

KTV NGUYỄN ĐÀO HIẾU – Khoa HHTM

I. ĐỐI CƯỢNG

Vi rút là một trong những nguyên nhân gây ra một số bệnh nghiêm trọng hàng đầu. Trong đó vi rút viêm gan B (HBV: Hepatitis B virus), vi rút viêm gan C (HCV: Hepatitis C virus), vi rút gây suy giảm miễn dịch hàng đầu (HIV: Human immunodeficiency virus) là vi rút gây bệnh thông qua đường máu. Các vi rút này bị liên kết với cấu trúc và hệ gen để trốn thoát các rào cản sinh học xét nghiệm, hậu quả là tăng tỷ lệ lây nhiễm trong cộng đồng.



Hình 1: Hội thảo 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 được phát hiện, do vậy xét nghiệm sẽ cho ra kết quả âm tính. Bên cạnh đó, phương pháp không được hiểu của kháng thể hoặc kháng nguyên với những bộ phận 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 nhận biết được hiệu quả theo hàm mũ các trình tự đích của tác nhân gây bệnh từ những mẫu vi rút, do đó, cho phép phát hiện sớm và chính xác các tác nhân gây bệnh. Hơn 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 thực tế, khi sàng lọc máu, các nhược điểm phát triển theo hiệu quả 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 đến những năm 2000. Tại 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 theo Thông tư 26 TT-BYT ngày 16/9/2013 hướng dẫn hoạt động truyền máu, triển khai xét nghiệm NAT 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 sớm có mặt vật liệu di truyền (RNA hoặc DNA) của tác nhân gây bệnh trên tế bào trong mẫu nghiên cứu qua đó xác định sự hiện diện của tác nhân gây bệnh. Tùy vào mục đích mà có những 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 nghiệm NAT có những ưu điểm như :

- Có thể phát hiện nồng độ rất thấp RNA hay DNA (10copies/ml).
- Rút ngắn thời gian chờ đợi trong xét nghiệm sàng lọc an toàn truyền máu vì nó có thể phát hiện tác nhân gây bệnh trong thời kỳ ủ bệnh.
- Có khả năng phát hiện được các chủng đột biến cũng như thời điểm rút.
- Đơn giản và dễ dàng hiểu các cao độ của axit nucleic của vi rút.

Trong xét nghiệm sàng lọc cho an toàn truyền máu, xét nghiệm NAT có thể rút ngắn thời gian chờ đợi phát hiện so với các kỹ thuật miễn dịch. Tuy nhiên, nó không thể thay thế hoàn toàn được cho các xét nghiệm này do có những thiếu sót xét nghiệm NAT không thể phát hiện DNA hay RNA vì rút trong mẫu ngưng tụ huyết tương, ví dụ khi có thể sinh ra những kháng thể trung hòa huyết tương nếu vi rút trong máu thì xét nghiệm NAT sẽ âm tính, trong khi các xét nghiệm miễn dịch vẫn có thể phát hiện được.

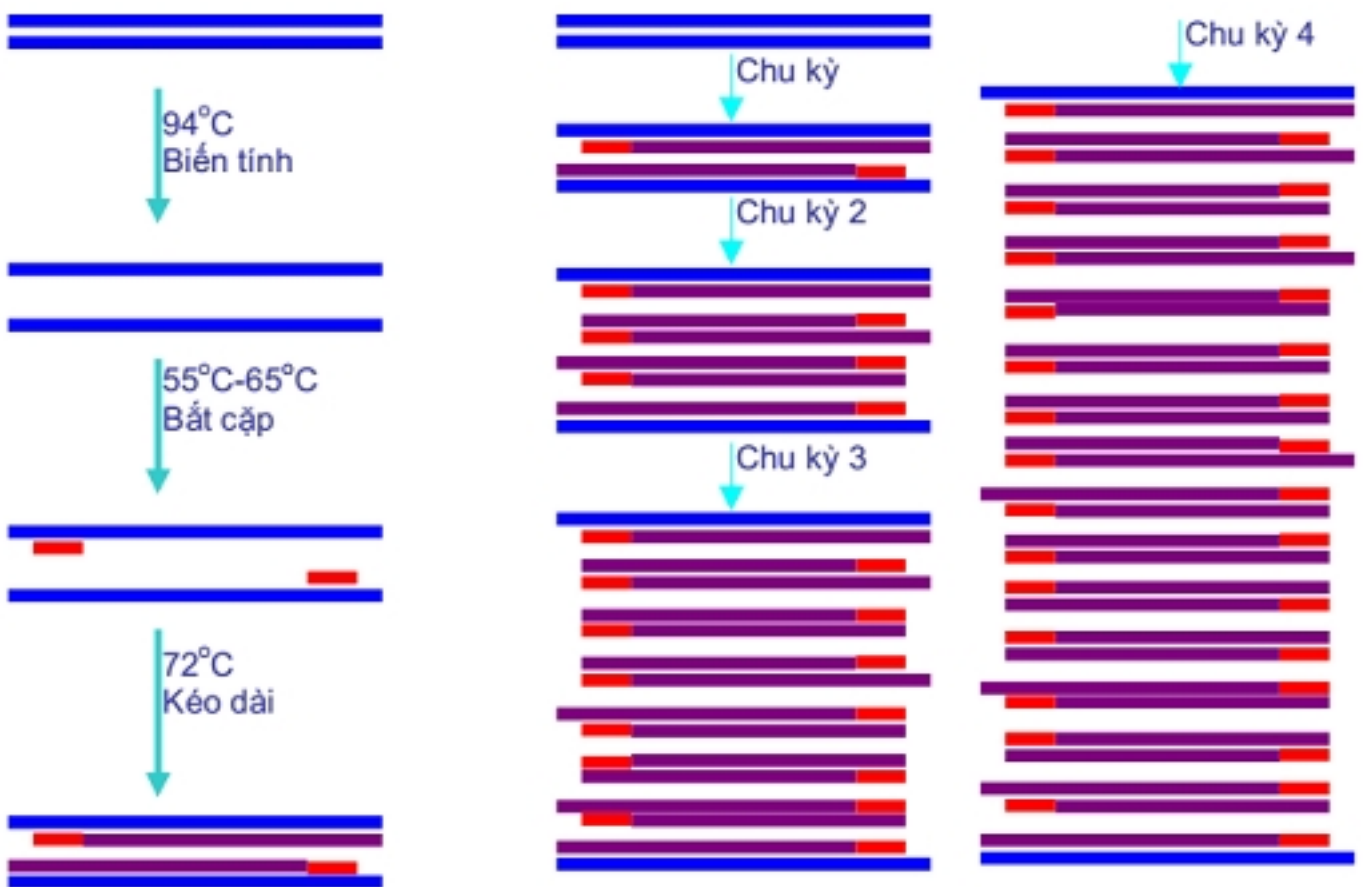
Hiện nay, hai kỹ thuật đang được ứng dụng phổ biến trong xét nghiệm sàng lọc máu ở Việt Nam và trên thế giới là RT-PCR (Real time PCR) và TMA.

1. Xét nghiệm PCR

PCR là một kỹ thuật nghiên cứu dựa trên cơ sở phản ứng mở rộng primer nhờ enzyme DNA polymerase chuỗi nhiệt (thường là Taq polymerase) để khuếch đại in vitro các nucleic acid được trình bày với các thành phần chủ yếu của phản ứng là: (1) enzyme polymerase chuỗi nhiệt, có hoạt tính tối đa ở 72°C và bền được với nhiệt độ; (2) 4 loại deoxyribonucleotide (dNTP) là Adenine, Thymine, Guanine, và Cytosine (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); (3) DNA chứa các đầu DNA đích sẽ được nhân bản trong phản ứng; (4) các đầu mồi (primer) xuôi và ngược là các đầu oligonucleotide có chiều dài khoảng 20 - 30 nucleotide có trình tự bổ sung một cách đặc hiệu với trình tự của 2 đầu DNA sẽ được nhân bản; (5) ion Mg²⁺ trong muối MgCl₂ cần ứng dụng thích hợp, (6) dung dịch đệm Tris-KCl để làm dung môi thích hợp cho phản ứng. Khi phản ứng nghiên cứu phản ứng này được cho vào buồng phản ứng chu kỳ nhiệt của máy luân nhiệt (thermal cycler), mà chúng ta thường gọi là máy PCR, chu kỳ trình nhiệt được trong máy sẽ làm cho nhiệt độ trong buồng phản ứng nhiệt của máy thay đổi theo chu kỳ, nhờ vậy mà phản ứng nhân bản DNA sẽ xảy 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 94°C, ở nhiệt độ này các liên kết hydro của mạch đôi DNA sẽ bị đứt đi, nhờ 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 xuống 55°C- 65°C là nhiệt độ thích hợp để các đầu 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 72°C là nhiệt độ thích hợp cho hoạt tính của enzyme Taq polymerase để kéo các dNTP vào đầu 3' của đoạn mồi đang bắt cặp trên đầu 5' của sợi DNA đích để bắt đầu tổng hợp nên mạch bổ sung. Như vậy, qua một chu kỳ nhiệt độ, một DNA đích đã được nhân thành hai bản sao; và nếu chu kỳ này được lặp đi lặp lại liên tục 30 đến 40 lần thì một DNA đích đã nhân 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 tắc PCR là nhân bản qua các chu kỳ nhiệt

Real-time PCR là kỹ thuật PCR mà kiểm soát khuếch đại DNA đích hiện thời điểm ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt của pha nhân đôi bằng huỳnh quang, chính vì vậy nên điểm gọi là real-time; và do điểm điểm này nên với real-time PCR người làm thí nghiệm không cần thiết phải làm tiếp các thí nghiệm để phân tích kết quả để xác định có sự nhiễm khuếch đại đích hay không vì kiểm soát cuối cùng của pha nhân đôi cũng điểm hiện thời ngay sau khi hoàn tất pha nhân đôi khuếch đại. Như vậy, có thể nói real-time PCR là kỹ thuật nhân bản DNA đích trong ống nghiệm thành hàng triệu bản sao đưa vào các chu kỳ nhiệt và kiểm soát khuếch đại trong ống pha nhân đôi điểm hiện thời cùng lúc với pha nhân đôi khuếch đại xảy ra để người làm thí nghiệm có thể thấy điểm.

2. Hệ thống xét nghiệm Cobas s 201

2.1. Phạm vi sử dụng

Xét nghiệm định tính in vitro phát hiện trực tiếp acid nucleic trong huyết tương người:

- RNA của HIV-1 Nhóm M,
- RNA của HIV-1 nhóm O,
- RNA của HIV-2,
- RNA của HCV,
- DNA của HBV

Mẫu có thể điểm xét nghiệm điểm điểm mẫu điểm máu hay mẫu gộp từ nhiều túi máu mẫu máu ban đầu và điểm đánh giá cùng với các xét nghiệm huyết thanh học.

Mẫu huyết tương điểm điểm điểm có nguồn gốc từ túi máu hiện hoặc mẫu máu từ người đã ngưng tim.

Giới thiệu pháp sàng lọc máu an toàn - sàng lọc NAT (Hệ thống máy Cobas' s 201)

Viết bởi: Biên tập viên

Thủ năm, 19 Tháng 9 2019 16:54 - Lần cập nhật cuối: Thủ năm, 19 Tháng 9 2019 17:16

Không được dùng cho mục đích chẩn đoán tác nhân nhiễm.

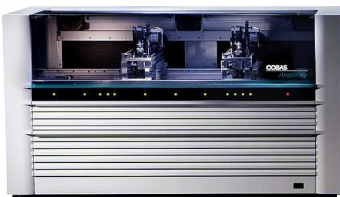
2.2. Nguyên lý: Xét nghiệm cobas s 201 dựa trên 4 quy trình chính:

+ Phân phối/ hút mẫu và hút mẫu chính xác đồng loạt bằng máy hút mẫu Hamilton Microlab Star/Starlet IDV tùy chọn (POOLING Mẫu).



Hình 3: Máy hút mẫu Hamilton Microlab Star/Starlet IDV

+ Chuẩn bị mẫu và đồng loạt dùng máy COBAS AmpliPrep (CAP).



Hình 4: Máy COBAS AmpliPrep (CAP)

+ Khuếch đại đồng loạt Acid Nucleic và phát hiện trong thời gian thực đồng loạt và phân biệt các sản phẩm PCR đồng loạt bằng máy COBAS TaqMan (CTM).

Giới thiệu phương pháp sàng lọc máu an toàn - sàng lọc NAT (Hội thảo máy Cobas' s 201)

Viết bởi: Biên tập viên

Thứ năm, 19 Tháng 9 2019 16:54 - Lần cập nhật cuối: Thứ năm, 19 Tháng 9 2019 17:16



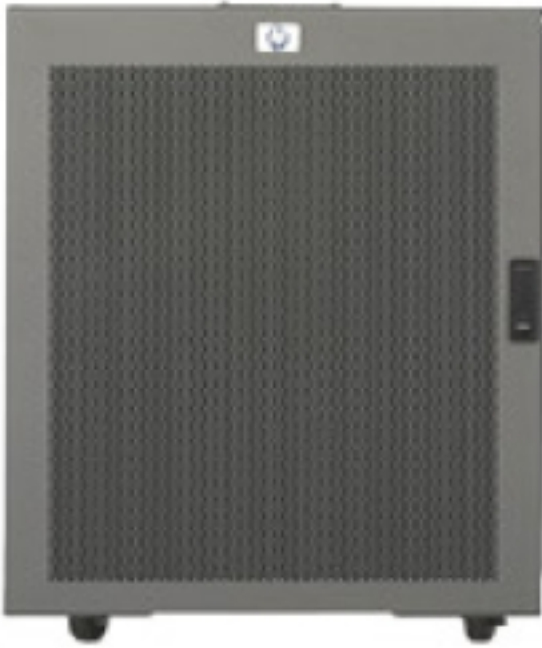
Hình 5: Máy COBAS TaqMan (CTM)

+ Quản lý dữ liệu từ phòng dùng phần mềm tập hợp và quản lý dữ liệu (PDM)

Giới thiệu pháp sàng lọc máu an toàn - sàng lọc NAT (Hàng tháng máy Cobas' s 201)

Viết bởi Biên tập viên

Thứ năm, 19 Tháng 9 2019 16:54 - Lần cập nhật cuối Thứ năm, 19 Tháng 9 2019 17:16



[REDACTED]