy□t t□□ng đ□□c s□ d□ng có ngu□n g□c t□ túi máu hi□n ho□c m□u máu t□ ng□□i đã ng□ng tim.

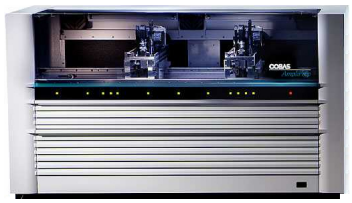
Không đ□□c dùng cho m□c đích ch□n đoán tác nhân nhi□m.

2.2. Nguyên lý: Xét nghi□m cobas s 201 d□a trên 4 quy trình chính:

+ Phân ph□i/ hút m□u và hút m□u ch□ng t□ đ□ng s□ d□ng máy hút m□u Hamilton Microlab Star/Starlet IDV tùy ch□n (POOLING M□u).

Hình 3: Máy hút m□u Hamilton Microlab Star/Starlet IDV

+ Chu□n b□ m□u t□ đ□ng dùng máy COBAS AmpliPrep (CAP).



Hình 4: Máy COBAS AmpliPrep (CAP)

+ Khu□ch đ□i t□ đ□ng Acid Nucleic và phát hi□n th□i gian th□c đ□ng và phân bi□t các s□n ph□m PCR s□ d□ng máy COBAS TaqMan (CTM).

Hình 5: Máy COBAS TaqMan (CTM)

+ Qu□n lý d□ li□u t□ đ□ng dùng ph□n m□m t□p h□p và qu□n lý d□ li□u (PDM)

[redacted]