DOI: https://doi.org/10.59294/HIUJS.27.2024.556

Định lượng virus viêm gan siêu vi C bằng kỹ thuật Digital PCR

Huỳnh Thị Thu Thảo[1], Hà Thị Anh[1], Nguyễn Thị Nga[1], Vũ Thị Hải Yến[1] và Nguyễn Tuấn Anh[2,*]

[1]Trường Đại học Quốc Tế Hồng Bàng

[2]Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Viêm gan C là bệnh viêm gan do virus HCV gây ra, nếu không phát hiện bệnh sớm ở giai đoạn đầu, bệnh dễ tiến triển nhanh, gây tổn thương gan và ung thư gan. Tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm HCV có sự khác nhau theo vùng và giữa các nhóm nguy cơ, dao động từ 1 - 2.9% trong cộng đồng. Xét nghiệm HCV-RNA có ý nghĩa hết sức quan trọng trong việc quản lý bệnh, giúp quyết định thời điểm điều trị, theo dõi đáp ứng cũng như đánh giá thời điểm dừng điều trị. Kỹ thuật digital PCR (dPCR) là kỹ thuật mới, có nhiều ưu điểm vượt trội so với real-time PCR trong định lượng tải lượng HCV. Trong nghiên cứu này, quy trình dPCR được xây dựng trên mẫu amplicon (đã giải trình tự Sanger) và các điều kiện của phản ứng dPCR được xác định gián tiếp thông qua phương pháp real-time PCR. Quy trình dPCR được đề xuất như sau: nhiệt độ bắt cặp 60ºC, 500 nM mồi và 100 nM mẫu dò. Áp dụng trên 44 mẫu lâm sàng, quy trình dPCR có khả năng phát hiện và định lượng 02 mẫu HCV có nồng độ thấp. Kết quả đề tài cho thấy khả năng áp dụng kỹ thuật dPCR để phát hiện và định lượng HCV trong xét nghiệm thường quy.

Từ khóa: *Viêm gan C, HCV, digital PCR, real-time PCR, định lượng*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan là một bệnh truyền nhiễm, ảnh hưởng chủ yếu đến gan, chủ yếu do virus viêm gan gây ra [1]. Viêm gan mạn tính do virus phần lớn diễn biến dần dần, ở giai đoạn đầu thường không có triệu chứng, khi phát hiện bệnh đã chuyển sang giai đoạn xơ gan, thậm chí là ung thư biểu mô tế bào gan [2]. Có nhiều loại virus gây bệnh viêm gan bao gồm virus viêm gan A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV), E (HEV), G (HGV), ngoài ra một số loại virus cũng gây hại cho gan nhưng không được xếp vào các loại virus gây bệnh gan như CMV, EBV, ... trong đó HCV là có thể gây viêm gan mạn tính, đẩy nhanh diễn tiến bệnh đến xơ gan và ung thư gan [3]. Bệnh viêm gan C lần đầu được phát hiện vào năm 1989, do Hepatitis C virus gây ra. Ở giai đoạn đầu, bệnh nhân thường ít gây triệu chứng rõ ràng và điển hình, chủ yếu là các dấu hiệu mệt mỏi, chán ăn rối loạn tiêu hóa, ít khi bị vàng da [4]. Việc phát hiện bệnh hầu hết là do tình cờ khi xét nghiệm máu hoặc kiểm tra sức khỏe [4]. Diễn biến bệnh âm thầm, chưa có vaccine phòng ngừa, tỷ lệ chuyển thành ung thư gan và xơ gan cao hơn so với bệnh viêm gan B [4]. Mặt khác, chi phí điều trị khá cao và cần tuân theo phác đồ điều trị chặt chẽ [5]. Do đó, việc xét nghiệm định kì là rất cần thiết để phát hiện viêm gan sớm. Ngày nay, nhờ các tiến bộ của công nghệ hiện đại, việc điều trị bằng các thuốc kháng virus đã giúp giảm thiểu và ngăn chặn bệnh viêm gan tiến triển tới bệnh lý nặng như xơ gan, ung thư tế bào gan nguyên phát, hay suy gan. Để có hiệu quả, việc theo dõi tải lượng virus giúp lựa chọn phác đồ điều trị hay kiểm tra đáp ứng thuốc của bệnh nhân là rất cần thiết.

Hiện nay, các xét nghiệm dựa trên vật liệu di truyền của virus (RNA đối với HCV) nhằm phát hiện và định lượng virus được xem là "tiêu chuẩn vàng" để chẩn đoán, theo dõi và điều trị viêm gan do HCV gây ra [6]. Trong đó, kỹ thuật dPCR là công nghệ mới được xem là công cụ hiệu quả trong việc chẩn đoán và theo dõi điều trị đối với các bệnh nhân viêm gan nhiễm HCV [7 - 8]. Công nghệ mới này cho thấy những cải tiến đáng kể so với kỹ thuật real-time như: định lượng tuyệt đối mà không phụ thuộc vào đường chuẩn, độ nhạy, độ đặc hiệu cao và độ lặp lại ổn định. Theo hướng dẫn của Bộ Y tế về xét nghiệm và điều trị viêm gan C, xét nghiệm HCV-RNA có ý nghĩa hết sức quan trọng trong việc quản lý tiến triển bệnh, giúp quyết định thời điểm điều trị, theo dõi đáp ứng quá trình điều trị cũng như đánh giá

Tác giả liên hệ: Nguyễn Tuấn Anh
Email: anh.nt@umc.edu.vn

thời điểm dừng điều trị. Đến nay, chưa có bất kì bộ kit thương mại được phát triển dựa trên kỹ thuật dPCR phục vụ cho xét nghiệm định lượng HCV-RNA. Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài nhằm xây dựng quy trình dPCR định lượng HCV-RNA với độ nhạy và độ đặc hiệu cao trên đối tượng là các bệnh nhân đến khám và điều trị tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh - Cơ sở 2.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu chuẩn HCV, bộ mồi và mẫu dò

Bộ ba mẫu HCV chuẩn (mẫu amplicon HCV được trộn với DNA/RNA tách chiết - âm tính với HCV) có nồng độ từ 2×10^5 - 2×10^1 bản sao/µL. Chi tiết về nồng độ amplicon HCV trong bộ mẫu HCV chuẩn và nồng độ amplicon HCV ước tính trong từng phản ứng được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Bộ mẫu chuẩn sử dụng trong thí nghiệm xác định các điều kiện của quy trình

Mẫu	Nồng độ amplicon HCV trong mẫu DNA	Nồng độ cuối trong phản ứng PCR
HCV-H	2×10^5 bản sao/µL	10^6 bản sao/phản ứng
HCV-M	2×10^4 bản sao/µL	10^5 bản sao/phản ứng
HCV-L	2×10^2 bản sao/µL	10^3 bản sao/phản ứng

Bộ mồi và mẫu dò sử dụng để định lượng HCV-RNA tham khảo từ nghiên cứu của Zauli và cs (2016) [9] và chứng nội tham khảo trong nghiên cứu của Yang và cs (2015) [10]. Chứng nội sử dụng trong nghiên cứu là tiểu đơn vị Hemoglobin beta (*Hemoglobin subunit beta*, *HBB*). Những thông tin cơ bản của các mồi và độ đặc hiệu của mồi được kiểm tra bằng công cụ PrimerQuest Tool và Primer-BLAST.

Bảng 2. Trình tự mồi và mẫu dò được sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5' - 3')	Chiều dài (bp)	T_m (°C)	Kích thước (bp)	TLTK
HCV-F	AGCGTCTAGCCATGGCGTT	19	58.6	235	[9]
HCV-R	GCAAGCACCCTATCAGGCAGT	21	59.0		
Probe-HCV	**HEX**-TCTGCGGAACCGGTGAGT-**MGB**	18	57.6		
IC-F	CAGGTACGGCTGTCATCACTTAGA	24	57.9	185	[10]
IC-R	CATGGTGTCTGTTTGAGGTTGCTA	24	57.2		
Probe-IC	**Cy5**-GCCCTGACTTTTATGCCCAGCCCTG-**QSY**	25	63.6		

Ghi chú: HEX, Cy5 - reporter; QSY, MGB, QSY - quencher.

2.2. Bộ mẫu nghiên cứu, tách chiết RNA và tổng hợp cDNA

Bộ mẫu lâm sàng là mẫu huyết thanh được cung cấp từ Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM-Cơ sở 2. Việc thu thập mẫu tuân thủ theo quyết định của Hội Đồng Y Đức Đại học Quốc tế Hồng Bàng, quyết định số HHYD-09/PCT-HĐĐĐ, kí ngày 02/02/2023. Tổng cộng 44 mẫu huyết thanh của bệnh nhân có kết quả dương tính hoặc âm tính HCV bằng phương pháp real-time PCR (Sacace Biotechnologies, Ý) được thu nhận và bảo quản ở điều kiện -80°C. Sau đó, mẫu huyết thanh được tách chiết acid nucleic tổng số bằng bộ kit AccuRive Viral sDNA/RNA Prep Kit (EX-DNA02.1F, Khoa Thương). 15µl acid nucleic tổng số (bao gồm DNA/RNA) được chuyển đổi thành cDNA bằng bộ kit SensiFAST cDNA Synthesis Kit (#BIO-65054, Bioline). Mẫu cDNA được bảo quản ở điều kiện -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Phương pháp real-time PCR và tối ưu các điều kiện của quy trình dPCR định lượng HCV

Kỹ thuật real-time PCR được sử dụng nhằm xác định gián tiếp các điều kiện tối ưu của quy trình dPCR định lượng HCV. Phản ứng real-time PCR được thực hiện bằng bộ kit qPCR BIO Probe Mix No-ROX (#PB20.23, PCR Biosystems) trên máy SaCycler-96 - Real Time (Sacace Biotechnologies, Ý). Thành phần phản ứng real-time PCR bao gồm: 1X qPCRBIO Probe Mix No-ROX, Y µM mẫu dò, A µM mồi xuôi, A µM mồi ngược và 100 ng mẫu cDNA. Phản ứng real-time PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 3 phút, 40 chu kỳ (95°C trong 15 giây, X°C trong 15 giây và 72°C trong 15 giây). Các phản ứng luôn kèm theo chứng âm (không chứa DNA) nhằm kiểm soát ngoại nhiễm và được lặp lại 3 lần. Các điều kiện cần tối ưu của phản ứng bao gồm:

- Nhiệt độ bắt cặp của mồi (X): 58°C, 60°C và 62°C.

- Nồng độ của mồi (A): 0.4 µM, 0.5 µM và 0.6 µM.
- Nồng độ mẫu dò (Y): 0.05µM, 0.1µM và 0.15µM.

2.4. Độ đặc hiệu, độ nhạy và đường chuẩn

Độ đặc hiệu của mồi và mẫu dò được đánh giá qua khả năng phát hiện đúng DNA đích mà không phát hiện nhầm lẫn vật liệu di truyền của các đối tượng khác. Trong nghiên cứu này, tính đặc hiệu của các cặp mồi được kiểm tra với amplicon HCV được sử dụng làm chứng dương và cDNA của các tác nhân khác như: Hepatitis B virus, Hepatitis D virus, Human Immunodeficiency virus, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Listeria monocytogenes, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Haemophilus influenzae, Vibrio cholerae, Acinetobacter baumannii, Proteus mirabilis, Streptococcus pyogenes* và *Klebsiella oxytoca.*

Nghiên cứu sử dụng mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ (10^6 bản sao/phản ứng), pha loãng bậc 10 thành các nồng độ nhỏ hơn (10^5, 10^4,10^3, 10^2, 10^1 và 10^0 bản sao/phản ứng). Kỹ thuật real-time PCR thực hiện với cùng các thành phần và chu trình nhiệt đã tối ưu ở trên. Sau đó, giá trị Ct tại từng nồng độ sẽ được ghi nhận và tiến hành xây dựng đường chuẩn.

2.5. Phương pháp dPCR

Phản ứng dPCR được thực hiện bằng bộ hóa chất Absolute Q™ DNA Digital PCR Master Mix (#A52490, ThermoFisher Scientific) và thực hiện trên hệ thống máy QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Các điều kiện tối ưu được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR được chuyển đổi sang dPCR, bao gồm: nhiệt độ bắt cặp của mồi ($X_{tối ưu}$), nồng độ của mồi ($A_{tối ưu}$) và nồng độ mẫu dò ($Y_{tối ưu}$). Thành phần của phản ứng dPCR bao gồm: 1X Master Mix, $A_{tối ưu}$ µM mồi xuôi, $A_{tối ưu}$ µM mồi ngược, $Y_{tối ưu}$ µM mẫu dò và 100 ng mẫu cDNA. Phản ứng dPCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 10 phút, 40 chu kỳ (96°C trong 5 giây, $X_{tối ưu}$ trong 5 giây và 72°C trong 20 giây). Các phản ứng luôn kèm theo chứng âm (không chứa DNA) nhằm kiểm soát ngoại nhiễm và được lặp lại 3 lần. Kết quả định lượng của kỹ thuật dPCR được xác định bằng phần mềm phân tích QuantStudio Absolute QTM (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Phần mềm cung cấp nồng độ DNA/cDNA mục tiêu cùng với khoảng tin cậy 95% dựa trên mô hình phân phối Poisson.

2.6. Thử nghiệm quy trình dPCR định lượng HCV đã tối ưu trên mẫu huyết thanh lâm sàng

Quy trình dPCR tối ưu được thử nghiệm với 44 mẫu huyết thanh lâm sàng nhằm định lượng tải lượng HCV. Đồng thời, các mẫu này được xác định nồng độ HCV bằng kỹ thuật real-time PCR. Kết quả dương tính và âm tính với HCV, cũng như tải lượng virus được ghi nhận và so sánh hiệu quả giữa hai phương pháp.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tối ưu quy trình real-time PCR định lượng HCV

3.1.1. Xác định nhiệt độ bắt cặp tối ưu của mồi và mẫu dò

Nhiệt độ bắt cặp mồi, mẫu dò và DNA đích là một trong những yếu tố quan trọng trong hiệu quả khuếch đại. Dựa vào kết quả thống kê Bảng 3, mẫu HCV-L đều được nhân bản ở nhiệt độ 58°C, 60°C và 62°C. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 60°C, phản ứng cho kết quả giá trị Ct thấp và có độ ổn định cao sau 3 lần lặp lại. Vì vậy, nhiệt độ bắt cặp thích hợp cho bộ mồi/mẫu dò được lựa chọn là 60°C.

Bảng 3. Khảo sát nhiệt độ bắt cặp của bộ mồi và mẫu dò

Mẫu	58°C	60°C	62°C
HCV-H	23.34 ± 0.24	22.35 ± 0.18	23.49 ± 1.17
HCV-M	28.92 ± 0.15	27.74 ± 0.47	28.73 ± 0.30
HCV-L	33.56 ± 0.56	32.09 ± 0.46	35.86 ± 3.09
IC-1	28.52 ± 0.91	28.15 ± 0.34	29.75 ± 1.03
IC-2	26.87 ± 0.37	26.82 ± 0.33	26.21 ± 0.35
IC-1	23.87 ± 0.22	24.96 ± 0.37	24.29 ± 1.56

Ghi chú: HCV-H - mẫu HCV nồng độ cao; HCV-M - mẫu HCV nồng độ trung bình; HCV-L - mẫu HCV nồng độ thấp; IC-1, 2, 3 - các mẫu DNA tách chiết khác nhau.

3.1.2. Xác định nồng độ mồi tối ưu

Nồng độ của mồi xuôi và mồi ngược có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất của phản ứng PCR. Kết quả khảo sát nồng độ mồi HCV, ghi nhận ở tất cả nồng độ đều cho tín hiệu huỳnh quang vượt khỏi đường nền. Tại nồng độ khảo sát 500 nM đạt giá trị Ct trung

bình nhỏ nhất với các giá trị là 21.13 ± 0.70, 26.76 ± 0.33 và 30.33 ± 0.08 lần lượt ở các mẫu HCV-H, HCV-M và HCV-L. Cùng với đó, ở nồng độ này, giá trị Ct ổn định so với các nồng độ khác ở cả 3 lần lặp lại thí nghiệm. Do đó, nồng độ mồi 500 nM được lựa chọn để tối ưu hóa tiếp theo cho phản ứng real-time PCR.

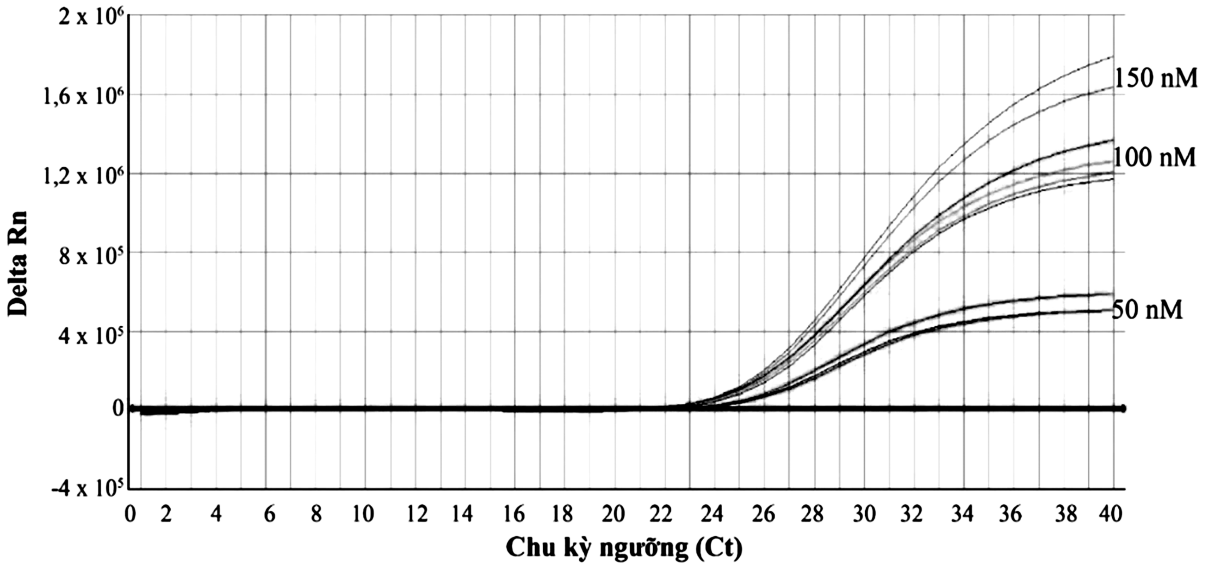
Bảng 4. Kết quả khảo sát nồng độ tối ưu ở các nồng độ khác nhau

Mẫu	400 nM	500 nM	600 nM
HCV-H	22.13 ± 0.37	21.13 ± 0.70	22.56 ± 0.36
HCV-M	27.49 ± 0.57	26.76 ± 0.33	27.77 ± 0.56
HCV-L	31.62 ± 1.16	30.33 ± 0.08	32.11 ± 0.81
IC-1	28.50 ± 0.35	28.33 ± 0.32	28.64 ± 0.23
IC-2	26.04 ± 0.11	26.08 ± 0.02	26.14 ± 0.15
IC-3	25.90 ± 0.33	25.82 ± 0.29	25.30 ± 0.27

Ghi chú: HCV-H - mẫu HCV nồng độ cao; HCV-M - mẫu HCV nồng độ trung bình; HCV-L - mẫu HCV nồng độ thấp; IC-1, 2, 3 - các mẫu DNA tách chiết khác nhau.

3.1.3. Xác định nồng độ mẫu dò tối ưu

Tương tự mồi, nồng độ mẫu dò cũng là một thông số cần khảo sát vì nồng độ mẫu dò quá thấp sẽ ảnh hưởng đến độ nhạy phản ứng. Ngược lại, nồng độ mẫu dò quá cao sẽ gây tốn kém vô ích. Kết quả khảo sát nồng độ mẫu dò, ghi nhận ở tất cả nồng độ đều cho tín hiệu huỳnh quang vượt khỏi đường nền. Tại nồng độ khảo sát 100 nM đạt giá trị Ct trung bình nhỏ nhất ở cả ba mẫu HCV, với giá trị Ct là 21.62 ± 0.42, 23.21 ± 0.31 và 30.20 ± 0.36. Do đó, nồng độ mẫu dò 100 nM được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Đường chạy real-time PCR ở các nồng độ mẫu dò 50, 100 và 150 nM với mẫu chuẩn là HCV-M

Ghi chú: Trên đồ thị, trục x biểu thị chu kỳ PCR, trục y biểu thị tín hiệu huỳnh quang được thu thập tại từng chu kỳ. Phản ứng real-time PCR được ghi nhận dương tính khi tín hiệu của phản ứng vượt tín hiệu nền.

3.1.4. Đánh giá hiệu quả của quy trình real-time PCR đã tối ưu

Sau khi tiến hành các phản ứng tối ưu các điều kiện của phản ứng, bao gồm: nhiệt độ bắt cặp của mồi, nồng độ mồi và nồng độ mẫu dò. Phản ứng real-time PCR được tiến hành để so sánh hiệu quả nhân bản của các điều kiện phản ứng đã tối ưu so với các điều kiện chưa tối ưu. Kết quả cho thấy, ở điều kiện đã tối ưu, giá trị Ct ở mẫu chạy điều kiện tối ưu cho kết quả thấp hơn ở điều kiện chưa tối ưu, ở các ba mẫu HCV-H, HCV-M và HCV-L. Như vậy, điều kiện phản ứng đã tối ưu được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Điều kiện phản ứng tối ưu bao gồm: nhiệt độ bắt cặp của mồi - 60°C, nồng độ mồi - 500 nM và nồng độ mẫu dò - 100 nM.

Bảng 5. Giá trị Ct ở các điều kiện phản ứng đã tối ưu so với điều kiện cơ bản

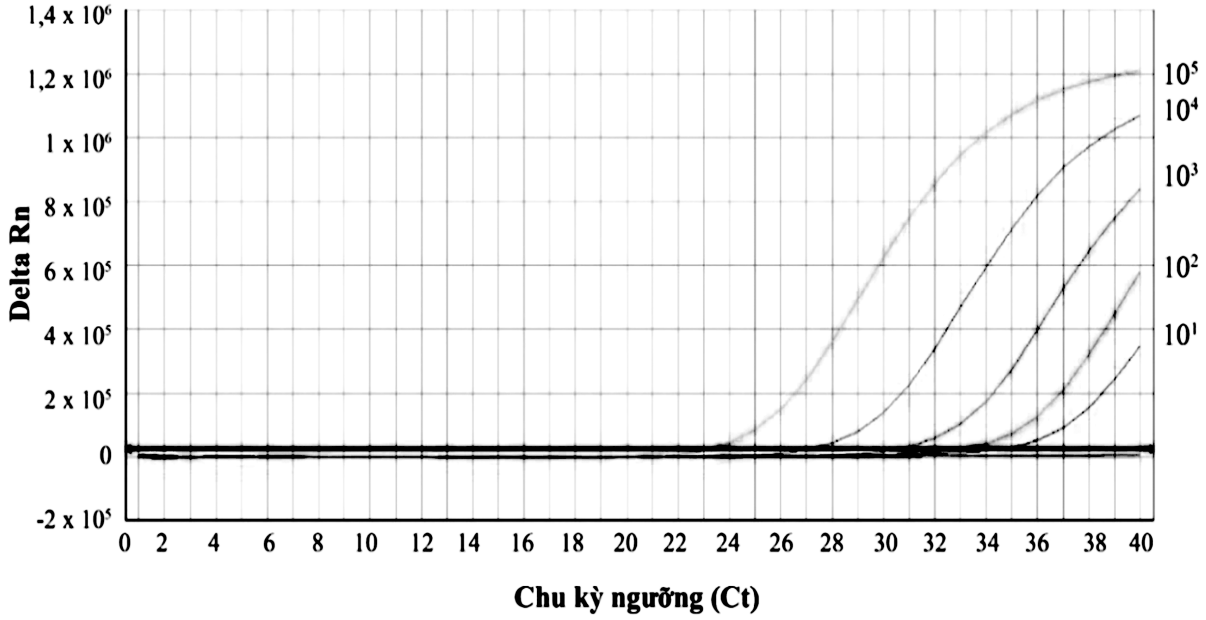
Tín hiệu	Mẫu	Cơ bản	Tối ưu
HEX	HCV-H	22.49 ± 0.17	21.42 ± 0.22
	HCV-M	25.73 ± 0.30	23.41 ± 0.11
	HCV-L	33.86 ± 0.19	30.20 ± 0.26
Cy5	IC-1	28.75 ± 0.33	27.79 ± 0.18
	IC-2	26.21 ± 0.35	25.32 ± 0.12
	IC-3	25.29 ± 0.26	24.10 ± 0.09

Ghi chú: HEX - reporter của mẫu dò định lượng HCV, Cy5 - reporter của mẫu dò định lượng chứng nội.

3.2. Xác định độ đặc hiệu và xây dựng đường chuẩn của quy trình real-time PCR định lượng HCV

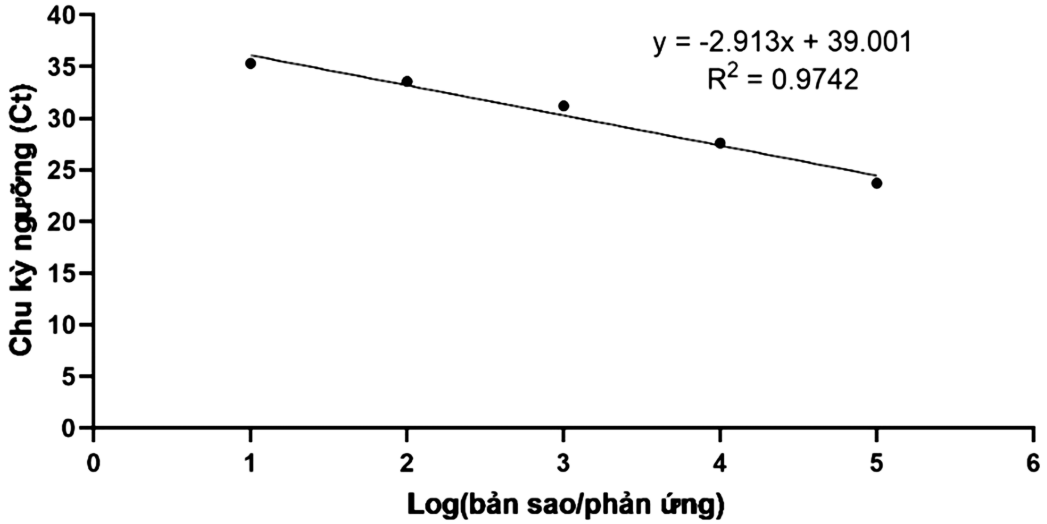
3.2.1. Đường chuẩn của quy trình

Đường chuẩn trong phương pháp real-time PCR được xây dựng với một dãy nồng độ chuẩn (pha loãng 10 lần) và các giá trị Ct tương ứng. Đường chuẩn thể hiện mối quan hệ giữa chu kì ngưỡng (giá trị Ct) với số lượng DNA mục tiêu ban đầu có trong mẫu chuẩn. Xây dựng đường chuẩn trong phương pháp real-time PCR giúp định lượng DNA mục tiêu trong mẫu không biết trước dựa trên tín hiệu huỳnh quang [11]. Phản ứng real-time PCR với nồng độ amplicon HCV giảm dần từ 10^5 - 10^0 bản sao/phản ứng được sử dụng để thiết lập đường chuẩn. Kết quả cho thấy, đường chuẩn được xây dựng đều có ngưỡng phát hiện từ 10^5 bản sao/phản ứng đến 10^1 bản sao/phản ứng. Giới hạn phát hiện của quy trình đạt ở nồng độ 10^1 bản sao/phản ứng với giá trị Ct trung bình là 35.29 ± 0.15. Đường chuẩn của quy trình có hệ số tương quan R^2 là 0.9742 phù hợp với yêu cầu của đường chuẩn trong phản ứng real-time PCR ($R^2 \geq 0.970$). Như vậy, phản ứng real-time PCR định lượng nồng độ HCV trên mẫu chuẩn amplicon đạt tiêu chuẩn và đường chuẩn định lượng có phương trình là y = -2.913x + 39.001.



Hình 2. Kết quả khảo sát động học của phản ứng real-time PCR

Ghi chú: Trên đồ thị, trục x biểu thị chu kỳ PCR, trục y biểu thị tín hiệu huỳnh quang được thu thập tại từng chu kỳ. Phản ứng real-time PCR được ghi nhận dương tính khi tín hiệu của phản ứng vượt tín hiệu nền.

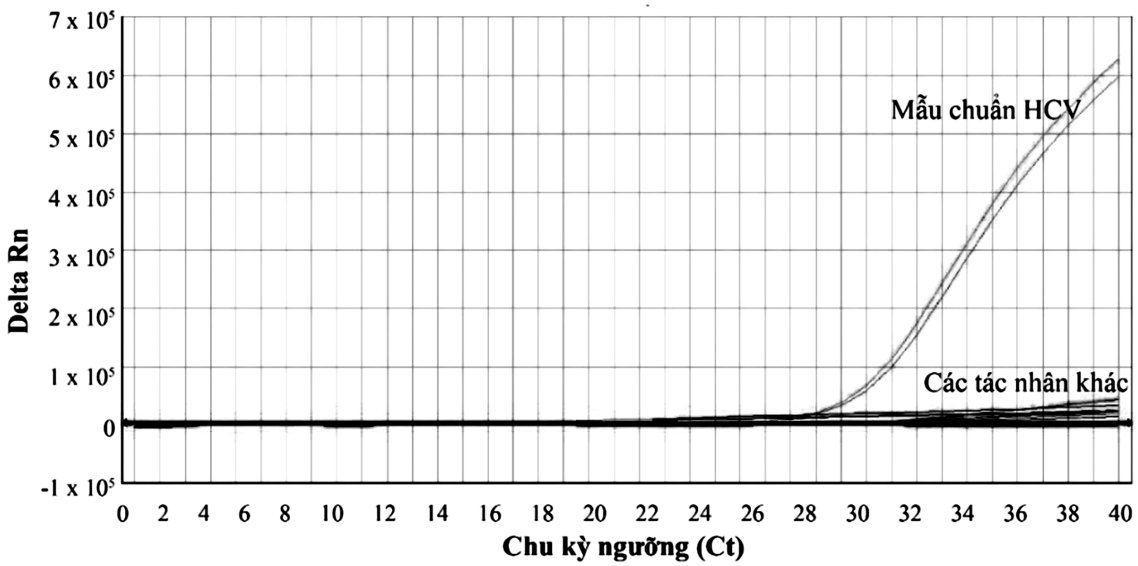


Hình 3. Đường chuẩn của quy trình real-time PCR định lượng HCV

Ghi chú: Trục x biểu thị các bản sao của amplicon HCV nồng độ từ 10^5 đến 10^1 bản sao/phản ứng và trục y biểu thị giá trị Ct.

3.2.2. Độ đặc hiệu của phản ứng real-time PCR định lượng HCV

Để có kết quả định lượng/phát hiện HCV chính xác thì bộ mồi/mẫu dò phải bắt đặc hiệu trên trình tự mục tiêu và không bắt trên trình tự DNA/RNA khác. Thí nghiệm sử dụng các mẫu cDNA của 3 chủng virus và 12 chủng vi khuẩn khác để kiểm tra độ đặc hiệu. Kết quả cho thấy, phản ứng real-time PCR sử dụng cặp mồi và mẫu dò HCV không cho tín hiệu dương tính với DNA của các tác nhân khác, ngoài chứng dương của phản ứng là mẫu chuẩn HCV (giá trị Ct là 28.04). Do đó, bộ mồi và mẫu dò sử dụng trong nghiên cứu này có tính đặc hiệu cao đối với HCV khảo sát trên 3 chủng virus và 12 chủng vi sinh vật khảo sát.



Hình 4. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu của phản ứng real-time PCR trên khuôn mẫu là chứng dương HCV và các tác nhân khác

Ghi chú: Trên đồ thị, trục x biểu thị chu kỳ PCR, trục y biểu thị tín hiệu huỳnh quang được thu thập tại từng chu kỳ. Phản ứng real-time PCR được ghi nhận dương tính khi tín hiệu của phản ứng vượt tín hiệu nền.

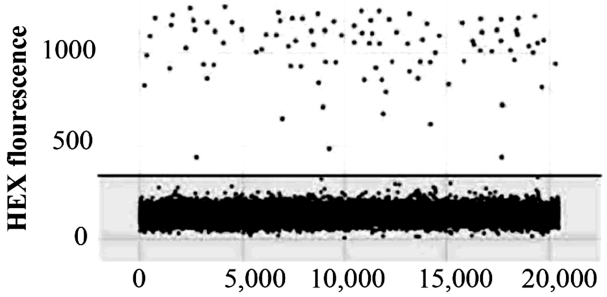
3.3. Chuyển đổi điều kiện phản ứng real-time PCR sang dPCR

Nhằm khảo sát tính phù hợp khi chuyển đổi giữa real-time PCR và dPCR, nghiên cứu lặp lại các điều kiện của quy trình real-time PCR định lượng HCV cho quy trình dPCR định lượng HCV. Qua đó, xem

xét tính phù hợp khi chuyển đổi nhanh giữa hai hệ thống. Điều này có ý nghĩa cho các quy trình xét nghiệm khi cần chuyển đổi hệ thống giữa real-time PCR và dPCR. Kết quả cho thấy, ở điều kiện đã tối ưu ở phản ứng real-time PCR, tín hiệu của các vi phản ứng được ghi nhận rõ ràng, phân tách giữa hai nhóm tín hiệu (âm tính và dương tính, phân tách bởi đường nền). Cùng với đó, các vi phản ứng mang tín hiệu trung gian khó phân biệt âm tính hay dương tính nằm sát cạnh đường nền (tín hiệu "rain") ít xuất hiện, trên biểu đồ chỉ xuất hiện một vài chấm.

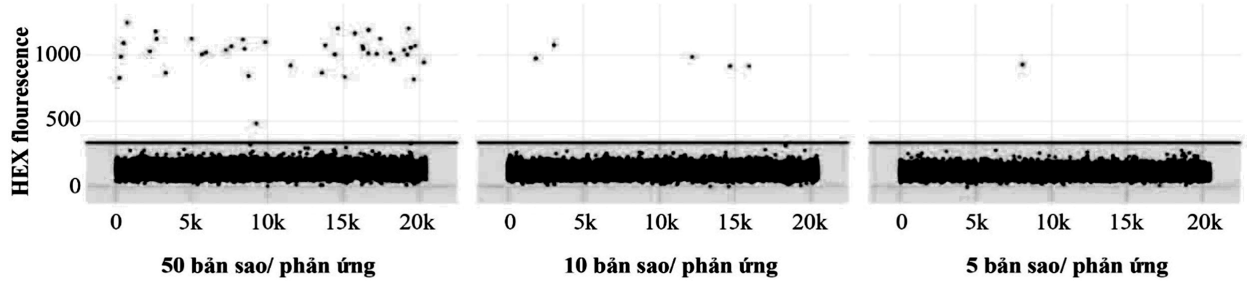
Điều này cho thấy các điều kiện của phản ứng gần như đạt điều kiện tối ưu. Như vậy, các điều kiện đã tối ưu ở kỹ thuật real-time PCR hoàn toàn có thể được áp dụng trên kỹ thuật dPCR với bộ mồi và mẫu dò định lượng HCV.

Cùng với đó, chúng tôi thực hiện khảo sát một số mẫu amplicon có nồng độ thấp (50, 10 và 5 bản sao/phản ứng), kết quả cho thấy, phương pháp dPCR đều có khả năng phát hiện các mẫu có nồng độ thấp này (Hình 6).



Hình 5. Kết quả chuyển đổi điều kiện quy trình real-time PCR sang quy trình dPCR định lượng HCV

Ghi chú: Trên hình, mỗi chấm biểu thị cho từng vi phản ứng, đường nền (baseline) chia đồ thị thành hai phần. Các vi phản ứng được ghi nhận dương tính khi nằm trên đường nền và âm tính khi nằm dưới đường nền.



Hình 6. Kết quả định lượng của quy trình dPCR định lượng HDV tại các nồng độ mẫu 5, 10 và 50 bản sao/phản ứng

Ghi chú: Trên hình, mỗi chấm biểu thị cho từng vi phản ứng, đường nền chia đồ thị thành hai phần. Các vi phản ứng được ghi nhận dương tính khi nằm trên đường nền và âm tính khi nằm dưới đường nền.

3.4. Thử nghiệm quy trình tối ưu trên các mẫu huyết thanh lâm sàng

3.4.1. Thông tin bộ mẫu lâm sàng

Trong thời gian từ tháng 04/2023 đến tháng 08/2023 tại Trung tâm Đào tạo và chuẩn đoán Y Sinh học Phân tử, bộ mẫu 44 mẫu máu ngoại vi được thu thập từ các bệnh nhân đến thăm khám và điều trị tại đây. Các thông tin lâm sàng khác được trình bày ở Bảng 6. Trung bình tuổi là 56.34 ± 13.95. Tuổi nhỏ nhất là 33 tuổi và tuổi cao nhất là 46 tuổi. Xét về giới tính, số lượng bệnh nhân là nam chiếm tỷ lệ 52.27% (n = 23) và nữ là 47.73% (n = 21). Bộ mẫu được kiểm tra phát hiện HCV bằng bộ kit HCV SaCycler-96 Real-Time PCR. Kết quả chuẩn đoán lâm sàng của bộ mẫu (âm tính hoặc dương tính với HCV) bằng phương pháp real-time PCR: dương tính 34.09% (n = 15) và âm tính 65.91% (n = 29).

Bảng 6. Một số thông tin lâm sàng của bộ mẫu nghiên cứu

Đặc điểm	Số lượng (n = 44)	Tỷ lệ (%)/Trung bình ± SD
Tuổi		56.34 ± 13.95
Giới tính		
Nam	23	52.27

Đặc điểm	Số lượng (n = 44)	Tỷ lệ (%)/Trung bình ± SD
Nữ	21	47.73
Chẩn đoán HCV (qPCR)		
Âm tính	29	65.91
Dương tính	15	34.09

3.4.2. Kết quả thử nghiệm trên bộ mẫu lâm sàng

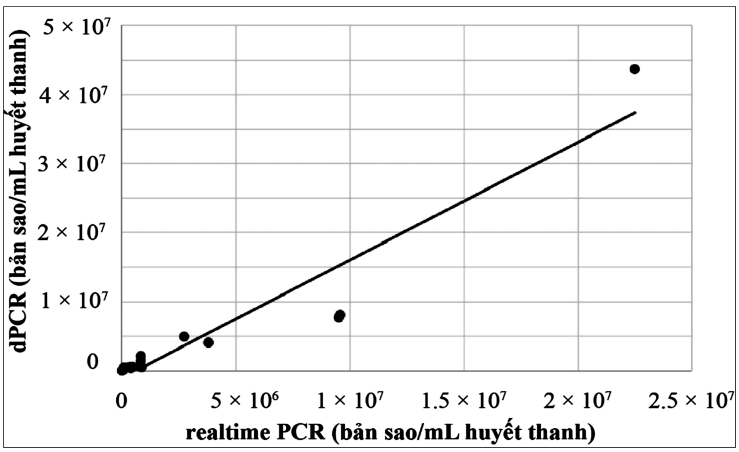
Áp dụng quy trình dPCR trên bộ mẫu 44 mẫu bệnh nhân (với 15 mẫu được xác định dương tính với HCV và 29 mẫu được xác định âm tính với HCV). Kết quả định lượng cho từng mẫu ở hai phương pháp real-time PCR và dPCR được trình bày ở Bảng 8. Kỹ thuật dPCR đã chứng minh mức độ đồng thuận cao với xét nghiệm real-time PCR (độ chính xác 95%, (42/44 mẫu) (Bảng 7). Tuy nhiên, ở một số mẫu có nồng độ virus thấp, kỹ thuật dPCR cho kết quả dương tính và real-time PCR cho kết quả âm tính. Cụ thể, ở mẫu C2 và C16, kỹ thuật dPCR có kết quả định lượng lần lượt là 2.07×10^2 và 0.99×10^2 bản sao/mL huyết thanh. Ngoài ra, khi tiến hành so sánh kết quả định lượng HCV giữa hai phương pháp, chúng tôi ghi nhận có sự tương quan cao giữa hai kết quả của hai phương pháp, được thể hiện ở giá trị $R^2 = 0.9053$.

Bảng 7. So sánh kết quả phát hiện HCV giữa hai phương pháp dPCR và real-time PCR

Phương pháp		real-time PCR	
		Dương tính	Âm tính
dPCR	Dương tính	15	2
	Âm tính	0	29

Bảng 8. Kết quả định lượng nồng độ HCV bằng hai phương pháp real-time PCR và dPCR

STT	Mẫu	real-time PCR (bản sao/mL)	dPCR (bản sao/mL)
1	C8	4.83×10^5	5.93×10^5
2	C10	3.81×10^6	4.09×10^6
3	C11	8.75×10^5	5.09×10^5
4	C12	9.57×10^6	8.08×10^6
5	C13	8.37×10^4	1.16×10^5
6	C15	2.75×10^6	4.90×10^6
7	C17	8.48×10^5	2.12×10^6
8	C19	9.51×10^6	7.78×10^6
9	C22	4.07×10^5	3.88×10^5
10	C23	1.90×10^4	4.01×10^4
11	C30	9.39×10^4	4.97×10^5
12	C34	8.52×10^5	1.53×10^6
13	C35	3.77×10^5	6.09×10^5
14	C36	2.25×10^7	4.36×10^7
15	C42	2.90×10^5	5.38×10^5
16	C2	0	2.07×10^2
17	C16	0	0.99×10^2



Hình 7. So sánh kết quả định lượng nồng độ HCV giữa hai phương pháp real-time PCR và dPCR

4. BÀN LUẬN

Nhiễm HCV mạn tính là một vấn đề sức khỏe toàn cầu, ước tính có khoảng 58 triệu người sống chung với bệnh viêm gan C mạn tính và có khoảng 300,000 ca tử vong do xơ gan hoặc ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến HCV vào năm 2021 [12]. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã đặt ra các mục tiêu nhằm loại trừ bệnh viêm gan C vào năm 2030, bao gồm giảm 90% số ca nhiễm HCV mới và giảm 65% số ca tử vong liên quan đến HCV [13]. Để đạt được mục tiêu này, xét nghiệm định lượng tải lượng HCV là một xét nghiệm quan trọng trong sàng lọc, chẩn đoán, cũng như theo dõi hiệu quả điều trị và xác định giai đoạn lâm sàng. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu này đã áp dụng một công nghệ PCR mới, dPCR, để phát triển và tối ưu hóa xét nghiệm định lượng HCV-RNA tại Việt Nam. Đây là giải pháp hỗ trợ và có thể thay thế kỹ thuật real-time PCR trong những trường hợp người bệnh có nồng độ HCV thấp. Hai xét nghiệm này (dPCR và real-time PCR) có chung cách tiếp cận tương tự nhau bằng cách tách chiết DNA/RNA, định lượng trình tự mục tiêu thông qua tín hiệu huỳnh quang dựa trên sự hiện diện của DNA/cDNA mục tiêu và giảm nguy cơ cho kết quả âm tính giả. Tuy nhiên, ngoài những ưu điểm, dPCR cũng bộc lộ một số hạn chế và thách thức. Khoảng định lượng của kỹ thuật dPCR tương đối hẹp (10^0 đến 10^6 IU/mL), nếu so sánh với real-time PCR (10^1 đến 10^8 IU/mL). Nồng độ DNA mục tiêu cao dẫn đến sự bão hòa của các vi phản ứng (tất cả vi phản ứng đều cho tín hiệu dương tính), khiến thống kê Poisson không hợp lệ đối với các mẫu có tải lượng virus cao, yêu cầu bổ sung bước pha loãng ban đầu. Điều này gây bất lợi đối với các mẫu có nồng độ HCV cao, cần phải thực hiện định lượng ít nhất 2 lần.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc xây dựng và chuyển đổi quy trình dPCR nhằm định lượng HCV-RNA. Để chứng minh khả năng ứng của phương pháp dPCR trong xét nghiệm lâm sàng, bộ mẫu 44 mẫu lâm sàng từ một nhóm bệnh nhân đến khám và điều trị tại Bệnh viện Đại học Y Dược Tp.HCM được sử dụng. Phân tích thống kê cho thấy mối tương quan chặt chẽ với dữ liệu thu được từ kỹ thuật real-time PCR. Ở một số mẫu, nghiên cứu quan sát thấy kết quả của kỹ thuật dPCR có độ biến thiên so với real-time PCR, nhưng luôn nằm trong khoảng chấp nhận của nghiên cứu. Tỷ lệ phổ biến của HCV được xác định trong bộ mẫu bằng 2 quy trình (real-time PCR và dPCR) lần lượt là 15/44 mẫu (34.1%) và 17/44 (38.6%) mẫu. Kết quả cho thấy sự phù hợp giữa hai phương pháp đạt tỷ lệ 95% (42/44 mẫu). Nghiên cứu phát hiện có 2 mẫu có kết quả phát hiện HCV mâu thuẫn giữa hai kỹ thuật chẩn đoán (HCV-2 và HCV-16). Một số lý do khiến phương pháp real-time PCR không thể phát hiện HCV: (1) tải lượng HCV thấp không đủ và có thể dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp real-time PCR, (2) chất ức chế phản ứng PCR có trong mẫu DNA.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phản ứng dPCR định lượng HCV với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Thử nghiệm lâm sàng cho thấy quy trình dPCR có thể phát hiện và định lượng mẫu huyết thanh có nồng độ HCV thấp, khi so sánh với real-time PCR. Kết quả bước đầu thể hiện khả năng áp dụng của quy trình dPCR vào lâm sàng.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ƠN tới Quý Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng đã tạo điều kiện cho nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu này. Nghiên cứu được Trường Đại học Quốc Tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC16.17. Trung tâm Đào tạo và Chẩn đoán Y Sinh học phân tử, Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM đặt tại Bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM-Cơ sở 2 là nơi đã tạo điều kiện thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M. B. Pisano, C. G. Giadans, D. M. Flichman, V. E. Ré, M. V Preciado, and P. Valva, "Viral hepatitis update: progress and perspectives," *World J. Gastroenterol.*, vol. 27, no. 26, p. 4018, 2021.

[2] J. F. Perz, G. L. Armstrong, L. A. Farrington, Y. J. F. Hutin, and B. P. Bell, "The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide," *J. Hepatol.*, vol. 45, no. 4, pp. 529-538, 2006.

[3] D. Castaneda, A. J. Gonzalez, M. Alomari, K. Tandon, and X. B. Zervos, "From hepatitis A to E: A critical review of viral hepatitis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 27, no. 16, p. 1691, 2021.

[4] R. P. Myers, H. Shah, K. W. Burak, C. Cooper, and J. J. Feld, "An update on the management of chronic hepatitis C: 2015 Consensus guidelines from the Canadian Association for the Study of the Liver," *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 29, pp. 19-34, 2015.

[5] V. H. Pham *et al.*, "Very high prevalence of hepatitis C virus genotype 6 variants in southern Vietnam: large-scale survey based on sequence determination," *Jpn. J. Infect. Dis.*, vol. 64, no. 6, pp. 537-539, 2011.

[6] L. M. Villar, H. M. Cruz, J. R. Barbosa, C. S. Bezerra, M. M. Portilho, and L. de Paula Scalioni, "Update on hepatitis B and C virus diagnosis," *World J. Virol.*, vol. 4, no. 4, p. 323, 2015.

[7] M. Frías *et al.*, "Evaluation of hepatitis C viral RNA persistence in HIV-infected patients with long- term sustained virological response by droplet digital PCR," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 12507, 2019.

[8] M. Mukaide *et al.*, "High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70," *J. Virol. Methods*, vol. 207, pp. 169-177, 2014.

[9] D. A. G. Zauli, C. L. P. de Menezes, C. L. de Oliveira, E. C. C. Mateo, and A. C. de S. Ferreira, "In- house quantitative real-time PCR for the diagnosis of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections," *brazilian J. Microbiol.*, vol. 47, pp. 987-992, 2016.

[10] Q. Yang *et al.*, "Evaluation of suitable control genes for quantitative polymerase chain reaction analysis of maternal plasma cell-free DNA," *Mol. Med. Rep.*, vol. 12, no. 5, pp. 7728-7734, 2015.

[11] M. R. Green and J. Sambrook, "Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2018, no. 10, p. pdb-top095000, 2018.

[12] WHO, "Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections," *World Heal. Organ.*, 2021.

[13] W. H. Organization, "Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Towards ending viral hepatitis," World Health Organization, 2016.

Development of a digital PCR assay for quantification of HCV-RNA

Huynh Thi Thu Thao, Ha Thi Anh, Nguyen Thi Nga, Vu Thi Hai Yen and Nguyen Tuan Anh

ABSTRACT

Background: Hepatitis C is a liver inflammation caused by the Hepatitis C virus (HCV). Failure to detect the disease in its early stage may lead to rapid progression and consequential liver damage. In Vietnam, the prevalence of HCV infection exhibits regional and risk group variations, ranging from 1% to 2.9% in the community. HCV-RNA testing plays a crucial role in managing the disease's progression, determining the optimal treatment timing, monitoring the response to treatment, and deciding the endpoint for treatment. The digital PCR (dPCR) technique is considered superior to other detection techniques (real-time PCR, ELISA, ect.). dPCR's advantages are specific, sensitive, and highly accurate detection/quantification. In this study, the dPCR assay was developed using amplicon samples (confirmed by Sanger sequencing), and the conditions of the dPCR reaction were determined by real-time PCR technique. The optimized dPCR assay was T_a *at* 60^0*C, 500 nM forward and reverse primers, 100 nM probe. The dPCR test demonstrated a preference for samples containing a restricted number of target sequences compared to real-time PCR. The findings of this study showed the potential application of the dPCR technique in HCV detection/quantification testing.*

Keywords: *Hepatitis C, HCV, digital PCR, real-time PCR, quantification*

Received: 24/11/2023
Revised: 15/01/2024
Accepted for publication: 22/01/2024