

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hong HS, Lee JY. Intracranial hemorrhage in term neonates. *Child's Nervous System*, 2018.**34**:1135 - 1143. DOI:10.1007/s00381-018-3788-8.
2. Tan AP, Svrckova P, Cowan F, et al. Intracranial hemorrhage in neonates: A review of etiologies, patterns and predicted clinical outcomes. *European journal of paediatric neurology*, 2018.**22(4)**:690 - 717. DOI: 10.1016/j.ejpn.2018.04.008.
3. Bokhari MR, Bokhari SRA. Arteriovenous Malformation of the Brain. New Orleans, Louisiana: StatPearls, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430744>.
4. Zhang XR, Zhang T, Huard LL. Fatal intracranial hemorrhage from brain AVM in a 7-week-old infant: case report and recent literature review. *Child's Nervous System*, 2020. DOI:10.1007/s00381-020-04515-8.
5. Rattani A, Dewan MC, Hannig V. Cerebral hemorrhage in monozygotic twins with hereditary hemorrhagic telangiectasia: case report and hemorrhagic risk evaluation. *J Neurosurg Pediatr*, 2017.**20(2)**:164 - 169. DOI:10.3171/2017.3.PEDS16587.
6. Volpe JJ. Intracranial Hemorrhage in Early Infancy: Renewed Importance of Vitamin K Deficiency. *Pediatric Neurology* 50, 2014:545-546. DOI:10.1016/j.pediatrneurol.2014.02.017.
7. El-Ghanema M, Kass-Houtb T, Kass-Hout O. Arteriovenous Malformations in the Pediatric Population: Review of the Existing Literature. *Intervent Neurol*, 2016.**5**:218-225. DOI: 10.1159/000447605.

GIÁ TRỊ SỬ DỤNG CỦA PHƯƠNG PHÁP RT-qPCR TIẾT KIỆM HÓA CHẤT CHẨN ĐOÁN SARS-COV-2 TỪ MẪU PHẾT TỖ HẦU

Nguyễn Hưng Thịnh^{1,2}, Nguyễn Đoàn Huỳnh Anh Phúc^{1,2}, Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn^{1,2}

TÓM TẮT

Giới thiệu: Thách thức lớn của việc kiểm soát dịch hiệu quả bao gồm gánh nặng về chi phí và năng lực chăm sóc sức khỏe. Xét nghiệm phát hiện RNA của virus trong mẫu phết tỵ hầu của người bằng kỹ thuật RT-qPCR là then chốt trong công tác phòng chống dịch tại Việt Nam. Tuy nhiên, kỹ thuật này đặt ra nhiều thách thức bao gồm tốc độ xét nghiệm chậm, chi phí xét nghiệm cao và sự thiếu hụt nguồn cung hóa chất và vật tư xét nghiệm. Nghiên cứu cải tiến quy trình kỹ thuật thực hiện phản ứng RT-qPCR chẩn đoán SARS-CoV-2 này nhằm nâng cao hiệu quả xét nghiệm khẳng định SARS-CoV-2. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm được thực hiện trên bộ sinh phẩm LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control (Roche, Thụy Sĩ), bộ sinh phẩm TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ) và các mẫu RNA được ly trích từ mẫu phết tỵ hầu từ người tình nguyện. Điều kiện phản ứng liên quan đến dung tích phản ứng, nồng độ đoạn mồi và đoạn dò lặn được giảm còn 50% so với khuyến cáo. Tại mỗi điều kiện, giá trị sử dụng của phản ứng RT-qPCR được khảo sát và ghi nhận về các tiêu chí kỹ thuật của phản ứng PCR, độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu. **Kết quả:** Phản ứng RT-qPCR ở thể tích phản ứng 20 µL với nồng độ đoạn mồi và đoạn dò giảm đi 50% và ở thể tích phản ứng 10 µL

thỏa các tiêu chí kỹ thuật của phản ứng PCR. Độ chính xác cao với CV trong một ngày và ba ngày nhỏ hơn 11%, độ nhạy và độ đặc hiệu 100%. **Kết luận:** Quy trình kỹ thuật RT-qPCR chẩn đoán SARS-CoV-2 từ mẫu phết tỵ hầu tiết kiệm hóa chất đạt các tiêu chí của quy trình xác nhận giá trị sử dụng của xét nghiệm, có khả năng áp dụng và chuyển giao cho các cơ sở y tế.

Từ khóa: Đại dịch Covid 19, SARS-CoV-2, RT-qPCR.

SUMMARY

VALIDATION OF A REAGENT-SAVING RT-QPCR PROCEDURE FOR SARS-COV-2 DIAGNOSIS

Introduction: Key challenges for the effective Covid-19 pandemic control comprise financial burden and care capacity. The test detecting virus RNA in the nasopharyngeal swab by RT-qPCR is pivotal for the pandemic management in Vietnam. However, this technique possessed potential difficulties, including slow turn-around time, high cost and the shortage of reagent supply. This study aims at SARS-CoV-2 testing procedure transformation to improve its effectiveness. **Materials and Method:** Experimental study was carried out on the LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control kit (Roche, Switzerland), TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit (ThermoFisher, US) and RNA samples extracted from volunteer nasopharyngeal swab. Reaction conditions related to its volume & primer and probe concentration were examined at the level that is as low as 50% of the manufacturer recommendation. At each condition, PCR technical quality specifications, testing precision, sensitivity and specificity were validated. **Results:** The RT-qPCR reaction performed with 50% of primer and probe concentration, either at volume of 20 µL or 10 µL, met the technical quality specifications for a PCR assay. The assay showed a good CV (less than 11%)

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch,

²Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Trung Tâm Nghiên Cứu Y Sinh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Ngọc

Email: nhntuan@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 8.7.2022

Ngày phản biên khoa học: 26.8.2022

Ngày duyệt bài: 7.9.2022

between runs within the day and along 3 days while its sensitivity and specificity are 100%. **Conclusion:** The RT-qPCR procedure diagnosing SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swab, that is performed in a reagent-saving manner, fulfills assay validation criteria and is ready to transfer to medical units.

Keyword: Covid-19 pandemic, SARS-CoV-2, RT-qPCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng nguy kịch hô hấp cấp do vi-rút Corona (SARS-CoV-2) lần đầu tiên được phát hiện ở thành phố Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc vào cuối tháng 12 năm 2019, đã và đang là vấn đề sức khỏe đặc biệt quan trọng đối với mọi quốc gia trên thế giới [1]. Các xét nghiệm chẩn đoán SARS-CoV-2 có thể được chia thành ba nhóm: (1) nhóm các xét nghiệm phân tử phát hiện RNA của virus, (2) nhóm các xét nghiệm miễn dịch học phát hiện các kháng nguyên của virus và (3) nhóm các xét nghiệm huyết thanh học phát hiện các kháng thể được cơ thể tạo ra do tiếp xúc với virus. Trong đó, xét nghiệm phân tử trực tiếp phát hiện RNA của virus trong mẫu phết ty hầu của người bằng kỹ thuật RT-qPCR là then chốt trong công tác phòng chống dịch tại Việt Nam.

Việc tổ chức thực hiện xét nghiệm SARS-CoV-2 nhanh chóng cho thấy tiềm ẩn nhiều khó khăn nếu triển khai rộng khắp trong một thời gian dài, bao gồm tốc độ xét nghiệm chậm, chi phí xét nghiệm cao và sự thiếu hụt nguồn cung hóa chất xét nghiệm. Thực tế này đặt ra nhu cầu bức thiết cần tối ưu hóa lượng hóa chất dùng cho xét nghiệm RT-qPCR chẩn đoán SARS-CoV-2.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thực nghiệm trên bộ sinh phẩm LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control (Roche, Thụy Sĩ), bộ sinh phẩm TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ) và mẫu RNA được ly trích từ mẫu phết ty hầu từ người tình nguyện; từ 08/2021 đến 06/2022, tại Phòng Xét nghiệm SARS-CoV-2, Đơn vị Dịch vụ, Trung tâm nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

Thu nhận mẫu RNA âm tính với SARS-CoV-2: chọn ngẫu nhiên các mẫu RNA ly trích từ mẫu phết ty hầu đã có kết quả xét nghiệm SARS-CoV-2 âm tính theo quy trình của phòng xét nghiệm khẳng định SARS-CoV-2 tại Bệnh viện Nguyễn Tri Phương.

Tạo dung dịch gộp âm tính: hút 30 μ l dung dịch sau ly trích của mỗi mẫu SARS-CoV-2 âm tính để tạo dung dịch gộp âm tính.

Xác định độ chính xác, độ nhạy, độ đặc

hiệu, hệ số tương quan và hiệu suất phản ứng của phản ứng RT-qPCR trong thể tích 20 μ L với nồng độ đoạn môi /đoạn dò giảm 50%: (1) Pha loãng mẫu chứng dương gen E từ bộ sinh phẩm LightMix® theo cơ số 5 để có 5 mức nồng độ khác nhau. Các mẫu dương và 20 mẫu bệnh phẩm âm tính được thực hiện 02 phản ứng song song trong mỗi lần thử nghiệm. Tổng số lần thử nghiệm là 05 lần trong 03 ngày (ngày thứ nhất thử nghiệm 3 lần, ngày thứ hai 1 lần và ngày thứ ba 1 lần). Chu trình nhiệt cho qPCR theo hướng dẫn nhà sản xuất (55°C-03phút, 95°C-30 giây, 95°C-3 giây và 60°C-30 giây x 40 chu kỳ). Thời điểm ghi nhận tín hiệu sản phẩm PCR là cuối mỗi chu kỳ. Dựa vào kết quả Ct thu nhận được độ chính xác, độ xác thực, độ nhạy và độ đặc hiệu, hệ số tương quan R^2 và hiệu quả của phản ứng E% được tính toán. Tiêu chuẩn cần phải đạt là: (i) độ chính xác đạt khi CV% trong ngày và giữa các ngày $\leq 11\%$ [2]; (ii) độ nhạy và độ đặc hiệu $\geq 90\%$ [3]; (iii) hệ số tương quan $R^2 \geq 0,98$ và hiệu suất phản ứng E% đạt trong khoảng 90 – 105% [4, 5].

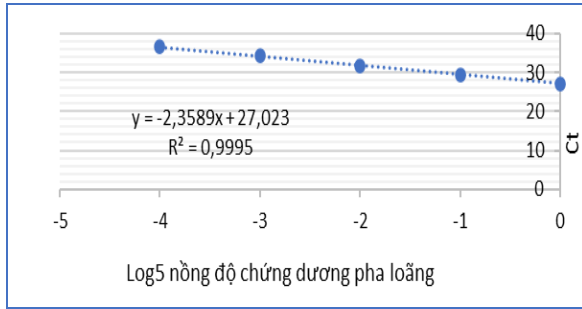
Xác định độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, hệ số tương quan và hiệu suất phản ứng của phản ứng RT-qPCR trong thể tích 10 μ L: Thử nghiệm được tiến hành tương tự nhưng ở thể tích phản ứng 10 μ L. Hóa chất từ bộ sinh phẩm LightMix® và TaqPath™ đều được giảm theo tỷ lệ so với khuyến cáo của nhà sản xuất. Các thông số được tính toán và nhận định dựa trên cùng bộ tiêu chí.

Xử lý số liệu: Dữ liệu được thu thập, xử lý, và thể hiện thành biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013.

Đạo đức trong nghiên cứu: Đề tài được cấp Chứng nhận chấp thuận của Hội đồng Đạo Đức Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch (số 577/TĐHYKPNT-HĐĐĐ ngày 10/01/2022) và của Hội đồng Đạo Đức Bệnh viện Nguyễn Tri Phương (số 65/NTP-CĐT ngày 13/01/2022).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Phản ứng RT-qPCR trong thể tích 20 μ L với nồng độ đoạn môi /đoạn dò giảm 50%: Thực hiện phản ứng RT-qPCR trong thể tích 20 μ L với nồng độ đoạn môi /đoạn dò giảm 50% trên mẫu chứng dương gen E pha loãng để có 5 mức nồng độ đạt được hệ số tương quan R^2 của phản ứng là 0,9995 và hiệu suất phản ứng E% là 97,84% (Hình 1). CV% trong ngày và trong ba ngày lần lượt là 1,7% và 1,3% (Bảng 1). Độ nhạy và độ đặc hiệu phản ứng cùng là 100%.



Hình 1. Phản ứng RT-qPCR trong thể tích 20µL với nồng độ đoạn mồi / đoạn dò giảm 50% thỏa các tiêu chí kỹ thuật về hiệu suất phản ứng

Bảng 1. Độ lệch chuẩn và CV% trong cùng 1 ngày và trong 3 ngày của giá trị Ct ở thể tích 20µL với nồng độ đoạn mồi / đoạn dò giảm 50%

	Độ lệch chuẩn trung bình (SD)	Độ biến thiên trung bình (CV%)
Trong 1 ngày	0,553	1,7%
Trong 3 ngày	0,415	1,3%

Phản ứng RT-qPCR trong thể tích 10 µL:

Thực hiện phản ứng RT-qPCR trong thể tích 10 µL trên mẫu chứng dương gen E pha loãng để có 4 mức nồng độ đạt được hệ số tương quan R² của phản ứng là 0,9984 và hiệu suất phản ứng E% là 105% (Hình 2). CV% trong ngày và trong ba ngày lần lượt là 2,09% và 2,22% (Bảng 2).

Bảng 3. Độ lệch chuẩn và CV% trong cùng 1 ngày và trong 3 ngày của giá trị Ct ngày thể tích 10 µL sử dụng bộ sinh phẩm TaqPath™

Vùng gen	Độ lệch chuẩn trung bình (SD)			Độ biến thiên trung bình (CV%)		
	N	ORF1ab	S	N	ORF1ab	S
1 ngày	0,658	0,296	0,600	2,375	1,06	2,19
3 ngày	1,2185	1,1145	0,978	4,49	4,35	3,82

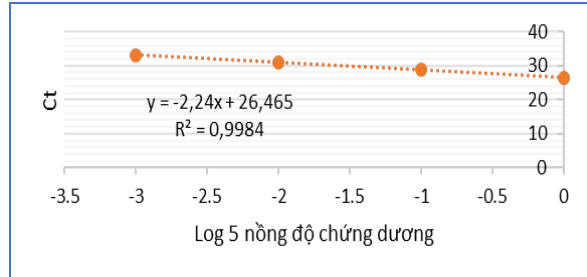
Ở thể tích phản ứng là 10 µL, độ nhạy và độ đặc hiệu dựa trên kết quả chẩn đoán của các mẫu giả lập, bao gồm 15 mẫu dương và 20 mẫu âm cho bộ sinh phẩm LightMix® và 25 mẫu dương và 20 mẫu âm cho bộ sinh phẩm TaqPath™. Độ nhạy và độ đặc hiệu của cả 2 bộ sinh phẩm trong điều kiện phản ứng khảo sát là 100% (Bảng 4).

Bảng 4. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng RT-qPCR với thể tích 10 µL

LightMix®		Mẫu thử		Độ nhạy 100%
Kết quả RT- qPCR		Dương tính	Âm tính	
		Dương tính	15	0
Âm tính		0	20	
TaqPath™		Mẫu thử		Độ nhạy 100%
Kết quả RT- qPCR		Dương tính	Âm tính	
		Dương tính	25	0
Âm tính		0	20	

IV. BÀN LUẬN

Quy trình xác nhận giá trị sử dụng kỹ thuật RT-qPCR nhằm mục đích cung cấp bằng chứng khách quan theo tiêu chí của phòng xét nghiệm ISO 15189:2012, xác nhận rằng quy trình phân



Hình 2. Phản ứng RT-qPCR trong thể tích 10µL sử dụng bộ sinh phẩm LightMix® thỏa các tiêu chí kỹ thuật về hiệu suất phản ứng

Bảng 2. Độ lệch chuẩn và CV% trong cùng 1 ngày và trong 3 ngày của giá trị Ct ở thể tích 10 µL sử dụng bộ sinh phẩm LightMix®

	Độ lệch chuẩn trung bình (SD)	Độ biến thiên trung bình (CV%)
Trong 1 ngày	0,637	2,09
Trong 3 ngày	0,68	2,22

Phản ứng PCR thực hiện với bộ sinh phẩm TaqPath™ trên mẫu chứng dương được pha loãng cơ số 10 để có 5 mức nồng độ, ở thể tích 10 µL, có hệ số tương quan R² của phản ứng cho gen N, gen ORF1ab và gen S lần lượt là 0,9919, 0,9995 và 0,9996; hiệu suất phản ứng E% là 92,14%, 95,34% và 96,88%. CV% trong 1 ngày và trong 3 ngày cho cả 3 gen lần lượt là 1,875% và 4,22% (Bảng 3).

tích được sử dụng cho một thử nghiệm cụ thể là phù hợp với mục đích sử dụng [6]. Các thông số kỹ thuật cần đạt được để xác nhận giá trị sử dụng của một kỹ thuật chẩn đoán SARS-CoV-2 bao gồm: độ chính xác trong ngày và giữa các ngày với độ dao động (CV%) phải nhỏ hơn mức

độ cho phép của hãng sản xuất [3, 7]. Hệ thống máy Quant Studio 5 của hãng ThermoFisher thì mức độ CV chấp nhận là dưới 11% [8]; độ xác thực trên 90%, độ nhạy trên 90% và độ đặc hiệu trên 90% [3].

Trong nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng tiết kiệm hóa chất trong việc thực hiện phản ứng RT-qPCR qua hai giai đoạn: (1) giữ nguyên thể tích phản ứng nhưng giảm nồng độ đoạn mồi và đoạn dò 50% và (2) giảm thể tích của phản ứng xuống 10 μ L. Các thử nghiệm đã xác nhận giá trị của phương pháp tiết kiệm hóa chất này khi sử dụng bộ sinh phẩm LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control (Roche, Thụy Sĩ) lẫn TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ). Đặc biệt, cả 3 vùng gen mục tiêu của bộ sinh phẩm TaqPath™ đều thể hiện sự nhất quán về độ biến thiên qua những lần thử nghiệm lặp lại. Độ nhạy và đặc hiệu trong chẩn đoán SARS-CoV-2 của cả 2 bộ sinh phẩm được bảo toàn 100%.

V. KẾT LUẬN

Giá trị sử dụng của hai bộ sinh phẩm LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control (Roche, Thụy Sĩ) và TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ) trong các điều kiện thực hiện phản ứng tiết kiệm hóa

chất hơn so với khuyến cáo của nhà sản xuất (giảm 50% nồng độ đoạn mồi và đoạn dò, thể tích phản ứng là 10 μ L) đã được xác nhận. Kết quả này cho phép việc triển khai xét nghiệm SARS-CoV-2 bằng các bộ sinh phẩm và hệ thống thiết bị đã khảo sát trong thực hành thường quy với độ tin cậy cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhou, P., et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. 2020. **579**(7798): p. 270-273.
2. Standardization, I.O.f., **ISO 5725-1: 1994: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-part 1: general principles and definitions.** 1994: International Organization for Standardization.
3. Bohn, M.K., et al., IFCC interim guidelines on molecular testing of SARS-CoV-2 infection. 2020. **58**(12): p. 1993-2000.
4. Biorad, Real-Time PCR Applications Guide. 2006.
5. Stephen Bustina, J.H., qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. Biomolecular Detection and Quantification, 2017. **14**: p. 19-28.
6. Mitchell, S., et al., Verification procedure for commercial tests with Emergency Use Authorization for the detection of SARS-CoV-2 RNA [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 8]. 2020.
7. (UK), D.o.H.S.C., Technical validation protocol for SARS - CoV - 2 nucleic acid detection. 2021.
8. Fisher, T., Precision in qPCR. 2021.

NHÂN MỘT TRƯỜNG HỢP THÙNG TÚI THỪA MECKEL DO XƯƠNG CÁ ĐƯỢC ĐIỀU TRỊ BẰNG PHẪU THUẬT NỘI SOI

Vũ Ngọc Sơn*, Hồ Hữu An*

TÓM TẮT

Giới thiệu: Túi thừa Meckel là dị tật bẩm sinh của đường tiêu hóa với tỷ lệ khoảng 0,14 – 4,5%, hầu hết không có triệu chứng và chỉ được phát hiện tình cờ. Thùng túi thừa Meckel do dị vật là một trong những biến chứng rất hiếm gặp. **Trình bày ca bệnh:** Bệnh nhân (BN) nam 35 tuổi vào viện với biểu hiện đau bụng cấp vùng hố chậu phải. Chụp cắt lớp vi tính ổ bụng bụng thấy hình ảnh nghi dị vật đâm thủng ruột. Tổn thương trong mổ là hoại tử, thùng túi thừa Meckel do xương cá gây viêm phúc mạc. Bệnh nhân được phẫu thuật nội soi (PTNS) cắt túi thừa Meckel, lau rửa ổ bụng. Sau 6 ngày điều trị, bệnh nhân ra viện trong tình trạng ổn định. **Kết luận:** Thùng túi thừa Meckel

do dị vật là bệnh cảnh hiếm gặp. Phẫu thuật nội soi đóng vai trò quan trọng giúp chẩn đoán xác định nguyên nhân và xử lý tổn thương an toàn, hiệu quả.

SUMMARY

A CASE REPORT: A MECKEL'S DIVERTICULUM PERFORATION DUE FISHBONE WAS TREATED BY LAPAROSCOPIC SURGERY

Introduction: Meckel's diverticulum is a congenital malformation of the gastrointestinal tract with an incidence of about 0.14 - 4.5%, most cases are asymptomatic and are discovered incidentally. Perforation of Meckel's diverticulum due to foreign bodies is one of the very rare complications. A 35-year-old male patient was admitted to the 108 Hospital with acute abdominal pain in the right iliac region. CT scan showed an intra-abdominal infiltrate, suspected of a foreign body perforating the intestine. The intraoperative injury was noted as necrosis, perforation of Meckel's diverticulum due to fishbone causing peritonitis. The patient underwent laparoscopic surgery to resect Meckel's diverticulum,

*Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Ngọc Sơn

Email: sonk33g@gmail.com

Ngày nhận bài: 6.7.2022

Ngày phản biện khoa học: 22.8.2022

Ngày duyệt bài: 7.9.2022