

# XÁC NHẬN ĐỘ CHỤM VÀ ĐỘ CHÍNH XÁC CỦA XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN SARS-COV-2 BẰNG PHƯƠNG PHÁP REALTIME RT-PCR

Trần Ngọc Huyền<sup>1</sup>, Lê Thị Kim Chung<sup>2</sup>, Đào Xuân Đạt<sup>2</sup>  
Nguyễn Trọng Tuệ<sup>1</sup>, Vũ Đức Anh<sup>1</sup> và Hà Thị Phương Dung<sup>3,✉</sup>

<sup>1</sup>Khoa Kỹ thuật y học

<sup>2</sup>Labo trung tâm, Viện Y học dự phòng và Y tế công cộng

<sup>3</sup>Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Xét nghiệm Realtime RT-PCR được coi là một trong những phương pháp tốt nhất hiện nay để phát hiện SARS-CoV-2. Với các đặc tính kỹ thuật phức tạp, xét nghiệm Realtime RT-PCR cần được xác nhận và kiểm soát được chất lượng nghiêm ngặt. Nghiên cứu sử dụng 30 mẫu bệnh phẩm đường hô hấp đã được tách chiết và khẳng định bằng bộ kit LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control theo quy trình khuyến cáo của WHO, thỏa mãn các tiêu chuẩn chọn mẫu, tiến hành xác nhận kit One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG Multiplex-3 target genes tại Đơn vị Lab SARS-CoV-2 thuộc Trường Đại học Y Hà Nội. Thử nghiệm được tiến hành theo khuyến cáo Hiệp hội vi sinh Hoa kỳ (American Society for Microbiology - ASM) đánh giá độ chùm và độ chính xác. Độ chùm của xét nghiệm đạt giá trị CV% cho độ chùm ngắn hạn và độ chùm dài hạn phù hợp với tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Độ chính xác của xét nghiệm có độ đồng thuận dương tính, âm tính đạt 100%. Kết luận: xác nhận độ chùm và độ chính xác của phương pháp phù hợp với tuyên bố của nhà sản xuất.

**Từ khóa:** SARS-CoV-2, xác nhận phương pháp, Realtime RT-PCR.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) là một phần của họ virus corona gây viêm phổi và suy giảm hô hấp nghiêm trọng và có thể dẫn đến tử vong.<sup>1</sup> Xét nghiệm chẩn đoán SARS-CoV-2 là chiến lược để hạn chế sự lây truyền của dịch bệnh vì nó xác định những ca bệnh và có biện pháp phòng lây nhiễm cho người xung quanh, đồng thời theo dõi sức khỏe và điều trị kịp thời, truy vết tiếp xúc và cung cấp thông tin dịch tễ học.<sup>2</sup> Hiện nay, các phương pháp tiếp cận dựa trên phát hiện acid nucleic đã trở thành một công nghệ phát hiện nhanh chóng và đáng tin cậy.

Trong số các xét nghiệm acid nucleic, phương pháp phản ứng chuỗi polymerase (PCR) được coi là “tiêu chuẩn vàng” để phát hiện một số loại virus với đặc điểm độ nhạy và độ đặc hiệu cao.<sup>3,4</sup> Vì vậy, xét nghiệm Realtime RT-PCR (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction) được coi là một trong những phương pháp tốt nhất hiện nay để phát hiện tác nhân gây bệnh COVID-19.<sup>5</sup>

Với các đặc tính kỹ thuật phức tạp và yêu cầu cấp thiết cần phải triển khai diện rộng, xét nghiệm Realtime RT-PCR cần được thực hiện xác nhận phương pháp và kiểm soát được chất lượng một cách chặt chẽ, giúp cung cấp những thông tin chính xác cho bác sỹ lâm sàng và các nhà chuyên môn khác để: phát hiện bệnh hoặc khả năng mắc bệnh; khẳng định hay phủ nhận một chẩn đoán; tiên lượng

Tác giả liên hệ: Hà Thị Phương Dung

Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Email: hadung101085@gmail.com

Ngày nhận: 22/09/2022

Ngày được chấp nhận: 19/10/2022

bệnh; hướng dẫn quản lí bệnh nhân; theo dõi hiệu quả điều trị bệnh.<sup>6</sup>

Đơn vị Lab SARS-CoV-2 thuộc Trường Đại học Y Hà Nội hiện đang sử dụng bộ trang thiết bị chuẩn đoán *in vitro* phát hiện RNA của virus SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG Multiplex-3 target genes của Công ty Cổ phần Sao Thái Dương. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu: Thực hiện xác nhận độ chụm và độ chính xác xét nghiệm Realtime RT-PCR với SARS-CoV-2 bằng kit One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

#### *Tiêu chuẩn lựa chọn*

30 mẫu bệnh phẩm đường hô hấp đã tách chiết RNA virus SARS-CoV-2 được lưu tại Đơn vị Lab SARS-CoV-2 thuộc Trường Đại học Y Hà Nội đã được xác định âm tính/dương tính bằng phương pháp so sánh kit LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control của hãng Tib mobil. Mẫu dương tính mạnh có giá trị Ct từ 15 - 24, mẫu dương tính trung bình có giá trị Ct từ 25 - 32, mẫu âm tính có Ct > 40 theo khuyến cáo của tổ chức vi sinh hoa kì ASM.<sup>7</sup> Bộ kit Tibmolbiol được lựa chọn làm bộ kit tham chiếu do bộ kit này đã đạt tiêu chuẩn FDA và EUA cũng như được WHO, Bộ Y tế Việt Nam khuyến cáo sử dụng làm xét nghiệm khẳng định, bên cạnh đó bộ kit đã được xác nhận phương pháp và đạt tiêu chuẩn đưa vào sử dụng tại đơn vị xét nghiệm.

#### *Tiêu chuẩn loại trừ*

Lượng mẫu còn quá ít sau khi làm xét nghiệm; không được bảo quản ở nhiệt độ nhỏ

hơn -70°C, mẫu được rã đông trên 1 lần.

### 2. Phương pháp

#### *Thiết kế nghiên cứu*

Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng xét nghiệm.

#### *Thời gian và địa điểm nghiên cứu*

Nghiên cứu được thực hiện từ 9/2021 đến 4/2022 tại Đơn vị xét nghiệm SARS-CoV-2 thuộc Khoa Xét nghiệm - Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

*Quy trình thực hiện:* Toàn bộ thực nghiệm được tiến hành theo khuyến cáo của ASM.<sup>7</sup>

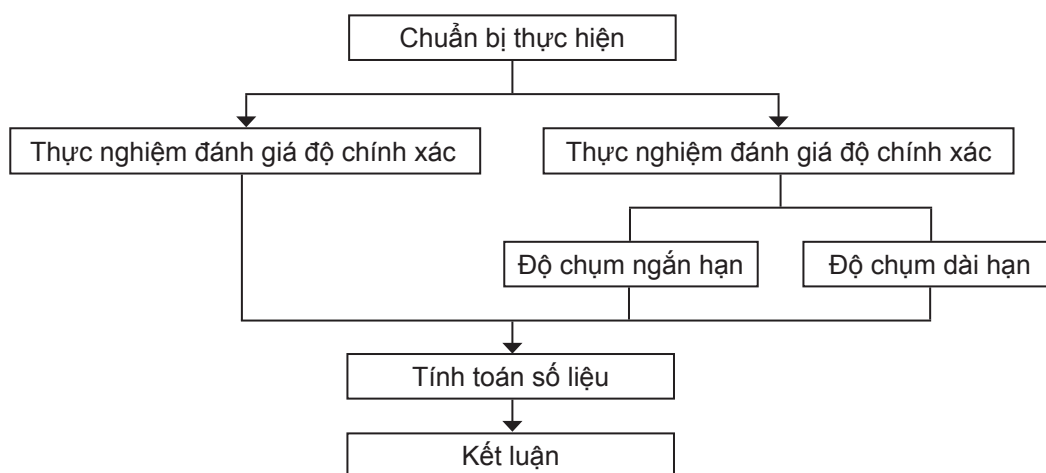
+ Mẫu đủ tiêu chuẩn lựa chọn: được tính toán, chia nhỏ, mã hóa (thông tin ngày tách chiết, ngày chia) và lưu trữ trong các ống eppendoff và bảo quản ở nhiệt độ -70°C, mỗi thử nghiệm sẽ sử dụng 1 ống riêng để đảm bảo điều kiện tương đồng ban đầu của mẫu.

+ Thực nghiệm đánh giá độ chụm ngắn hạn: 14 mẫu ở 3 mức nồng độ khác nhau (5 mẫu dương tính mạnh, 5 mẫu dương tính trung bình, 4 mẫu âm tính) dựa trên phương pháp so sánh. Thực hiện phân tích 3 lần tại 3 thời điểm trong ngày.

+ Thực nghiệm đánh giá độ chụm dài hạn: 14 mẫu ở 3 mức nồng độ khác nhau (5 mẫu dương tính mạnh, 5 mẫu dương tính trung bình, 4 mẫu âm tính) dựa trên phương pháp so sánh. Thực hiện phân tích lặp lại trong 5 ngày khác nhau.

+ Thực nghiệm đánh giá độ chính xác: chuẩn bị 20 mẫu ở 3 mức nồng độ khác nhau (dương tính mạnh, dương tính trung bình, âm tính) dựa trên phương pháp so sánh.

+ Mỗi mẻ chạy thực hiện đều kèm theo chứng âm, chứng dương.



Sơ đồ 1. Quy trình nghiên cứu

Hóa chất thực hiện xác nhận Realtime RT-PCR:

+ Sử dụng One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG. Hỗn hợp phản ứng chứa cặp mồi và đầu dò được thiết kế trong vùng N gene của bộ gene SARS-CoV-2. Các cặp mồi chịu trách nhiệm nhân bản các trình tự đặc hiệu cho SARS-CoV-2. Sản phẩm nhân bản được phát hiện bởi tín hiệu huỳnh quang phát ra từ sự phân cắt mồi dò Taqman đặc hiệu cho

SARS-CoV-2.

+ Thành phần phản ứng: tổng thể tích 25 $\mu$ l gồm: 5 $\mu$ l RNA, 5 $\mu$ l Buffer Mix, 2 $\mu$ l Enzym Mix, 2 $\mu$ l Primobe Mix, 11 $\mu$ l Rnase free water. Chu trình nhiệt của phản ứng: 50°C/30 phút, 95°C/15 phút, [95°C/20 giây, 60°C/40 giây]×45 chu kỳ, bảo quản mẫu ở nhiệt độ 10°C.

+ Theo khuyến cáo của nhà sản xuất, kết quả sau khi thực hiện cần được đọc và phiên giải theo bảng dưới đây:

Bảng 1. Hướng dẫn phân tích kết quả xét nghiệm

Kết quả đọc huỳnh quang				Kết quả
FAM (gene N3)	JOE/VIC/HEX (gene N2)	TEX/ROX (gene N1)	Cy5	
+/-	+	+	+/-	Dương tính
+/-	+	-	+/-	Không kết luận được
+/-	-	+	+/-	Không kết luận được
+/-	-	-	+	Âm tính
-	-	-	-	Không kết luận được

“+” tín hiệu vượt ngưỡng trước 40 chu kỳ (Ct < 40)

“-” tín hiệu không vượt ngưỡng

Trường hợp “Không kết luận được” cần thực hiện lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn “Không kết luận được” cần gửi mẫu tới PXN khác để đối chiếu.

### 3. Xử lý số liệu

Phương pháp phân tích bao gồm tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, hệ số biến thiên. Phân tích thống kê bằng phần mềm Excel.

#### Tiêu chuẩn chấp nhận

Theo giá trị độ chụm và độ chính xác do nhà sản xuất công bố với:

- + Giá trị CV% độ chụm ngắn hạn < 1,72%.
- + Giá trị CV% độ chụm dài hạn < 1,65%.
- + Độ đồng thuận dương tính PPA (Positive percent agreement), độ đồng thuận âm tính NPA (Negative percent agreement), độ đồng thuận tổng OPA (Overall predictive agreement) đạt 100%.

## III. KẾT QUẢ

**Bảng 2. Kết quả đánh giá độ chụm ngắn hạn theo Ct của mẫu dương tính**

Mã bệnh nhân	Gene N1			Gene N2		
	$\bar{X}$	SD	CV (%)	$\bar{X}$	SD	CV (%)
BN1	17,08	0,22	1,27	15,94	0,22	1,35
BN2	20,0	0,04	0,22	18,66	0,08	0,44
BN3	19,44	0,3	1,55	18,53	0,3	1,62
BN4	23,98	0,21	1,62	25,20	0,31	1,24
BN5	24,13	0,13	0,54	23,25	0,02	0,09
BN6	24,74	0,31	1,26	24,69	0,37	1,51
BN7	26,62	0,43	1,62	25,20	0,31	1,24
BN8	31,23	0,42	1,34	30,98	0,45	1,46
BN9	32,49	0,34	1,05	32,49	0,27	0,83
BN10	31,37	0,14	0,45	31,10	0,44	1,40

Giá trị CV% đánh giá độ chụm ngắn hạn của các mẫu dương tính sử dụng One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG đều nhỏ hơn 1,72%.

**Bảng 3. Kết quả đánh giá độ chụm ngắn hạn theo Ct của mẫu âm tính**

Mã bệnh nhân	Gene IC		
	$\bar{X}$	SD	CV (%)
BN21	31,58	0,45	1,41
BN22	30,00	0,46	1,55
BN23	28,15	0,33	1,15
BN24	27,96	0,45	1,61

Giá trị CV% đánh giá độ chụm ngắn hạn của các mẫu âm tính sử dụng One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG đều nhỏ hơn 1,72%.

**Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chụm dài hạn theo Ct các mẫu dương tính**

Mã bệnh nhân	Gene N1			Gene N2		
	$\bar{X}$	SD	CV (%)	$\bar{X}$	SD	CV (%)
BN11	21,36	0,24	1,11	20,29	0,32	1,59
BN12	24,08	0,36	1,49	23,87	0,3	1,24
BN13	24,83	0,32	1,29	24,74	0,29	1,19
BN14	26,69	0,39	1,46	25,75	0,42	1,62
BN15	28,15	0,33	1,19	27,97	0,15	0,55
BN16	29,89	0,21	0,72	28,32	0,09	0,33
BN17	29,14	0,43	1,46	27,97	0,15	0,55
BN18	31,33	0,50	1,61	30,48	0,44	1,43
BN19	31,06	0,27	0,86	30,70	0,25	0,83
BN20	32,52	0,18	0,57	32,16	0,26	0,81

Giá trị CV% đánh giá độ chụm dài hạn của các mẫu dương tính sử dụng One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG đều nhỏ hơn 1,65%.

**Bảng 5. Kết quả đánh giá độ chụm dài hạn theo Ct của mẫu âm tính**

Mã bệnh nhân	Gene IC		
	$\bar{X}$	SD	CV (%)
BN25	31,17	0,25	0,79
BN26	29,38	0,31	1,05
BN27	28,27	0,37	1,32
BN28	27,30	0,31	1,15

Giá trị CV% đánh giá độ chụm dài hạn của các mẫu âm tính sử dụng One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG đều nhỏ hơn 1,65%.

**Bảng 6. Kết quả đánh giá độ chính xác**

	Phương pháp so sánh (Tib mobiol)	
	Mẫu dương tính	Mẫu âm tính
Mẫu dương tính phát hiện bằng Kit Thai Duong	10	0
Mẫu âm tính phát hiện bằng Kit Thai Duong	0	10

Độ đồng thuận dương tính PPA = 100%; Độ đồng thuận âm tính NPA = 100%; Độ đồng thuận tổng OPA = 100%.

## IV. BÀN LUẬN

Xác nhận phương pháp là hoạt động độc lập của phòng xét nghiệm, nhằm đưa ra các bằng chứng khách quan để chứng minh các thông số kỹ thuật của phương pháp mà nhà sản xuất công bố là phù hợp với điều kiện vận hành thực tế của phòng xét nghiệm. Nghiên cứu này tiến hành xác nhận độ chụm và độ chính xác xét nghiệm Realtime RT-PCR với SARS-CoV-2 bằng kit One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG theo hướng dẫn mới nhất của Hiệp hội Vi sinh Hoa Kỳ.<sup>7</sup>

Nghiên cứu thực nghiệm với 30 mẫu bệnh phẩm đường hô hấp đã tách chiết RNA virus SARS-CoV-2 và được xác định âm tính/dương tính bằng phương pháp so sánh: Kit LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control (Tib mobiol), đã được khẳng định trước đó. Kết quả đánh giá độ chụm dài hạn và ngắn hạn trong nghiên cứu của chúng tôi đều đạt yêu cầu của nhà sản xuất. Trong quá trình thực hiện nghiên cứu thực nghiệm độ chụm của chúng tôi, trước đó có một số kết quả có giá trị CV% lớn hơn tiêu chuẩn của nhà sản xuất, cụ thể là giá trị độ chụm ngắn hạn của mẫu âm tính sử dụng Ct của chứng nội và Ct một số mẫu dương tính có CV% lớn hơn 1,72%. Trước đó, trong một thử nghiệm đánh giá độ chụm của bộ sinh phẩm khác liên quan đến phương pháp Realtime RT-PCR có một số kết quả có giá trị CV% lớn hơn tiêu chuẩn của nhà sản xuất, cụ thể là giá trị độ chụm ngắn hạn của mẫu âm tính sử dụng Ct của chứng nội và Ct một số mẫu dương tính có CV% lớn hơn giá trị CV% mà nhà sản xuất công bố. Hiệp hội Bệnh học Hoa Kỳ (College of American Pathologists - CAP) không khuyến cáo (not recommended) với các mẫu RNA sau tách chiết và bảo quản nhiệt độ lạnh.<sup>8</sup> Từ đó, sau thời điểm lựa chọn được mẫu RNA đã được tách chiết và khẳng định bằng phương pháp so sánh, chúng tôi tiến hành ghi nhận thời gian tách chiết, chia nhỏ

các ống tương ứng số lần thực hiện các thực nghiệm, ghi nhận thời điểm chia nhỏ mẫu, bảo quản đúng điều kiện -70°C và chỉ thực hiện rã đông một lần duy nhất. Thực nghiệm đánh giá độ chính xác được đánh giá qua 3 mức nồng độ chạy một lần. Trong nghiên cứu này sử dụng 20 mẫu để đánh giá độ chính xác với kết quả là của PPA = 100%, NPA = 100%, OPA = 100%, đạt tiêu chuẩn của nhà sản xuất đưa ra.

Một trong những điểm yếu trong nghiên cứu thực nghiệm của chúng tôi với thực nghiệm xác nhận phương pháp Realtime RT-PCR với SARS-CoV-2, đó là chưa đánh giá được thực nghiệm xác nhận giới hạn phát hiện (LoD) của mẫu. Do tại thời điểm nghiên cứu, dịch SARS-CoV-2 bùng nổ mạnh, việc nuôi cấy và định lượng virus còn gặp rất nhiều khó khăn, do đó rất khó để tìm được một mẫu thương mại biết trước giá trị nồng độ virus. Bên cạnh đó, việc thiếu vật liệu tham chiếu cũng ảnh hưởng tới khả năng thực hiện các thực nghiệm khác như độ đặc hiệu phân tích, khoảng tuyến tính... mặc dù các thông tin này đã được công bố trong khuyến cáo của nhà sản xuất. Tuy nhiên, do mức độ khẩn cấp về dịch tễ phức tạp của dịch SARS-CoV-2 cũng như cần thiết phải triển khai nhanh chóng các phương pháp phát hiện virus, nhóm nghiên cứu đã tiến hành theo khuyến cáo của ASM với 2 thông số độ chụm và độ chính xác.<sup>7</sup> Kết quả của thực nghiệm là bước đầu quan trọng khẳng định xét nghiệm đảm bảo các đặc tính về kỹ thuật, và là điều kiện tiên quyết trước khi tiến hành chạy trên mẫu bệnh nhân.

## V. KẾT LUẬN

Khi tiến hành xác nhận độ chụm và độ chính xác xét nghiệm Realtime RT-PCR với SARS-CoV-2 bằng kit One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG tại Đơn vị Lab SARS-CoV-2 thuộc Trường Đại học Y Hà Nội, chúng tôi thấy

kết quả độ chụm ngắn hạn, độ chụm dài hạn và độ chính xác phù hợp với tuyên bố của nhà sản xuất. Xét nghiệm Realtime RT-PCR phát hiện SARS-CoV-2 bằng kit One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG đủ điều kiện triển khai thực hiện xét nghiệm trên bệnh nhân.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*. 2020; 91(1): 157-160.
2. Sule WF, Oluwayelu DO. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: Challenges and prospects. *The Pan African medical journal*. 2020; 35(Suppl 2): 121.
3. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, Roli L, Trenti T, Nelson SM. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): A systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reproductive biomedicine online*. 2020; 41(3): 483-499.
4. Xu M, Wang D, Wang H, et al. COVID-19 diagnostic testing: Technology perspective. *Clinical and translational medicine*. 2020; 10(4): e158.
5. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: Issues affecting the results. *Expert review of molecular diagnostics*. 2020; 20(5): 453-454.
6. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate medical journal*. 2020; 96(1142): 753-758.
7. Mitchell SL, St George K, Rhoads DD, et al. Understanding, verifying, and implementing emergency use authorization molecular diagnostics for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Journal of clinical microbiology*. 2020; 58(8).
8. Buckingham L. Molecular diagnostics: Fundamentals, methods, and clinical applications. 2019.

## Summary

### VERIFICATION OF REALTIME RT-PCR FOR DETECTION OF SARS-COV-2

Realtime RT-PCR is considered one of the best methods to detect SARS-CoV-2. Because of complex specifications, Realtime RT-PCR assays require verification and rigorous quality control. This study verified the One-Step RT-PCR COVID-19 Kit THAI DUONG Multiplex-3 target genes kit at the SARS-CoV-2 Lab Unit of Hanoi Medical University by using 30 respiratory biospecimens that were isolated and confirmed by the LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control Kit according to the WHO recommended procedure and met the sampling criteria's. Experiments were conducted according to the recommendations of the American Society for Microbiology (ASM) for evaluate of precision and accuracy. The assay precision reached CV% values for short-term and long-term precision in accordance with the manufacturer's recommendation. The accuracy of the positive and negative consensus test reached 100%. This study was able to conduct the precision and accuracy verification presented by the manufacturer.

**Keywords: SARS-CoV-2, verification, Realtime RT-PCR.**