

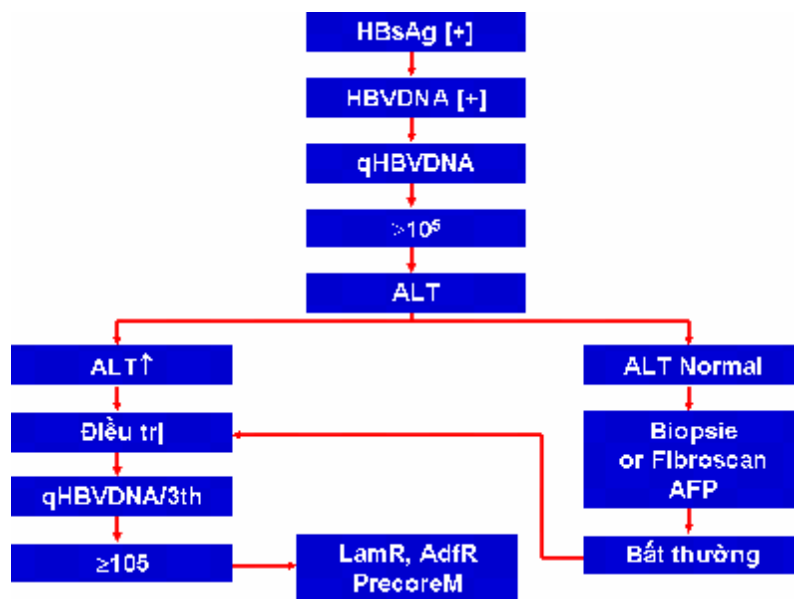
## Kinh nghiệm xây dựng và phát triển PCR/real-time PCR và một số kỹ thuật sinh học phân tử khác trong nghiên cứu và chẩn đoán

Từ các yêu cầu thực tế phải tiếp cận nền y học hiện đại trong chẩn đoán và điều trị

### 1. Cần một giải pháp toàn diện về chẩn đoán sinh học phân tử bệnh viêm gan virus B và viêm gan virus C mạn tính

Bệnh viêm gan virus B và viêm gan virus C mạn tính là hậu quả của tình trạng nhiễm virus viêm gan B (HBV=Hepatitis B virus) và virus viêm gan C (HCV=hepatitis C virus) gây ra. Bệnh nhân có thể bị nhiễm HBV và HCV qua đường máu như tiêm chích, truyền máu, nhổ răng, châm cứu, làm móng, hay các thủ thuật xâm lấn... bởi các dụng cụ bị nhiễm virus. Ngoài ra, nhiễm trùng HBV và HCV còn có thể xảy ra qua con đường tình dục, mẹ truyền qua con khi sinh nở...

Theo các thông tin từ Tổ Chức Y Tế Thế Giới và một số nhà nghiên cứu trong và ngoài nước, Việt Nam là một trong những quốc gia đứng hàng đầu về tần suất nhiễm HBV qua xét nghiệm phát hiện kháng nguyên bề mặt của virus (HBsAg) trong máu, với tỷ lệ người bình thường có HBsAg dương tính là 10-30%. Thường diễn tiến tự nhiên của một người bị nhiễm HBV là đa số tự khỏi do hệ thống miễn dịch tạo được kháng thể bảo vệ là kháng thể đặc hiệu HBsAg. Chỉ có một số ít, hệ thống miễn dịch cơ thể của họ không thể nhận diện được kháng nguyên bề mặt của virus là kháng nguyên lạ để có thể tạo được đáp ứng miễn dịch do vậy mà các người này bị mang HBV trong cơ thể lâu dài và lúc nào xét nghiệm phát hiện HBsAg cũng dương tính. Nếu không có các tác nhân nguy cơ gây tổn hại tế bào gan (như uống rượu, béo phì, gan nhiễm



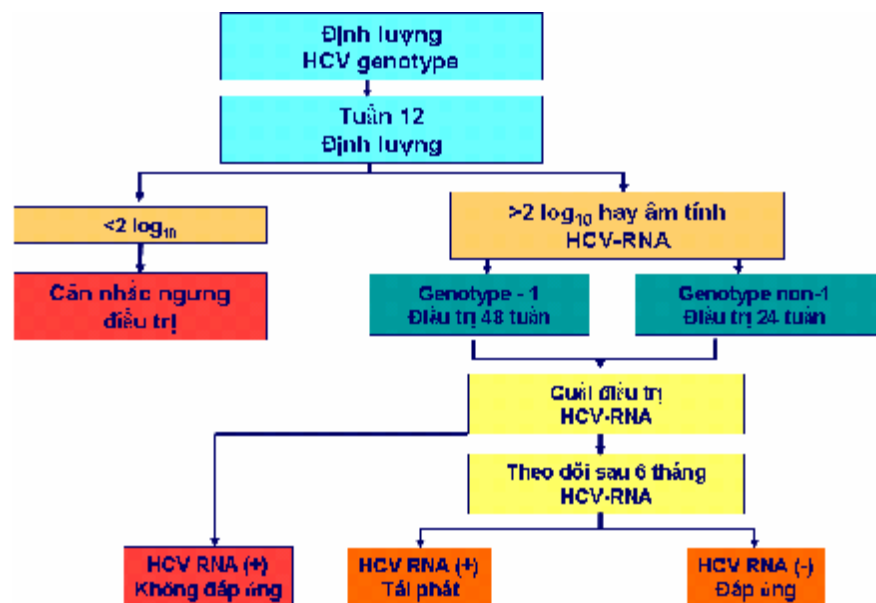
**Sơ đồ 4:** Hướng dẫn các chỉ định xét nghiệm để điều trị và theo dõi hiệu quả điều trị đặc hiệu bệnh nhân bị bệnh viêm gan virus B mạn tính

mở, hay bị các tác nhân lý hoá khác) thì HBV chỉ nhân bản thành các virus không hoàn chỉnh (chỉ có vỏ capsid mà không có lõi DNA) và tạo được một số lượng rất giới hạn các virus hoàn chỉnh, do vậy họ chỉ là các người lành mang HBV mà thôi (carrier) chứ không phát triển thành viêm gan mạn tính. Tuy nhiên nếu có các nguy cơ thương tổn tế bào gan xảy ra thì HBV sẽ phát triển nhiều hơn trong tế bào gan, do vậy lượng virus hoàn chỉnh sẽ được phóng thích nhiều hơn vào trong máu ( $\geq 10^5$  copies/1ml máu) đồng thời gây tổn hại tế bào gan để trở thành bệnh viêm gan mạn tính. Nếu không kiểm soát được sự nhân bản của HBV thì viêm gan mạn tính sẽ dẫn đến hậu quả khó tránh khỏi là xơ gan rồi có thể dẫn đến ung thư gan hay đi thẳng đến ung thư gan.

Do vậy, trước một người có xét nghiệm HBsAg dương tính thì các nhà lâm sàng nhất thiết phải cho chỉ định làm thử nghiệm xác định xem trong máu của người nhiễm có mang HBV hoàn chỉnh hay không bằng **xét nghiệm PCR phát hiện HBV-DNA**, và nếu dương tính thì phải biết số lượng HBV hoàn chỉnh có trên  $10^5$  copies/1ml hay không bằng xét nghiệm **qPCR để định lượng HBV-DNA**. Nếu lượng HBV trong máu dưới  $10^5$  thì không cần thiết phải điều trị vì HBV vẫn còn nhân bản rất giới hạn trong tế bào gan và chưa gây tổn hại tế bào gan. Nhưng nếu lượng virus  $\geq 10^5$  thì cần phải xem xét gan có bị tổn thương chưa thông qua xét nghiệm men gan ALT. Nếu lượng ALT vượt quá bình thường (1,5 hay tối đa là 2 lần bình thường, ở nam bình thường là 33UI còn ở nữ bình thường là 19IU) thì phải cho chỉ định điều trị bằng thuốc kháng virus như lamivudine, adefovir, entecavir, interferon.. hay sử dụng ngay từ ban đầu liệu pháp kết hợp lamivudine với adefovir, với entecavir, hay với interferon. Nếu lượng ALT vẫn còn bình thường thì phải làm sinh thiết gan để làm xét nghiệm giải phẫu bệnh xem gan có bị thương tổn mô học không, hay nếu không muốn làm sinh thiết gan thì có thể làm fibroscan gan của bệnh nhân và giá trị fibroscan cũng có thể cho biết tình trạng tổn hại mô gan dù không chính xác bằng sinh thiết gan. Ngoài ra, cũng cần thiết phải làm thêm thử nghiệm định lượng AFP (alpha foeto-protein) trên các bệnh nhân này vì chỉ cần có bằng chứng mô học có tổn thương gan hay lượng AFP vượt quá giới hạn bình thường thì vẫn phải cho chỉ định điều trị bệnh nhân bằng thuốc kháng virus như trên. Hiện nay các nhà điều trị không còn ảo vọng trị sạch được HBV ra khỏi cơ thể bệnh nhân vì nhiễm HBV rất dễ dàng bị tái phát sau khi ngưng điều trị. Lý do chính yếu là vì HBV luôn tồn tại trong nhân tế bào gan dưới dạng cccDNA (covalently closed circular

DNA) để làm nguồn gốc di truyền của virus, và dạng này không hề bị tác động bởi các thuốc kháng virus là các nucleosides analogs hiện nay. Tuy nhiên vì có nhiều bằng chứng cho thấy nếu không kiểm soát mà để lượng HBV hoàn chỉnh trong máu lên quá cao thì bệnh viêm gan mạn tính sẽ có nguy cơ diễn tiến đến suy gan mất bù, hay xơ gan tiến triển hoặc ung thư gan. Do vậy, sau khi đã bắt đầu điều trị bệnh nhân bị viêm gan virus B mạn tính, các nhà điều trị phải thường xuyên theo dõi hiệu quả điều trị đặc hiệu mà họ đã cho trên bệnh nhân bằng cách phải định kỳ mỗi 3 tháng cho bệnh nhân làm xét nghiệm qPCR định lượng HBV-DNA (nếu lượng HBV-DNA vẫn còn định lượng được) hay PCR định tính phát hiện HBV-DNA (nếu HBV-DNA dưới ngưỡng phát hiện định lượng) cho đến khi nào lượng HBV-DNA dưới ngưỡng phát hiện. Quan điểm của các nhà điều trị hiện nay là phải liên tục duy trì liệu pháp kháng virus để khống chế lượng virus dưới mức phát hiện do vậy mà phải luôn theo dõi sự tái xuất hiện virus bằng xét nghiệm PCR phát hiện HBV-DNA trong máu của bệnh nhân định kỳ mỗi 3 tháng. Nếu sau một thời gian điều trị đặc hiệu (thường là 3 tháng) mà lượng virus không giảm quá 2 log (100 lần), hay không đạt đến ngưỡng  $10^3$ /ml, hay trong quá trình điều trị, xét nghiệm HBV-DNA dương tính trở lại, bác sĩ điều trị phải nghĩ đến khả năng virus kháng thuốc, đặc biệt là kháng lamivudine. Lúc này xét nghiệm sinh học phân tử mà bác sĩ nên chỉ định thực hiện trên bệnh nhân là xét nghiệm định genotype và phát hiện các đột biến kháng lamivudine, adefovir và entecavir trên virus HBV của bệnh nhân để tùy thuộc

vào genotype đột biến mà có thể điều chỉnh liệu pháp kháng virus thích hợp. Trước đây, các nhà lâm sàng thường đánh giá hiệu quả điều trị đặc hiệu qua xét nghiệm miễn dịch cho biết có dấu hiệu chuyển đảo huyết thanh trên bệnh nhân,



**Sơ đồ 5:** Sơ đồ hướng dẫn chỉ định và theo dõi hiệu quả điều trị đặc hiệu bệnh nhân viêm gan virus C mạn tính

nghĩa là HBeAg (kháng nguyên tiết của HBV - một thông số cho biết có tình trạng virus nhân bản) trở nên âm tính và xuất hiện kháng thể kháng HBe. Tuy nhiên vì HBV có thể có đột biến precore làm cho virus không thể tạo ra được kháng nguyên HBe mà vẫn có được kháng thể kháng HBe nên muốn xác định được chắc chắn có chuyển đảo huyết thanh thật sự hay không thì các nhà lâm sàng phải chỉ định xét nghiệm phát hiện đột biến precore trên các bệnh nhân HBeAg [-], có kháng thể kháng HBeAg, mà HBV-DNA vẫn còn [+]. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây cũng cho biết rằng đột biến precore (vị trí 1896) và đặc biệt là core-promoter (vị trí 1762/64) có liên quan đến diễn tiến viêm gan mạn tính, xơ gan, và ung thư gan trên bệnh nhân. Do vậy xét nghiệm sinh học phân tử phát hiện đột biến precore hiện nay cũng là một yêu cầu thực tiễn từ các nhà điều trị. **Sơ đồ 4** là một tóm tắt qui trình cho các chỉ định xét nghiệm để điều trị và theo dõi điều trị viêm gan B mạn tính.

Ngoài viêm gan B, nhiễm viêm gan virus C cũng là một vấn đề rất cần được quan tâm hiện nay, đặc biệt tại Việt Nam. Theo ghi nhận về tình hình nhiễm viêm gan C thì tỷ lệ người bình thường ở Việt Nam nhiễm virus viêm gan C là khoảng 2-10%, xem như là thuộc nhóm các quốc gia có tỷ lệ nhiễm virus viêm gan C cao thứ nhì trên thế giới. Khác với nhiễm viêm gan B với đa số các trường hợp người nhiễm tạo được kháng thể bảo vệ loại trừ được virus hay là một số ít hơn trở thành người lành mang trùng; có đến 85% người nhiễm viêm gan virus C không có miễn dịch bảo vệ, dù có xuất hiện kháng thể đặc hiệu (anti-HCV [+]), bị diễn tiến đến viêm gan mạn tính rồi đến xơ gan với 20% trong số đó có nguy cơ diễn tiến đến ung thư gan. Do vậy mà dù tỷ lệ người nhiễm viêm gan C tại Việt Nam thấp hơn nhiễm viêm gan B nhưng tình trạng bệnh tật do nhiễm virus viêm gan C mang lại là khá cao, không thua mà thậm chí còn hơn viêm gan B. Nguy hiểm như vậy nhưng bệnh viêm gan C mạn tính lại là một bệnh mà dưới ánh sáng của y học hiện đại lại là một bệnh có thể chữa khỏi được hoàn toàn với xác suất thành công có thể đến 60%. Tuy nhiên, để có thể cho được chỉ định điều trị đặc hiệu viêm gan C mạn tính bằng interferon  $\alpha$  phối hợp với ribavirin là phát đồ chuẩn nhất hiện nay, bác sĩ cần phải xác định là bệnh nhân đang mang virus viêm gan C trong máu bằng xét nghiệm định tính HCV-RNA vì xét nghiệm anti-HCV chỉ là xét nghiệm sàng lọc trong cho và truyền máu chứ không phải là xét nghiệm trong chẩn đoán lâm sàng, hơn nữa một người có kết quả anti-HCV [+] vẫn có thể không mang

virus viêm gan C mà chỉ là kết quả của tình trạng nhiễm mầm bệnh trước đó và nay đã khỏi. Sau khi xác định được người bệnh dương tính HCV-RNA, trước khi cho chỉ định điều trị bác sĩ cần phải làm thêm hai xét nghiệm nữa là định lượng HCV-RNA và định genotype của virus. Lý do là vì bác sĩ cần phải đánh giá hiệu quả điều trị mà mình đã cho trên bệnh nhân sau 1 tháng rồi sau 3 tháng điều trị và phương pháp đánh giá là định lượng lại HCV-RNA. Nếu kết quả định lượng cho thấy virus biến mất sau 1 tháng điều trị thì đây là đáp ứng siêu vi nhanh với dự hậu thành công trong điều trị rất tốt. Nếu lượng virus giảm trên 100 lần (trên hay bằng 2 log) sau 3 tháng bắt đầu điều trị thì đây là đáp ứng siêu vi sớm và có thể đánh giá điều trị đã cho là hiệu quả và có thể tiếp tục. Nếu lượng virus không giảm quá 2 log thì có thể phương pháp điều trị đã cho trên bệnh nhân là không hiệu quả và cần phải cân nhắc để điều chỉnh (dùng loại interferon  $\alpha$  khác có dược động và dược lực tốt hơn, bắt buộc bệnh nhân phải tuân thủ hơn...). Để quyết định thời gian điều trị là bao lâu thì bác sĩ cần phải biết genotype của HCV trên bệnh nhân, nếu là genotype 1 thì cần phải duy trì thời gian điều trị là 48 tuần hay hơn, còn nếu thuộc genotype khác thì thời gian điều trị có thể ngắn hơn là 24 tuần. Sau khi hoàn tất thời gian cần phải điều trị trên bệnh nhân, trước khi quyết định ngưng điều trị, bác sĩ cần phải xác định xem bệnh nhân đã sạch HCV-RNA chưa bằng xét nghiệm định tính HCV-RNA và chỉ ngưng điều trị khi HCV-RNA hoàn toàn âm tính. Sau khi đã ngưng điều trị vì bệnh nhân đã sạch virus, bác sĩ vẫn phải khuyến cáo bệnh nhân làm xét nghiệm định tính HCV-RNA mỗi 3 tháng một lần để theo dõi xem bệnh nhân có bị tái phát không. Bất cứ lúc nào HCV-RNA dương tính lại thì đó là dấu hiệu tái phát và khi ấy có thể bác sĩ phải xem xét điều trị lại cho bệnh nhân và cũng phải theo thực hiện lại qui trình xét nghiệm như trên. **Sơ đồ 5** tóm tắt qui trình nêu trên.

## **2. Cần xét nghiệm kịp thời và nhạy cảm hơn để chẩn đoán phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh mà các phương tiện vi sinh hay miễn dịch không hữu hiệu**

Bên cạnh bệnh viêm gan mạn tính do virus B và virus C, y học Việt Nam cũng còn phải đối phó với các bệnh nhiễm trùng khác mà vấn đề phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh rất cần thiết phải có phương tiện xét nghiệm nhạy cảm hơn, kịp thời hơn, và an toàn hơn.

Theo đánh giá của tổ chức y tế thế giới, Việt Nam chúng ta là một trong 22 nước mang gánh nặng nhiễm lao cao nhất trên thế giới. Ngoài ra với tình trạng gia tăng tỷ lệ

nhiễm HIV/AIDS hiện nay tại Việt Nam (có thể quá 300.000 theo dự đoán của Bộ Y Tế) thì nguy cơ chúng ta phải đối phó với tình trạng nhiễm lao tăng cao trong cộng đồng. Do vậy mà vấn đề nâng cao năng lực của các phòng thí nghiệm lâm sàng trong xét nghiệm phát hiện lao là một vấn đề mà y học Việt Nam phải đặt ra vì với phương pháp nhuộm tìm trực khuẩn kháng acid (AFB), độ nhạy phát hiện chỉ đạt 64% trong lao phổi, 27% trong lao ngoài phổi, và chỉ 9% trong lao màng não; hơn nữa nhuộm kháng acid bị phụ thuộc khá nhiều vào kỹ năng của người đọc lame và kết quả cũng không thể xác định được bệnh nhân có thật sự nhiễm lao hay không vì có thể có nhiều trực khuẩn kháng acid khác không phải vi khuẩn lao hiện diện trong bệnh phẩm. Với phương pháp nuôi cấy thì độ nhạy có thể cao hơn là 77% trong lao phổi, 67% trong lao ngoài phổi và 39% trong lao màng não nhưng thời gian để có được kết quả không thể trước 2 tuần nếu chúng ta sử dụng phương pháp cấy nhanh với môi trường MGITT hay phải trên 1 tháng nếu chúng ta sử dụng phương pháp cấy với môi trường Lowenstein Jensen. Chính vì vậy nên tại các bệnh viện hay phòng khám, có rất nhiều trường hợp bệnh nhân có dấu hiệu lâm sàng và X-quang rất nghi ngờ lao phổi, và hầu hết các trường hợp lâm sàng chẩn đoán nghi ngờ lao ngoài phổi hay lao màng não mà kết quả xét nghiệm bác sĩ nhận được vẫn thường là soi không thấy, cấy không ra. Thực tế này đã đòi hỏi các nhà lâm sàng phải yêu cầu xét nghiệm PCR phát hiện lao trong các bệnh phẩm khác nhau vì theo nhiều nghiên cứu trên thế giới, PCR đã cải thiện đáng kể độ nhạy phát hiện lao không chỉ trong lao phổi mà cả trong lao ngoài phổi và lao màng não. Hơn nữa kết quả PCR cũng cho phép xác định ngay là nhiễm lao mà không cần phải làm thêm các xét nghiệm vi sinh xác định như là đối với phương pháp nhuộm kháng acid hay nuôi cấy, vì với PCR người làm xét nghiệm phát hiện đoạn DNA đích là chỉ đặc hiệu cho vi khuẩn lao chứ không phải cho các mycobacteria khác không phải lao.

Một bệnh nhiễm khác mà thực tế đòi hỏi phải triển khai xét nghiệm khuếch đại nucleic acid trên cơ sở của kỹ thuật PCR để phát hiện tác nhân gây bệnh, đó là bệnh sốt Dengue gây sốt xuất huyết. Dĩ nhiên việc chẩn đoán lâm sàng một bệnh nhân có phải đang bị sốt Dengue gây sốt xuất huyết hay không thật sự không khó mấy một khi bệnh nhân đã xuất hiện các bất thường về số lượng tiểu cầu (giảm tiểu cầu) và dung tích hồng cầu (tăng dung tích hồng cầu) hay đã có các triệu chứng đi vào shock. Tuy nhiên

để có thể phát hiện được bệnh nhân có phải sốt Dengue hay sốt xuất huyết Dengue trong những ngày đầu của bệnh thật sự là cả một vấn đề nan giải vì ở giai đoạn sớm này về mặt lâm sàng hay cận lâm sàng, bệnh nhân không có biểu hiện gì đặc hiệu hơn là một sốt siêu vi. Thử nghiệm miễn dịch học phát hiện kháng thể đặc hiệu Dengue, thậm chí là kháng thể IgM, cũng chỉ có thể bắt đầu dương tính vào ngày thứ 4 hay 5 của bệnh và lúc này thì kết quả xét nghiệm không còn hữu dụng lâm sàng nữa vì các biểu hiện lâm sàng của sốt Dengue hay sốt xuất huyết Dengue đã khá rõ. Vì không thể chẩn đoán xác định được sốt Dengue hay sốt xuất huyết Dengue trong những ngày đầu của bệnh nên có thể có hai tình huống: (1) Hoặc là bệnh nhân không được theo dõi để điều trị kịp thời và do vậy khi vào đến bệnh viện đã vào bệnh cảnh shock quá nặng và bác sĩ sẽ phải rất vất vả mới cứu được bệnh nhân hay sẽ trở tay không kịp; (2) Hoặc là trong mùa dịch sốt xuất huyết bệnh viện sẽ bị tràn ngập bệnh nhân vì lâm sàng nghi ngờ sốt xuất huyết mà chưa có bằng cứ chứng minh bệnh nhân đang bị sốt Dengue hay sốt xuất huyết Dengue. Do vậy thực tế hiện nay đòi hỏi các phòng thí nghiệm lâm sàng phải có một phương tiện đủ sức để có thể chẩn đoán phát hiện Dengue sớm trong những ngày đầu của bệnh, và phương tiện ấy không có gì khác hơn là thử nghiệm RT-PCR phát hiện RNA của virus Dengue trong máu bệnh nhân nhờ lượng virus xuất hiện rất cao trong máu trong những ngày đầu của bệnh, thậm chí ngay trong ngày đầu tiên của bệnh.

Trong sản phụ khoa hiện nay, các nhà lâm sàng cũng như nghiên cứu y học cũng rất cần thiết phải có kết quả phát hiện và xác định được genotype HPV từ các quét hay sinh thiết cổ tử cung để phát hiện sớm nguy cơ sinh ung thư cổ tử cung trên phụ nữ vì khoa học đã chứng minh được tác nhân gây ung thư cổ tử cung trên phụ nữ là một số genotype HPV nguy cơ cao (như 16, 18...). Xét nghiệm như vậy không thể thực hiện được bằng các phương pháp tế bào học hay mô học mà phải được thực hiện bằng kỹ thuật sinh học phân tử khuếch đại một đoạn DNA đặc hiệu trên vùng gene L1 của virus và sau đó xác định trình tự đặc hiệu genotype của virus, đó chính là kỹ thuật PCR theo sau là lai phân tử.

Hiện nay ngành y tế của chúng ta cũng còn phải đối phó thêm với các bệnh có nguy cơ gây dịch cao như cúm gà H5N1, và một trong các biện pháp để đối phó với dịch bệnh này trên người là phải làm sao phát hiện sớm tác nhân H5N1 trên các mẫu

bệnh lây từ người nghi ngờ nhiễm bệnh để bệnh nhân sớm được điều trị đặc hiệu cũng như sớm phát hiện được ổ dịch lây cho người để sớm cách ly và đối phó. Tuy nhiên trong phát hiện H5N1, chúng ta không thể xây dựng các phương pháp virus học như nuôi cấy tại các phòng thí nghiệm lâm sàng vì điều này không hữu dụng lâm sàng do kết quả nuôi cấy không thể có nhanh được, và đồng thời cũng không an toàn vì khó có phòng thí nghiệm lâm sàng nào đạt được cấp độ 3 về an toàn sinh học. Do vậy xét nghiệm thích hợp và hữu dụng nhất để có thể thực hiện được tại các phòng thí nghiệm lâm sàng không có gì khác hơn là xét nghiệm RT-PCR phát hiện H5N1 vì xét nghiệm chỉ đòi hỏi phải thực hiện trong phòng thí nghiệm có trang bị an toàn sinh học cấp 2 và kết quả xét nghiệm không chỉ nhạy cảm mà còn có thể đến tay lâm sàng chỉ trong vòng không quá 3 giờ sau khi lấy mẫu.

Để đối phó với đại dịch HIV/AIDS, ngoài việc phổ biến các kiến thức tránh lây nhiễm hay tránh các hành vi có nguy cơ cao bị lây nhiễm trong cộng đồng, vấn đề điều trị đặc hiệu và có hiệu quả cho bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS cũng là vấn đề mà các nhà quản lý y tế cần phải thực hiện vì có được điều trị đặc hiệu và hiệu quả thì bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS mới có thể trở lại với cộng đồng và sẽ giảm thiểu nguy cơ lây nhiễm nhờ lượng virus trong máu và dịch cơ thể của bệnh nhân sẽ bị khống chế dưới ngưỡng phát hiện. Để có thể điều trị được một cách hiệu quả cho bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS, các nhà y học cần phải có phương tiện xét nghiệm định lượng được virus trong máu bệnh nhân để có thể thay đổi ngay phát đồ điều trị mới khi một khi lượng virus tăng lên hay xuất hiện trở lại trong quá trình điều trị. Do vậy xét nghiệm định lượng virus HIV là một xét nghiệm rất cần thiết phải triển khai và kỹ thuật dễ tiếp cận nhất hiện nay để thực hiện xét nghiệm này là kỹ thuật real-time PCR. Ngoài việc theo dõi hiệu quả điều trị đặc hiệu, xét nghiệm phát hiện và định lượng HIV còn có giá trị trong chẩn đoán cho các trẻ sơ sinh để phát hiện cháu có bị nhiễm bệnh từ mẹ truyền qua không, một yêu cầu mà phương pháp miễn dịch phát hiện kháng thể đặc hiệu HIV không thể đáp ứng được vì có thể trẻ có kết quả HIV [+] qua miễn dịch nhưng kháng thể đặc hiệu HIV phát hiện trong máu trẻ có thể chỉ là kháng thể từ mẹ truyền qua nhau trong thời kỳ bào thai.

Với tiến bộ hiện nay về ghép tạng tại Việt Nam, xét nghiệm phát hiện CMV là một xét nghiệm rất cần thiết phải thực hiện trên người cho cơ quan để tránh nguy cơ người



nhận bị nhiễm rồi bùng phát bệnh đang phải nhận liệu pháp ức chế miễn dịch sau ghép. Nếu chỉ dựa vào xét nghiệm phát hiện kháng thể đặc hiệu CMV trong huyết thanh của người cho tạng thì kết quả chắc chắn sẽ không đủ đặc hiệu để nói lên được người cho hãy còn mang CMV và sẽ truyền tác nhân gây bệnh sang người nhận vì kháng thể có thể tồn tại rất lâu sau khi bệnh nhân khỏi bệnh. Do vậy cần phải có một xét nghiệm phát hiện trực tiếp tác nhân CMV trong bạch cầu của máu người cho, và xét nghiệm đáp ứng được yêu cầu này chính là xét nghiệm PCR/real-time phát hiện/định lượng CMV-DNA.

Ngoài ra, thực tế của nền y học hiện đại mà chúng ta đang tiếp cận hiện nay cũng đòi hỏi các nhà lâm sàng được phục vụ các yêu cầu xét nghiệm phát hiện và/hay định lượng nhiều tác nhân gây bệnh khác bằng phương pháp khuếch đại nucleic acid trên cơ sở của kỹ thuật PCR và real-time PCR. Ví dụ để phát hiện nguyên do hiếm muộn trên phụ nữ, nhà lâm sàng cần phải có xét nghiệm PCR phát hiện *C. trachomatis* và *N. gonorrhoeae* trong các mẫu quét cổ tử cung và nước tiểu. Để phát hiện tác nhân viêm não màng não do virus, xét nghiệm PCR phát hiện HSV hay RT-PCR phát hiện *Enterovirus 71* trong dịch não tủy rất cần được triển khai. Để phát hiện *H. pylori* trong các mẫu sinh tiết vết loét dạ dày tá tràng thì xét nghiệm PCR phát hiện tác nhân này cũng là xét nghiệm không thể thiếu được. Hay ngay cả trong giám sát nhiễm khuẩn bệnh viện, xét nghiệm PCR phát hiện *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) từ tay và quét mũi trước của nhân viên y tế và người chăm sóc bệnh nhân cũng là xét nghiệm rất cần thiết phải được thực hiện do độ nhạy cảm cao và qui trình thực hiện khá đơn giản cũng như kết quả có được nhanh hơn nhiều so với xét nghiệm vi sinh truyền thống.

## **Đến thực tế triển khai kỹ thuật PCR, real-time PCR**

### **1. Các rào cản**

Vậy là thực tế đã đòi hỏi các nhà khoa học, đặc biệt là các nhà y học phải nhanh chóng phát triển và ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại, nhất là PCR và real-time PCR vào chẩn đoán và hỗ trợ cho theo dõi điều trị bệnh nhân tại Việt Nam. Tuy nhiên cho đến hiện nay nhiều nhà khoa học cũng như quản lý y tế trong nước hãy còn khá ngần ngại với khả năng này. Các lý do họ cho là: (1) các thử nghiệm này rất khó thực hiện được một cách chuẩn mực tại các phòng thí nghiệm lâm sàng; (2) giá

thành thử nghiệm có thể khá cao vượt ngoài khả năng của người bệnh. Chúng ta hãy thử phân tích có đúng như vậy không?

**2. Thử nghiệm PCR và real-time PCR có thật sự khó thực hiện được một cách chuẩn mực tại các phòng thí nghiệm lâm sàng?**

PCR và real-time PCR là kỹ thuật nhân bản DNA trong ống nghiệm dựa vào các chu kỳ nhiệt độ nhờ nguyên liệu là các dNTP, enzyme polymerase chịu nhiệt, và một cặp mồi là các đoạn oligonucleotide đơn dài khoảng 20-25 base có trình tự bổ sung đặc hiệu với hai đầu của đoạn DNA đích cần nhân bản. Nhờ các chu kỳ nhiệt này mà đoạn DNA đích được nhân bản theo cấp số nhân để sau 30 đến 40 chu kỳ, đoạn DNA đích được nhân bản thành hàng tỷ bản sao dễ dàng được phát hiện. Với phương pháp PCR (ngày nay được gọi là PCR kinh điển), kết quả PCR được phát hiện dựa vào điện di để xác định kích thước và/hay dựa vào lai với dò đặc hiệu để xác định trình tự đặc hiệu của sản phẩm khuếch đại xem có trùng khớp với kích thước và/hay trình tự đoạn DNA đích không. Với phương pháp real-time PCR thì kết quả PCR được đọc ngay trong quá trình chạy PCR mà không cần phải thực hiện giai đoạn phân tích sau PCR nhờ khả năng phát huỳnh quang của ống phản ứng trong quá trình chạy PCR một khi có sản phẩm khuếch đại xuất hiện trong PCR mix. Huỳnh quang sẽ càng sớm xuất hiện khi số lượng đoạn DNA đích ban đầu trong mẫu thử cho vào PCR mix càng nhiều, chính nhờ nguyên lý này mà real-time PCR không chỉ được dùng để phát hiện mà còn để định lượng được DNA đích ban đầu có trong mẫu thử.

Nhờ khuếch đại rồi mới phát hiện nên PCR và real-time PCR đạt được độ nhạy có thể nói cho đến nay chưa có một kỹ thuật nào có thể so sánh nổi: Giới hạn thấp nhất có thể phát hiện được là một phân tử. Chính vì vậy, PCR và real-time PCR là một công cụ rất hữu dụng trong phát hiện các tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên một câu hỏi được nhiều người đặt ra là liệu PCR và real-time PCR có đặc hiệu không một khi đạt được độ nhạy quá cao như vậy? Vì theo lý luận thống kê thông thường thì xét nghiệm một khi đạt độ nhạy cao thì độ đặc hiệu sẽ thấp xuống. Để trả lời được câu hỏi này, chúng ta phải so sánh độ đặc hiệu của PCR so với nuôi cấy trong phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Nuôi cấy là xét nghiệm đặc hiệu nhất để phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh vì chỉ có nuôi cấy chúng ta mới xác định được sự hiện diện tác nhân vi sinh vật gây bệnh có mặt trong mẫu thử. Qua cái nhìn phân tử thì chúng ta sẽ thấy nuôi

cây chẳng qua là phân lập rồi khuếch đại bộ gen của vi sinh vật gây bệnh từ một thành hàng tỷ bản sao rồi sau đó xác định bộ gen được khuếch đại là của vi sinh vật nào dựa vào các kiểu hình sinh vật hoá học mà bộ gen đó qui định. Xét nghiệm PCR và real-time PCR phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh cũng không khác gì nuôi cấy, nhưng không phải là nuôi cấy bộ gen mà chỉ là một đoạn gen đặc hiệu của vi sinh vật gây bệnh (không phải trong các môi trường phân lập và nuôi cấy vi sinh phức tạp và khác nhau mà chỉ đơn giản trong một ống phản ứng chứa PCR mix) thành hàng tỷ bản sao rồi sau đó định danh các bản sao này xem có đúng của vi sinh vật muốn tìm không dựa vào kích thước và/hay trình tự các nucleotide trên các bản sao này. Do đó, nếu chúng ta đã thừa nhận nuôi cấy là đặc hiệu nhất thì chúng ta cũng phải thừa nhận PCR đặc hiệu chẳng khác gì nuôi cấy mà lại nhạy cảm hơn nuôi cấy rất nhiều vì nuôi cấy bị phụ thuộc rất nhiều trong các khâu lấy mẫu, chuyên chở mẫu, thời gian trì hoãn từ khi lấy mẫu đến khi bắt đầu tiến hành nuôi cấy, và đặc biệt nhất là phải chọn lựa cho đúng môi trường thích hợp cho khâu phân lập; mà các yếu tố này lại thường hiếm khi được thực hiện một cách chuẩn mực tại các phòng thí nghiệm lâm sàng tại các quốc gia có thu nhập thấp như chúng ta.

Vậy thì tại sao chúng ta lại ngần ngại khi phát triển và ứng dụng xét nghiệm PCR và real-time tại các phòng thí nghiệm lâm sàng để phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh vì cho rằng khó có thể thực hiện được các xét nghiệm này một cách chuẩn mực? Trong khi xét nghiệm PCR và real-time PCR lại dễ thực hiện chuẩn mực hơn xét nghiệm vi sinh rất nhiều vì: (1) Khi không làm xét nghiệm ngay thì không cần phải được giữ trong môi trường chuyên chở trong thời gian có hạn như vi sinh, bệnh phẩm xét nghiệm PCR có thể giữ ở điều kiện lạnh 2-8°C hay giữ đông trong thời gian chuyên chở đến phòng thí nghiệm, và nếu giữ dưới -70°C thì mẫu thử vẫn còn nguyên giá trị để làm xét nghiệm PCR sau nhiều năm. (2) Nếu các thuốc thử đều được cung cấp hay được pha chế dưới dạng kit thì các bước làm xét nghiệm PCR rất đơn giản và dễ chuẩn hoá: Trước hết tách chiết nucleic acid từ mẫu thử bằng các kit tách chiết thích hợp; sau đó cho tách chiết này vào các ống phản ứng chứa PCR mix thích hợp để thực hiện các chu kỳ nhiệt cho khuếch đại nucleic acid đích; và cuối cùng là phát hiện sản phẩm khuếch đại của nucleic acid đích (nếu là real-time PCR thì bước này được thực hiện trong quá trình chạy PCR). Trong khi đó, quá trình làm xét nghiệm vi sinh phức tạp và

khó chuẩn hóa hơn nhiều vì đòi hỏi người làm xét nghiệm phải có đủ kiến thức để chuẩn bị, lựa chọn qui trình với thuốc thử và môi trường nuôi cấy thích hợp cho từng vi sinh vật đích, đặc biệt là phải có kiến thức và kinh nghiệm để có thể bắt được vi sinh vật đích hiện diện trong bệnh phẩm.

PCR và real-time PCR còn có nhiều ưu điểm vượt trội khác so với xét nghiệm vi sinh như: (1) Kết quả chung cuộc sẽ đến tay bác sĩ lâm sàng nhanh hơn xét nghiệm vi sinh, không quá 5 giờ kể từ khi bắt đầu làm xét nghiệm. (2) Phát hiện được các tác nhân vi sinh vật gây bệnh mà phòng thí nghiệm lâm sàng không có khả năng phát hiện với các xét nghiệm vi sinh hay miễn dịch truyền thống như các tác nhân virus (HCV, HBV, HPV...), tác nhân vi sinh không thể triển khai nuôi cấy được tại phòng thí nghiệm lâm sàng vì khả năng gây dịch cao (H5N1) hay khó nuôi cấy (*C. trachomatis*, *L. pneumophila*), hay có mặt rất ít trong bệnh phẩm (*M. tuberculosis* trong lao ngoài phổi, tác nhân viêm màng não mủ cột đầu...), hay là các tác nhân có thể nuôi cấy được nhưng thời gian có kết quả chung cuộc quá lâu (*M. tuberculosis*).

Ngoài ra, một mối lo ngại nữa mà nhiều người quan tâm, đó là vấn đề ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại, rất dễ xảy ra trong phòng xét nghiệm lâm sàng vì nguy cơ tích tụ và dễ dàng dẫn đến ngoại nhiễm vào các thuốc thử và bệnh phẩm qua dụng cụ và qua tay người làm xét nghiệm. Ngày nay, nhờ sử dụng hệ thống chống ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại bằng men UNG và dUTP cho vào các PCR mix (để làm cho sản phẩm khuếch đại có nhiều vị trí T bị thay thế bằng U nhờ vậy mà bị khác biệt với các DNA nguyên thủy để rồi sẽ bị men UNG phá huỷ trước khi đi vào quá trình khuếch đại) mà thử nghiệm PCR và real-time PCR rất dễ dàng triển khai thực hiện được tại các phòng thí nghiệm lâm sàng chỉ cần bố trí các vùng làm việc tách biệt, không cần phải trong các phòng tách biệt như trước đây.

### **3. Thử nghiệm PCR và real-time PCR có thật sự đắt tiền không?**

Trang bị đắt tiền nhất cho một phòng thí nghiệm lâm sàng làm được xét nghiệm PCR và real-time PCR là máy PCR và máy real-time PCR. Tuy nhiên nhờ công nghệ ngày càng tiến bộ và ngày càng có nhiều công ty cung cấp máy nên các thiết bị này ngày càng có nhiều tính năng hơn cũng như hoạt động hữu hiệu hơn mà giá thành lại càng ngày càng rẻ hơn, không hề vượt quá khả năng trang bị của nhiều phòng thí

nghiệm lâm sàng. Nếu tính khấu hao các thiết bị này trong giá thành xét nghiệm thì mỗi tháng chỉ khoảng 800USD với thời gian sử dụng thiết bị là 5 năm.

Vậy thì tại sao xét nghiệm PCR và real-time PCR hiện nay tại các quốc gia tiên tiến lại quá đắt, bệnh nhân phải trả tiền cho mỗi xét nghiệm không dưới 100USD? Lý do chủ yếu là vì các phòng thí nghiệm lâm sàng tại các nơi này thường phải mua các kit xét nghiệm PCR và real-time PCR từ các công ty sản xuất kit chẩn đoán (như Roche Diagnostic) với giá thành rất đắt để đảm bảo xét nghiệm được thực hiện một cách chuẩn mực. Tại các quốc gia thu nhập thấp như Việt Nam chúng ta, nếu làm như vậy thì chắc chắn xét nghiệm PCR và real-time PCR sẽ chẳng thể nào áp dụng được dù thực tế rất cần phải có các xét nghiệm này.

Chúng ta cũng biết PCR và real-time PCR là một kỹ thuật hoàn toàn mở cho phép nhà nghiên cứu có thể tiếp cận để tự pha các thuốc thử thực hiện xét nghiệm và chịu trách nhiệm về kết quả xét nghiệm mà mình thực hiện (thường gọi là homebrew). Tuy nhiên nếu làm như vậy thì chắc chắn chúng ta sẽ đối phó với vấn đề chất lượng của xét nghiệm PCR và real-time PCR sẽ rất khác biệt giữa các phòng thí nghiệm lâm sàng với nhau. Do vậy giải pháp hay nhất đó là phải có kit PCR và realtime PCR sản xuất trong nước cung cấp đến các phòng thí nghiệm lâm sàng. Các kit không chỉ đạt được độ nhạy và độ đặc hiệu cao, mà còn phải có đầy đủ các chuẩn mực để người làm xét nghiệm có thể kiểm soát được các sơ sót xảy ra trong quá trình làm xét nghiệm. Nhờ vậy, chất lượng xét nghiệm PCR và real-time PCR được chuẩn mực, đạt mức cao một cách đồng đều trong các phòng thí nghiệm lâm sàng, và đồng thời giá thành xét nghiệm là hoàn toàn có thể chấp nhận.

#### **4. Thực tế triển khai PCR và real-time PCR**

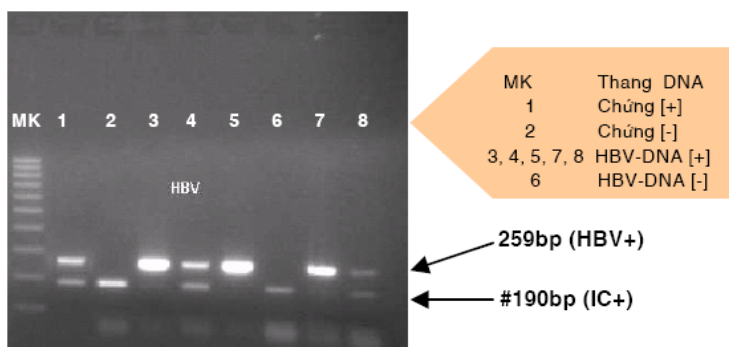
Xuất phát từ các nhận định trên, trong thời gian qua chúng tôi đã liên tục phát triển và hoàn thiện các kit PCR và real-time PCR để đưa vào ứng dụng tại nhiều phòng thí nghiệm lâm sàng có trang bị PCR tại Việt Nam. Như đã nói ở trên, để đảm bảo được chất lượng cao một các đồng đều của xét nghiệm PCR và real-time PCR thực hiện được tại phòng thí nghiệm lâm sàng áp dụng cho chẩn đoán, thử nghiệm cũng như các kit do chúng tôi cung cấp để làm thử nghiệm phải luôn luôn có đầy đủ các chuẩn mực sau: (1) Kit khuếch đại đạt được độ nhạy cao và có bằng chứng để xác định độ nhạy thông qua chứng [+] được cung cấp với số copies xác định để người sử dụng có thể

kiểm tra được. (2) Có chứng nội tại sử dụng chung môi với nucleic acid đích được cung cấp với hàm lượng copies tối thiểu để người thực hiện thí nghiệm có thể cho vào mẫu chứng âm [-] là mẫu thật và thật sự âm tính rồi thực hiện xét nghiệm cùng với các mẫu thử nhờ vậy mà kiểm tra được quá trình xét nghiệm có bị ngoại nhiễm không trong suốt quá trình thao tác xét nghiệm cũng như chứng minh được độ nhạy của kit tách chiết cũng như kit khuếch đại. (3) Người thực hiện thí nghiệm còn có thể cho chứng nội tại vào PCR mix cùng với tách chiết của mẫu thử để có thể xác định được mẫu âm tính là âm tính thật sự mà không phải âm tính vì PCR bị ức chế. (4) Có hệ thống chống ngoại nhiễm bằng dUTP và UNG được pha chung vào PCR mix để sản phẩm khuếch đại bị phá huỷ không cho tham gia vào quá trình khuếch đại. (5) Trong PCR định lượng, ngoài các chuẩn trên, để đảm bảo xét nghiệm định lượng, các mẫu chuẩn biết rõ hàm lượng copies DNA đích cũng được cung cấp ở dạng bền vững với yêu cầu người làm xét nghiệm phải tự cho vào các PCR mix nhằm đánh giá được thao tác pipetting khi làm định lượng cũng như xây dựng được đường chuẩn trong mỗi lần làm xét nghiệm để tạo cơ sở định lượng chính xác.

Cho đến hiện nay, chúng tôi đã triển khai thực hiện các xét nghiệm PCR và real-time PCR cũng như sản xuất được các kit tương ứng đạt được tất cả các chuẩn mực trên, đó là:

(1) Xét nghiệm và kit PCR phát hiện HBV-DNA (hình 69) dựa trên khuếch đại đích 259bp trên gen S, đạt độ nhạy 10 copies/ml huyết thanh. Có chứng âm là huyết

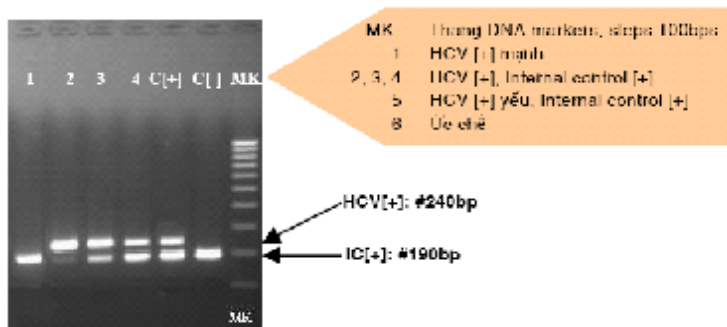
tương người bình thường, và chứng dương 100 copies/ml là plasmid chèn đúng đoạn DNA đích để chứng minh được độ nhạy của phản ứng đúng như khai báo. Có chứng nội tại là plasmid chèn DNA tái tổ hợp sử dụng cùng môi nhưng cho



**Hình 69:** Kết quả xét nghiệm PCR phát hiện HBV-DNA được thực hiện với <sup>NK</sup>HBV-PCR kit

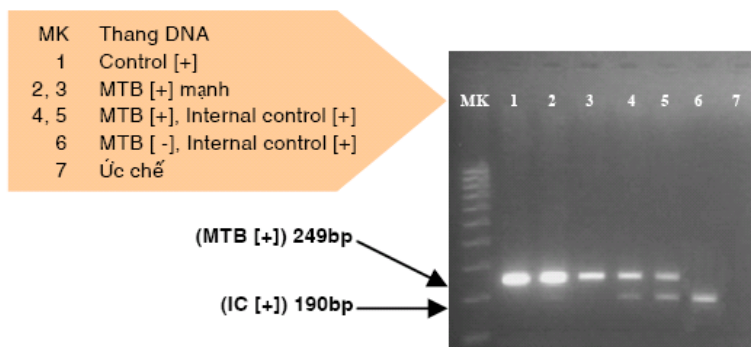
sản phẩm khuếch đại khác biệt DNA đích với kích thước 195bp, được cung cấp ở lượng tối thiểu để kiểm soát độ nhạy của tách chiết, khuếch đại cũng như kiểm tra ngoại nhiễm, và xác định mẫu có bị âm tính vì ức chế không.

(2) Xét nghiệm và kit RT-PCR phát hiện HCV-RNA (hình 70) dựa trên khuếch đại một đoạn 240bp trên vùng 5'NC, đạt độ nhạy 50 copies/ml huyết thanh mà người sử dụng có thể kiểm chứng nhờ chứng [+] chứa 200copies/ml là plasmid chèn DNA đích. Có chứng nội tại là RNA phiên mã từ plasmid chèn DNA tái tổ hợp kích thước 195bp khác biệt với DNA đích nhưng sử dụng cùng môi. Chứng nội tại được cung cấp ở nồng độ tối thiểu để người làm thí nghiệm cho vào cùng với mẫu thử để được tách chiết RNA cùng với mẫu thử nhờ vậy kiểm tra được hiệu quả tách chiết RNA trên từng mẫu thử và phát hiện được ức chế trên các mẫu thử kết quả âm tính. Chứng âm là mẫu huyết thanh thật sự âm tính cũng được cung cấp kiểm tra nguy cơ ngoại nhiễm khi thao tác xét nghiệm.



**Hình 70:** Kết quả xét nghiệm RT-PCR phát hiện HCV-RNA được thực hiện với <sup>NK</sup>HCV-RTPCR kit

(3) Xét nghiệm và kit PCR phát hiện MTB-DNA (hình 71) dùng trong chẩn đoán lao dựa trên khuếch đại đoạn DNA đích 249bp trên đoạn chèn IS6110 hiện diện từ 16 đến 30 copies trên genome của vi khuẩn *M. tuberculosis*, nhờ vậy độ nhạy của xét nghiệm có thể đạt đến mức phát hiện 1fg (1/10 genome vi khuẩn) trong thể tích mẫu thử cho vào ống phản ứng. Cũng như các xét nghiệm PCR khác, có chứng âm là huyết tương người bình thường, và có chứng dương chứa 100 copies/ml plasmid chèn đúng đoạn DNA đích nhờ vậy người làm xét nghiệm có thể kiểm chứng được độ nhạy của PCR mix. Có chứng nội tại là plasmid chèn DNA tái tổ hợp sử dụng cùng môi nhưng cho sản phẩm khuếch đại khác biệt DNA đích với kích thước 195bp được cung cấp ở lượng tối thiểu để kiểm tra được hiệu quả tách chiết DNA của kit tách chiết DNA,

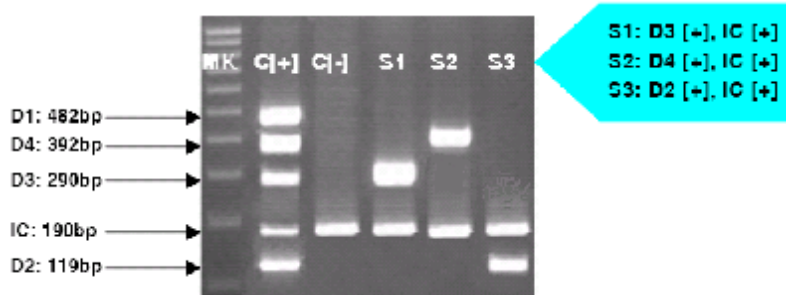


**Hình 71:** Kết quả xét nghiệm PCR phát hiện MTB-DNA được thực hiện với <sup>NK</sup>MTB-PCR kit

chứng minh mẫu âm tính là không bị ức chế, cũng như chứng minh độ nhạy của PCR mix.

(4) Xét nghiệm và kit RT-PCR phát hiện và định type virus Dengue (hình 72) hay sốt Dengue và sốt xuất huyết Dengue. Xét nghiệm và kit này cũng chứa đầy đủ các chứng dương, chứng nội tại đạt các chuẩn mực của xét nghiệm PCR dùng trong chẩn đoán như các xét nghiệm và kit mà chúng tôi phát triển.

Đây là xét nghiệm và kit RT-PCR duy nhất hiện nay có khả năng vừa phát hiện vừa định được type virus Dengue chỉ qua một vòng PCR đa môi mà kết quả đạt

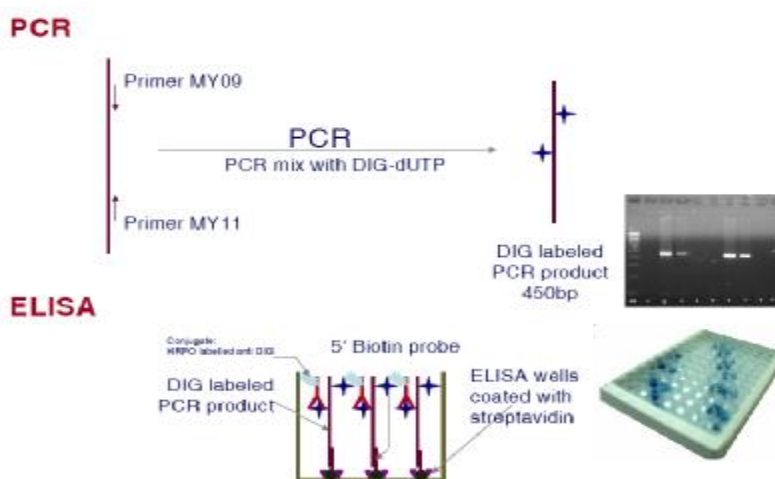


**Hình 72:** Kết quả xét nghiệm RT-PCR phát hiện và định type virus Dengue gây sốt Dengue và sốt xuất huyết Dengue

được luôn nhạy hơn các phương pháp dựa trên qui trình kinh điển của Lanciotti cần phải qua hai vòng PCR với vòng 2 làm tổ bên trong vòng 1 mới có thể định được type virus. Áp dụng trên thực tế lâm sàng, xét nghiệm và kit này đã chứng tỏ có khả năng phát hiện và định type Dengue rất sớm, ngay trong những ngày đầu của bệnh, trước khi có dấu hiệu giảm tiểu cầu.

(5) Xét nghiệm và kit PCR-ELISA phát hiện và định type HPV (hình 73) trong các mảnh sinh thiết hay quệt

cổ tử cung. Đây là xét nghiệm và kit do chúng tôi phát triển dựa trên nguyên tắc sử dụng môi đặc hiệu gen L1 của virus để khuếch đại một đoạn DNA dài 450bp bị đánh dấu bởi digoxigenine nhờ sử dụng PCR mix có thêm dig-dUTP. Sau đó định genotype của



**Hình 73:** Nguyên tắc của xét nghiệm và kit<sup>NK</sup> HPV-PCR-ELISA phát hiện và định type HPV

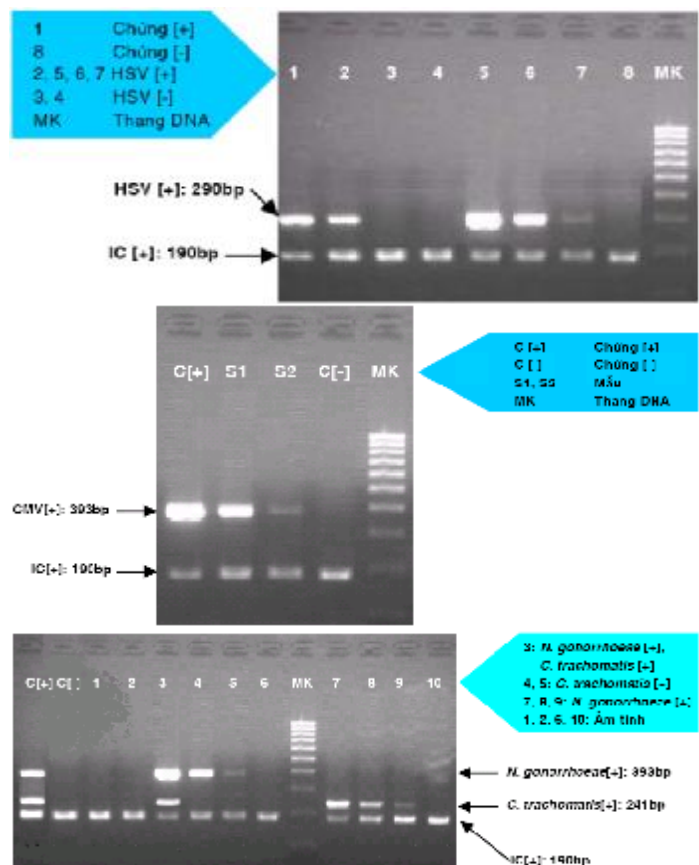
HPV bằng cách lai sản phẩm khuếch đại trên các giếng ELISA có các dò đặc hiệu



genotype gắn trên giếng qua nối hoá học streptavidine-biotin (streptavidine phủ trên giếng sẽ nối với các dò đặc hiệu đã gắn biotin ở đầu 5'). Sản phẩm lai “probe-sản phẩm khuếch đại” sẽ được phát hiện bằng cộng hợp là kháng thể đơn dòng đặc hiệu digoxigenine đánh dấu men peroxidase và tá chất TMB. Xét nghiệm và kit PCR-ELISA này của chúng tôi có khả năng phát hiện và sau đó định được genotype của 10 genotype thường gặp nhất của HPV là: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, và 58. Hiện xét nghiệm và kit này được bệnh viện Phụ Sản Từ Dũ sử dụng thành xét nghiệm dùng tầm soát và sàng lọc ung thư sớm cổ tử cung trên phụ nữ.

(6) Các xét nghiệm và kit PCR để phát hiện các tác nhân vi sinh vật gây bệnh khác như PCR phát hiện HSV, CMV, multiplex PCR phát hiện đồng thời *N. gonorrhoeae* và *C. trachomatis*, *L. monocytogenes*, nonstop nested PCR phát hiện H5.... Tất cả đều đạt các chuẩn mực PCR dùng trong chẩn đoán (**hình 74**).

(7) Xét nghiệm và kit real-time PCR phát hiện và định lượng HBV-DNA trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm HBV dựa trên PCR khuếch đại một đoạn đặc hiệu dài khoảng 190bp từ gene polymerase của HBV-DNA. Xét nghiệm và kit này đạt độ nhạy 10 copies/ml huyết thanh. Có chứng nội tại là plasmid chèn DNA tái tổ hợp sử dụng cùng mỗi nhưng cho sản phẩm khuếch đại có trình tự khác biệt DNA đích nhờ vậy sẽ được phát hiện với dò taqman gắn màu huỳnh quang TexasRed, Hex, hay Joe khác biệt với dò taqman gắn màu FAM phát hiện sản phẩm khuếch đại của DNA đích. Chứng nội tại được cung cấp ở lượng tối thiểu để cho vào PCR mix cùng với tách chiết của mẫu thử nhờ đó kiểm tra được ức chế nếu có trên các

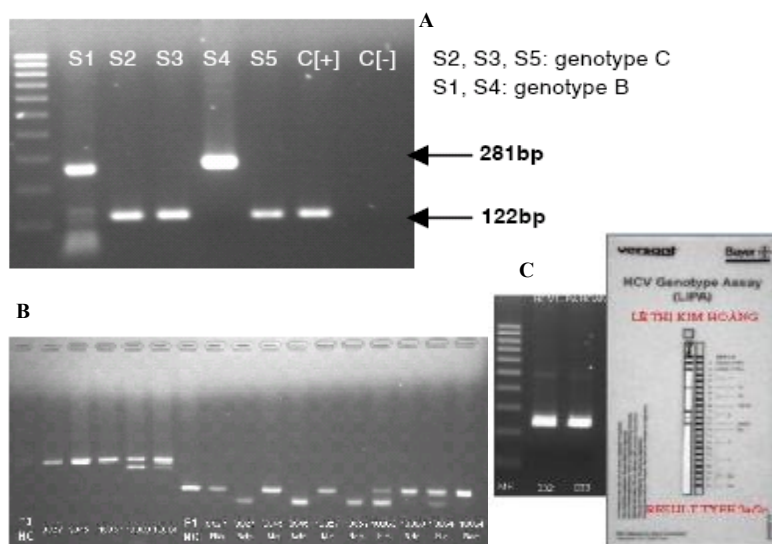


**Hình 74:** Kết quả các xét nghiệm PCR với các kit<sup>NK</sup> HSV-PCR phát hiện *Herpes simplex virus* (trên), kit<sup>NK</sup> CMV-PCR phát hiện *Cytomegalo virus* (giữa), và kit<sup>NK</sup> NGRCHL-multiplex PCR phát hiện *N. gonorrhoeae* và *C. trachomatis* (dưới)

mẫu âm tính. Có chứng âm là huyết tương người bình thường, và chứng dương chứa 100 copies/ml plasmid chèn đúng đoạn DNA đích nhờ vậy chứng minh được độ nhạy của phản ứng đúng như khai báo. Các nồng độ DNA đích chuẩn cũng được cung cấp ở dạng bền vững nhờ vậy mà đường chuẩn luôn được xây dựng đạt  $R \geq 0.990$  và PCR efficiency luôn đạt 90-105%.

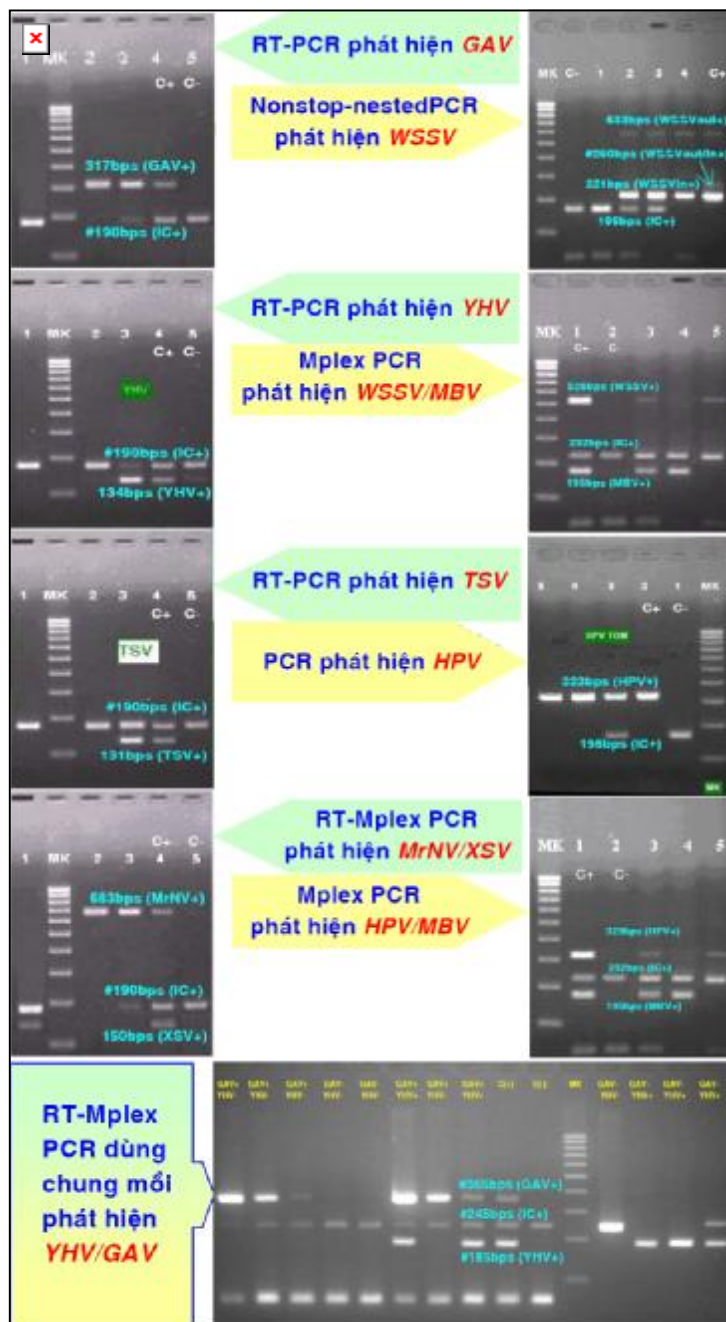
(8) Xét nghiệm và kit RT real-time PCR phát hiện và định lượng HCV-RNA trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm HCV dựa trên PCR khuếch đại một đoạn đặc hiệu ở vùng 5'-NC của genome của HCV. Xét nghiệm và kit này đạt độ nhạy 50 copies/ml huyết thanh. Có chứng nội tại là RNA phiên mã từ plasmid chèn DNA tái tổ hợp sử dụng cùng môi trường nhưng cho sản phẩm khuếch đại có trình tự khác biệt cDNA đích nhờ vậy sẽ được phát hiện và phân biệt với sản phẩm khuếch đại từ DNA đích với cùng nguyên tắc kit real-time PCR phát hiện HBV. Chứng nội tại này được cung cấp ở lượng tối thiểu để cho vào cùng với mẫu thử nhờ đó kiểm tra được hiệu quả tách chiết RNA và phát hiện được ức chế. Chứng âm là huyết tương người bình thường, và có chứng dương chứa 100 copies/ml plasmid chèn đúng đoạn DNA đích nhờ vậy chứng minh được độ nhạy của phản ứng đúng như khai báo. Các nồng độ DNA đích chuẩn cũng được cung cấp ở dạng bền vững nhờ vậy mà đường chuẩn luôn được xây dựng đạt  $R \geq 0.990$  và PCR efficiency luôn đạt 90-105%

(9) Xét nghiệm và kit RT real-time PCR định lượng HIV1-RNA trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS dùng trong theo dõi hiệu quả điều trị đặc hiệu. Xét nghiệm dựa trên PCR khuếch đại một đoạn đặc hiệu ở vùng *gag* gene của genome của HIV1. Xét nghiệm và kit này đạt độ nhạy 100 copies/ml huyết thanh. Có chứng nội tại là RNA phiên mã từ plasmid chèn DNA tái tổ hợp sử dụng



**Hình 75:** Kết quả xét nghiệm định genotype HBV với kit <sup>NK</sup>HBV genotype-PCR (A), xét nghiệm phát hiện đột biến YMDD kháng lamivudine của HBV với kit <sup>NK</sup>HBVlamiR-PCR (B), xét nghiệm định genotype HCV với kit <sup>NK</sup>HCVinoLIPA genotype-core PCR (C).

cùng môi nhưng cho sản phẩm khuếch đại có trình tự khác biệt cDNA đích nhờ vậy sẽ được phát hiện và phân biệt với sản phẩm khuếch đại từ DNA đích với cùng nguyên tắc kit real-time PCR phát hiện HBV. Chứng nội tại này được cung cấp ở lượng tối thiểu để cho vào cùng với mẫu thử nhờ đó kiểm tra được hiệu quả tách chiết RNA và phát hiện được ức chế. Chứng âm là huyết tương người bình thường, và có chứng dương chứa 100 copies/ml plasmid chèn đúng đoạn DNA đích nhờ vậy chứng minh được độ nhạy của phản ứng đúng như khai báo. Các nồng độ DNA đích chuẩn cũng được cung cấp ở dạng bền vững nhờ vậy mà đường chuẩn luôn được xây dựng đạt  $R \geq 0.990$  và PCR efficiency luôn đạt 90-105%.



**Hình 76:** Một số các bộ xét nghiệm PCR và RT-PCR phát hiện các tác nhân virus gây bệnh trên tôm. Các bộ xét nghiệm này đạt đầy đủ các chuẩn mực kỹ thuật cho xét nghiệm PCR và RT-PCR dành cho chẩn đoán

(10) Ngoài ra, để có thể cung cấp thêm giải pháp toàn diện về các xét nghiệm sinh học phân tử dùng trong chẩn đoán và theo dõi hiệu quả điều trị viêm gan virus B và viêm gan virus C mạn tính, chúng tôi cũng đã phát triển các xét nghiệm và kit như: Nested multiplex PCR định genotype HBV, PCR-RFLP phát hiện đột biến YMDD tại vị trí 204 và 180 đề kháng lamivudine của HBV, PCR core kit định genotype HCV

bằng phương pháp lai với các dò trên thanh inoLIPA (**hình 75**). Các xét nghiệm và kit này hoàn toàn có thể triển khai được tại các phòng thí nghiệm có trang bị phương tiện PCR.

(11) Trong lĩnh vực thủy sản, công ty Nam Khoa cũng là một công ty đầu tiên và hàng đầu phát triển được các bộ xét nghiệm PCR và realtime PCR phát hiện và xác định tỷ lệ nhiễm virus WSSV, MBV, HPV, IHHNV, GAV, YHV, TSV, và MrNV với đầy đủ các chuẩn mực dành cho chẩn đoán. Công ty là nhà tiên phong trong phát triển phương pháp xác định tỷ lệ nhiễm bệnh bằng phương pháp real-time bằng kỹ thuật định lượng tương đối. **Hình 76** minh họa một số kit PCR và RT-PCR do công ty Nam Khoa phát triển để phát hiện các virus gây bệnh cho tôm.

### **Và thực tế triển khai kỹ thuật các kỹ thuật sinh học phân tử khác**

Thật sự cho đến hiện nay, nhu cầu đến từ các nhà lâm sàng và nghiên cứu y học không chỉ đòi hỏi phải phát triển và ứng dụng các kỹ thuật PCR và real-time PCR, mà còn đòi hỏi các nhà khoa học phải sớm đưa các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại khác vào ứng dụng. Một trong các kỹ thuật mà chúng tôi nhận thấy rất cần phải thực hiện được đó là kỹ thuật giải trình tự. Quan điểm của chúng tôi là ứng dụng kỹ thuật này không chỉ trong nghiên cứu mà phải phục vụ cho chẩn đoán lâm sàng. Chính vì vậy mà trong năm 2005, chúng tôi đã đầu tư máy giải trình tự CEQ8000 có 3 chức năng: giải trình tự, phân tích đoạn, và phát hiện SNP. Năm 2007 chúng tôi đã nâng cấp thêm chức năng thực hiện nghiên cứu biểu hiện gen và đồng thời đầu tư thêm thiết bị giải trình tự ABI 3130XL có 16 capillaries. Với chức năng giải trình tự, chúng tôi đã thành công trong triển khai các xét nghiệm: (1) Định genotype HCV bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR thu nhận được từ xét nghiệm định lượng HCV-RNA bằng kit <sup>NK</sup>HCV RT realtime TQPCR; (2) Định genotype và phát hiện các đột biến kháng lamivudine, adefovir và entecavir bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR khuếch đại từ gene *rt* của HBV; (3) Phát hiện đột biến precore của HBV để tiên đoán dự hậu viêm gan virus B mạn tính; (4) Phát hiện *M. tuberculosis* kháng rifampicine, INH, và ethambutol trực tiếp từ các bệnh phẩm với kết quả chỉ trong vòng 72 giờ... Ngoài ra, các chức năng khác của CEQ8000 như chức năng phân tích đoạn cũng đã được chúng tôi triển khai trong xét nghiệm xác định quan hệ huyết thống, chức năng phát hiện SNP cũng đang được triển

khai để phát hiện tính đa dạng loài và đột biến, chức năng biểu hiện gene trong nghiên cứu ung thư và hiệu quả điều trị các thuốc trị ung thư..

## **Kết luận**

Đã là một nhà khoa học, chúng ta ai cũng có những tri thức nhất định. Các tri thức này đến từ các sách vở hay các phương tiện tra cứu mà ngày hôm nay chúng ta rất dễ dàng tiếp cận. Đã là nhà nghiên cứu trong lĩnh vực y học thì chúng ta ai cũng có mong muốn làm được một điều gì đó từ các kiến thức mà mình đang có để có thể ứng dụng được vào trong giải quyết một số những thực tế đòi hỏi của chẩn đoán và nghiên cứu y học trong nước. Vấn đề chính yếu là làm sao để tri thức mà chúng ta có không chỉ là tri thức suông mà phải biến thành sản phẩm? Đây là câu hỏi mà tôi nghĩ chúng ta rất nhiều người muốn biết làm sao để trả lời. Chúng tôi nghĩ có 2 câu thơ của Goethe có lẽ sẽ giúp chúng ta có một kim chỉ nam để trả lời câu hỏi trên:

“Knowing is not enough, we must apply  
Willing is not enough, we must do”

Với lời phóng dịch của một người bạn của chúng tôi:

“Tri thức sẽ chẳng bao giờ đủ  
Nếu không đem trải nghiệm với đời  
Ước vọng cũng trở thành vô nghĩa  
Nếu cứ ngồi ôm mộng giữa chơi vơi”

Ngoài ra, để tránh bị các nhà sản xuất nước ngoài chê bai về mặt chất lượng, chúng tôi cho là đừng có tự thua cuộc vì cho là **TIỀN NÀO CỦA ĐÓ**, mà phải trả lời bằng trau dồi tri thức để vươn đến các đỉnh cao khoa học vì **TRI THỨC ĐẾN ĐÂU CHẤT LƯỢNG ĐẾN ĐÓ**.