

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CHẨN ĐOÁN BA BỘ KIT REALTIME RT-PCR PHÁT HIỆN SARS-COV-2

Hoàng Xuân Sửu¹, Văn Đình Tráng², Đinh Thị Thu Hằng¹,
Hồ Anh Sơn¹, Đinh Việt Đức³, Đỗ Quyết¹, Phạm Ngọc Thạch².

Mở đầu: phương pháp realtime RT - PCR là kỹ thuật phát hiện SARS-CoV-2 đang được phát triển bởi nhiều phòng nghiên cứu và công ty sản xuất kit chẩn đoán. Các bộ sinh phẩm lựa chọn các vùng gen đích khác nhau cho độ nhạy chẩn đoán khác nhau. **Mục tiêu:** nghiên cứu thực hiện với mục tiêu so sánh và đánh giá hiệu quả phát hiện SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật realtime RT - PCR trên 3 bộ kit RealStar-SARS-CoV-2 (Altona Diagnostics, Đức), kit AV - LDA do phòng nghiên cứu phát triển và kit WHO RT - PCR (Berlin - Charite, Đức). **Vật liệu và phương pháp:** tổng số 73 mẫu dịch mũi họng của bệnh nhân dương tính SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật real - time RT - PCR theo qui trình của WHO và người nghi nhiễm được thu thập và tiến hành tách chiết RNA tổng số. Đánh giá ba bộ kit Realtime RT - PCR phát hiện SARS-CoV-2 trên hệ thống máy realtime PCR LightCycler 480 II. Đánh giá độ nhạy, sự phù hợp trong phát hiện bằng các thuật toán hồi qui tuyến tính và biểu đồ Bland - Altman. **Kết quả:** cả 3 bộ kit đều cho độ nhạy chẩn đoán 100% với SARS-CoV-2. Kết quả đánh giá cho thấy cả 3 bộ kit có sự tương quan cao trong xác định SARS-CoV-2 khi phân tích bằng hệ số tương quan và phân tích biểu đồ Bland - Altman theo từng cặp kit với nhau cho thấy không có sự khác biệt về giá trị Ct trung bình giữa các bộ kit. Như vậy, kết quả đánh giá cho thấy cả 3 bộ kit đều có độ chính xác cao trong xét nghiệm chẩn đoán nhiễm SARS-CoV-2.

Từ khóa: COVID-19, SARS-CoV-2, realtime RT - PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự bùng phát dịch bệnh viêm đường hô hấp cấp gây ra bởi SARS-CoV-2 hay còn gọi COVID-19 gần đây là một vấn đề y tế tác động rất lớn đến y tế công cộng cũng như kinh tế xã hội. Tâm dịch bắt nguồn từ thành phố Vũ Hán, Trung Quốc từ tháng 12 năm 2019 sau đó lan nhanh ra các tỉnh, thành của Trung Quốc và nhiều Quốc gia, vùng lãnh thổ trên thế giới⁽¹⁾. Ngày 30 tháng 1 năm 2020, tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã ban bố tình trạng khẩn cấp trên toàn thế giới về dịch bệnh do SARS-CoV-2 gây ra. Do vậy, việc chẩn đoán chính xác ca bệnh đóng vai trò rất

quan trọng trong việc cách ly, quản lý, điều tra dịch tễ bệnh giúp giới chức y tế đưa ra các biện pháp can thiệp kịp thời để kiểm soát và phòng, chống dịch bệnh hiệu quả. Chẩn đoán khẳng định ca bệnh COVID-19 hiện nay chủ yếu dựa vào kỹ thuật xét nghiệm realtime RT - PCR với các cặp mồi và probe đặc hiệu cho SARS-CoV-2⁽²⁾. Tuy nhiên, tại thời điểm bùng phát dịch COVID-19 chưa có kit thương mại nào có chứng chỉ IVD được cấp phép sử dụng trong xét nghiệm phát hiện SARS-CoV-2 trên lâm sàng. Trong khi đó, phương pháp xác định SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS: Next Generation Sequencing) đòi hỏi đầu tư các trang thiết bị hiện đại có chi phí cao và yêu cầu chuyên gia phân tích trình tự chuyên sâu cũng như thời gian cho kết quả muộn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá phân tích độ nhạy chẩn đoán và hiệu quả lâm sàng của 3 kit phát hiện SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật real - time RT - PCR trên mẫu bệnh phẩm mẫu dịch mũi họng của bệnh nhân đã được

⁽¹⁾Viện Nghiên cứu Y - Dược học Quân sự, Học viện Quân y. ⁽²⁾Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương. ⁽³⁾Trung tâm Y học dự phòng Quân đội phía Nam.

Ngày nhận bài: 10/6/2020.

Ngày phân biện xong: 14/6/2020.

Ngày duyệt đăng: 16/6/2020.

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Văn Đình Tráng, Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương.

Điện thoại: 0912956977. E-mail: vandinhtrang.nhtd@gmail.com

kháng định dương tính với SARS-CoV-2 tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương và các mẫu bệnh phẩm từ người nghi nhiễm SARS-CoV-2.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu: 23 mẫu dịch mũi họng của bệnh nhân COVID-19 đã được kháng định dương tính với SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật real - time RT - PCR theo qui trình của WHO được cung cấp bởi Khoa Vi sinh và Sinh học phân tử, Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương và 50 mẫu bệnh phẩm dịch mũi họng của người nghi nhiễm SARS-CoV-2 được sàng lọc tại Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân Y. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân nghi nhiễm là người có ít nhất một trong các triệu chứng: sốt, ho, đau họng, khó thở hoặc viêm phổi và một trong các yếu tố dịch tễ sau: có tiếp xúc gần với ca bệnh hoặc ca bệnh nghi ngờ trong vòng 14 ngày, có tiền sử đến, qua, ở, về từ vùng có ghi nhận ca nhiễm lây truyền nội địa. Mẫu bệnh phẩm sau khi lấy được bất hoạt bằng Trizol, các mẫu bệnh phẩm được vận chuyển vào labo và bảo quản ở từ -20°C cho đến khi sử dụng.

Thiết kế nghiên cứu: đây là nghiên cứu mô tả cắt ngang kết hợp phân tích trong phòng thí nghiệm sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, số liệu được xử lý bằng thống kê SPSS 20.0.

Tách chiết RNA tổng số: RNA được tách chiết từ 140µl mẫu dịch mũi họng đã được bất hoạt trong Trizol bằng bộ kit Qiagen RNA viral mini kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA được thu nhận với thể tích cuối cùng là 60 µl và được bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Realtime RT - PCR: kỹ thuật real - time PCR được tối ưu với cặp mồi và probe thiết kế dựa vào trình tự cung cấp bởi CDC Hoa Kỳ đã được nhóm nghiên cứu chỉnh sửa và phát triển (kit AV - LDA) sử dụng bộ primer và probe cặp N1 và N2 trong đó probe cặp N1 gắn màu TEXAS - RED và probe cặp N2 gắn màu FAM và được tối ưu trong cùng 1 phản ứng real - time RT - PCR(3). Thành phần phản ứng real-time PCR theo kit nghiên cứu AV - LDA với tổng thể tích 20µl và tối ưu theo trình nhiệt: (50°C x 20 phút) (95°C x 15 phút) (94°C x 15 giây; 58°C x 60 giây) x 45 chu kỳ. 2 bộ kit so sánh bao gồm Realstar SARS-CoV-2 RT - PCR 1.0 (Altona Diagnostics, Đức) với tỷ lệ các thành phần real - time PCR gồm Master A, Master B, IC (nội chuẩn - Internal control) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản

xuất⁽⁴⁾. Qui trình WHO RT - PCR (Berlin - Charite, Đức) với các thành phần và chu trình nhiệt được sử dụng theo hướng dẫn của qui trình xét nghiệm phát hiện SARS-CoV-2 của Tổ chức Y tế thế giới⁽⁵⁾. Chứng dương là mẫu RNA tổng hợp in vitro từ plasmid chứa 1 phần gen N của SARS-CoV-2 và chứng âm tương ứng được sử dụng kèm theo mỗi lượt realtime RT - PCR.

Phân tích số liệu: thông tin mẫu bệnh phẩm và kết quả xét nghiệm được mã hóa và nhập liệu bằng phần mềm Excel 2013. Phân tích số liệu sử dụng phần mềm SPSS 20.0. So sánh hiệu quả phát hiện SARS-CoV-2 của các bộ kit dựa trên phân tích sự tương quan bằng phương pháp hồi qui tuyến tính giữa giá trị chu kỳ ngưỡng (Cycle Threshold: Ct). Đồng thời, phân tích hệ số Cohen's Kappa kết hợp với biểu đồ Bland Altman để đánh giá độ mức độ phù hợp chẩn đoán giữa các bộ kit. Sự phù hợp phần trăm dương tính (PPA: Positive Percent Agreement) định nghĩa là tỷ lệ kết quả dương tính kit so với kết quả dương tính của kit sử dụng tham chiếu. Sự phù hợp phần trăm âm tính (NPA: Negative Percent Agreement) định nghĩa là tỷ lệ kết quả âm tính kit so với kết quả âm tính của kit sử dụng tham chiếu. Các giá trị $p < 0,05$ được xem như là có ý nghĩa thống kê khi so sánh sự phù hợp trong phát hiện SARS-CoV-2.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả đánh giá độ nhạy và sự phù hợp phát hiện SARS-CoV-2 của 3 bộ kit realtime RT - PCR.

Trong tổng số 73 mẫu bệnh phẩm dịch mũi họng thu được từ bệnh nhân COVID-19 và người nghi nhiễm SARS-CoV-2 được đánh giá bởi ba bộ kit có 23 mẫu cho kết quả dương tính với hai bộ kit AV - LDA và WHO RT - PCR. Trong khi đó, chỉ có 17 mẫu bệnh phẩm được đánh giá đồng thời bởi cả ba bộ kit AV - LDA, Realstar SARS-CoV-2 và WHO RT - PCR do thể tích RNA không đủ để đánh giá đồng thời cả ba bộ kit. Kết quả được trình bày ở bảng 1. Như vậy cả 3 bộ kit realtime RT - PCR phát hiện SARS-CoV-2 được đánh giá trên hệ thống máy LightCycler 480 instrument II, cho kết quả dương tính 100% với giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) từ 19,0 - 36,9. Tiếp theo chúng tôi phân tích sự phù hợp phát hiện SARS-CoV-2 của 3 bộ kit bằng tính hệ số Cohen's Kappa ($K = 1$) theo từng cặp cho thấy ba bộ kit có sự phù hợp phát hiện 100%. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy độ nhạy và sự phù hợp phát hiện là 100% tương tự như một số nghiên cứu công

bổ gần đây khi so sánh các xét nghiệm phân tử phát hiện SARS-CoV-2 được phát triển bởi phòng thí nghiệm với các kit thương mại sử dụng trong nghiên cứu hoặc dưới hình thức sử dụng ủy quyền trong tình huống khẩn cấp⁽⁶⁾.

| Molecular Assay | | WHO - RT - PCR | | Kappa (SE) | PPA (%) | NPA (%) |
|---------------------|----------|----------------|----------|-------------|---------|---------|
| | | Positive | Negative | | | |
| AV-LDA | Positive | 23 | 0 | 1 (< 0.001) | 100 | 100 |
| | Negative | 0 | 50 | | | |
| Realstar-SARS-CoV-2 | Positive | 17 | 0 | 1 (< 0.001) | 100 | 100 |
| | Negative | 0 | 50 | | | |
| | Negative | 0 | 0 | | | |

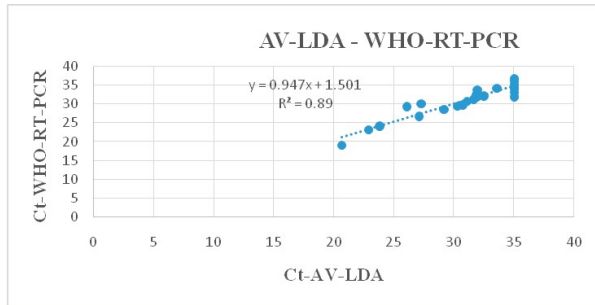
Tiếp theo khi sử dụng bộ kit Realstar SARS-CoV-2 (Altona, Đức) như kit tham chiếu để đánh giá độ nhạy và hiệu quả phát hiện SARS-CoV-2 giữa hai bộ kit AV - LDA và Realstar SARS-CoV-2 trên 17 mẫu dương và 50 mẫu âm tính kết quả cho thấy độ nhạy và sự phù hợp phát hiện là 100%.

| Molecular Assay | | Realstar-SARS-CoV-2 | | Kappa (SE) | PPA (%) | NPA (%) |
|-----------------|----------|---------------------|----------|-------------|---------|---------|
| | | Positive | Negative | | | |
| AV-LDA | Positive | 17 | 0 | 1 (< 0.001) | 100 | 100 |
| | Negative | 0 | 50 | | | |

Đánh giá hiệu quả phát hiện SARS-CoV-2 của 3 bộ sinh phẩm realtime RT-PCR trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

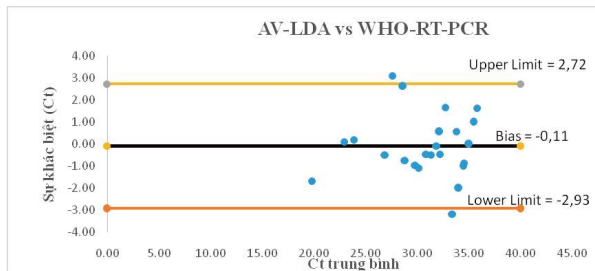
Để đánh giá sự tương quan giữa các bộ kit, giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của các mẫu RNA dương tính được phân tích bằng phương pháp hồi qui tuyến tính và biểu đồ Bland - Altman. Các giá trị được so sánh theo từng cặp để tính chỉ số chênh lệch (Difference) và giá trị Ct trung bình (Mean), từ đó đưa ra kết luận đánh giá theo từng cặp.

Phân tích sự tương quan về giá trị Ct giữa 2 bộ kit AV - LDA và WHO RT - PCR cho thấy, các giá trị so sánh của 2 bộ kit có độ tuyến tính cao được thể hiện qua hệ số tuyến tính bằng 0,89 (Hình 1). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hệ số tương quan cao hơn so với nghiên cứu được công bố bởi Benoit V và cộng sự khi so sánh kit WHO RT - PCR với 1 kit thương mại QIAstat - Dx (Qiagen, Đức) (7).



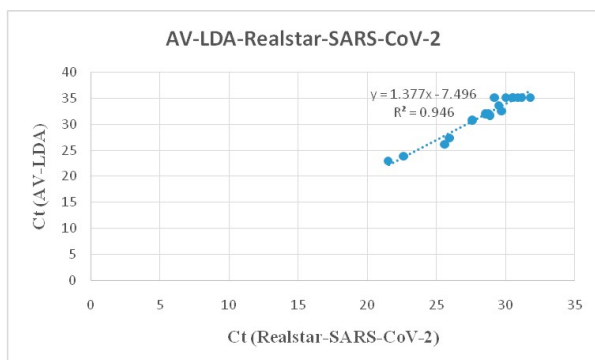
Hình 1. Kết quả đánh giá tương quan giữa kit AV - LDA và WHO RT - PCR

Đánh giá sự khác biệt giá trị Ct của kit AV - LDA và WHO RT - PCR: kết quả tính toán cho giới hạn dưới (LL: Lower limit) và giới hạn trên (UL: Upper limit) của biểu đồ lần lượt là -2,93 và 2,72, độ sai lệch (bias) là -0,11. Kết quả phân tích bằng biểu đồ Bland - Altman cho thấy sự phù hợp giá trị Ct trong chẩn đoán phát hiện SARS-CoV-2 của 2 bộ kit khi có 21/23 giá trị đều nằm trong giới hạn \pm 2SD (-2,93; 2,72).



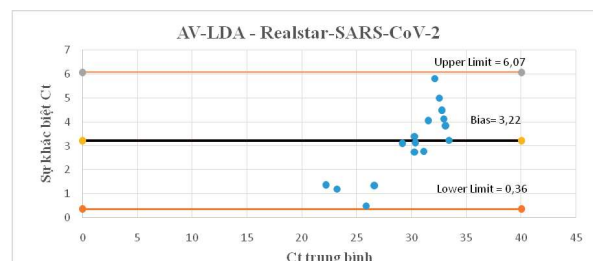
Hình 2. Kết quả phân tích biểu đồ Bland - Altman giữa kit AV - LDA và WHO RT - PCR

Khi đánh giá về sự tương quan về giá trị Ct giữa 2 bộ kit AV - LDA và Realstar SARS-CoV-2 cho thấy, các giá trị so sánh của 2 bộ kit có độ tuyến tính cao được thể hiện qua hệ số tuyến tính bằng 0,946 (Hình 2). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hệ số tương quan tương tự như nghiên cứu được công bố bởi Mario Poljak và cộng sự khi phân tích sự tương quan giữa LightMix với Cobas 6800 ($r^2 = 0,95$ so với $r^2 = 0,94$)⁽⁸⁾.



Hình 3. Kết quả đánh giá tương quan giữa kit AV - LDA và Realstar SARS-CoV-2

Khi đánh giá so sánh sự khác biệt về giá trị Ct trung bình của kit AV - LDA và Realstar SARS-CoV-2: kết quả phân tích cho giới hạn dưới (LL: Lower limit) và giới hạn trên (UL: Upper limit) của biểu đồ lần lượt là 0,36 và - 6,07, độ sai lệch (bias) là 3.22. Kết quả phân tích bằng biểu đồ Bland - Altman cho thấy sự không có sự khác biệt về giá trị Ct trung bình 2 bộ kit trong chẩn đoán phát hiện Sars-CoV-2 khi có tất cả các giá trị đều nằm trong giới hạn $\pm 2SD$ (0,36,59; 6,07).



Hình 4. Kết quả phân tích biểu đồ Bland - Altman giữa kit AV-LDA và Realstar SARS-CoV-2

KẾT LUẬN. Kết quả nghiên cứu cho thấy:

- 3 bộ kit đều có độ nhạy và sự chính xác trong phát hiện SARS-CoV-2 trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.
- Có sự tương quan cao và phù hợp phát hiện SARS-CoV-2 giữa các bộ kit realtime RT - PCR được đánh giá.
- Trong tình trạng khẩn cấp của dịch bệnh COVID-19, các bộ kit này có thể sử dụng trong các phòng xét nghiệm chẩn đoán phân tử để phát hiện SARS-CoV-2 ở các bệnh nhân nghi nhiễm góp phần giúp kiểm soát dịch bệnh và sàng lọc các ca nhiễm bệnh trong cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Jan 24;
2. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases [Internet]. [cited 2020 Feb 9]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
3. Nalla AK, Casto AM, Huang M-LW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, et al. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays using Seven Different Primer/Probe Sets and One Assay Kit. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 8;
4. RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0_WEB_RUO_EN-S02.pdf [Internet]. [cited 2020 May 15]. Available from: https://altona-diagnostics.com/files/public/Content%20Homepage/-%20202%20RealStar/INS%20-%20RUO%20-%20EN/RealStar%20SARS-CoV-2%20RT-PCR%20Kit%201.0_WEB_RUO_EN-S02.pdf
5. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2020 Jan;25(3).
6. Comparison of a Laboratory-Developed Test Targeting the Envelope gene with three Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of SARS-CoV-2 | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cited 2020 May 15]. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1386653220301694?token=1F4650470CC2060301694A88ECAAB207C7E05E131AF8CDB80E0400FC16FFE97A4DADF73A43F95508E72BFD2B1ACC6179>
7. Visseaux B, Le Hingrat Q, Collin G, Bouzid D, Lebourgeois S, Le Pluart D, et al. Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel, the first rapid multiplex PCR commercial assay for SARS-CoV-2 detection. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 27;
8. Poljak M, Korva M, Knap Gašper N, Fujs Komloš K, Sagadin M, Uršič T, et al. Clinical evaluation of the cobas SARS-CoV-2 test and a diagnostic platform switch during 48 hours in the midst of the COVID-19 pandemic. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 10;

EVALUATING EFFICIENCY OF DIAGNOSTICS OF THREE REAL - TIME RT-PCR KITS IN DETECTION SARS-COV-2

Summary

Introduction: The realtime RT - PCR assay is a standard tool for detecting SARS-CoV-2 being developed by many laboratories and molecular diagnostic companies. The selection of different targeted gene regions resulted in different diagnostic sensitivity. *Objectives:* This study aims to compare and evaluate clinical diagnostic performance of three molecular assays for detection of SARS-CoV-2. *Materials and Methods:* A total of 73 clinical specimens collected from patients and suspected cases infected with SARS-CoV-2. Evaluation of diagnostic sensitivity and agreement of three kits including AV - LDA, Realstar SARS-

CoV-2 and WHO RT - PCR on LightCycler 480 II. *Results:* The study results showed the diagnostic sensitivity of 100% for detecting SARS-CoV-2. The comparing results observed a high correlation between kits when analyzed by linear regression and there was no difference in the mean Ct values between the kits by using Bland - Altman plot analysis. *Conclusion:* The study showed that both three molecular assays had the diagnostic sensitivity and clinical performance for detection of SARS-CoV-2 infection. This study provided accurate tools for screening and an effective control of SARS-CoV-2 in epidemic regions.