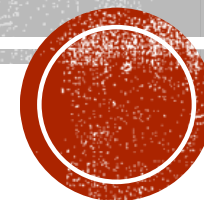


ỨNG DỤNG CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ TRONG BỆNH LÝ NHIỄM

TS. BS. Nguyễn Minh Hà
(drnguyenminhha@gmail.com)



MỤC TIÊU

- Nêu được một số ứng dụng của kỹ thuật SHPT trong việc chẩn đoán VSV gây bệnh.
- Hiểu được một số lưu ý về kỹ thuật có ảnh hưởng đến kết quả.

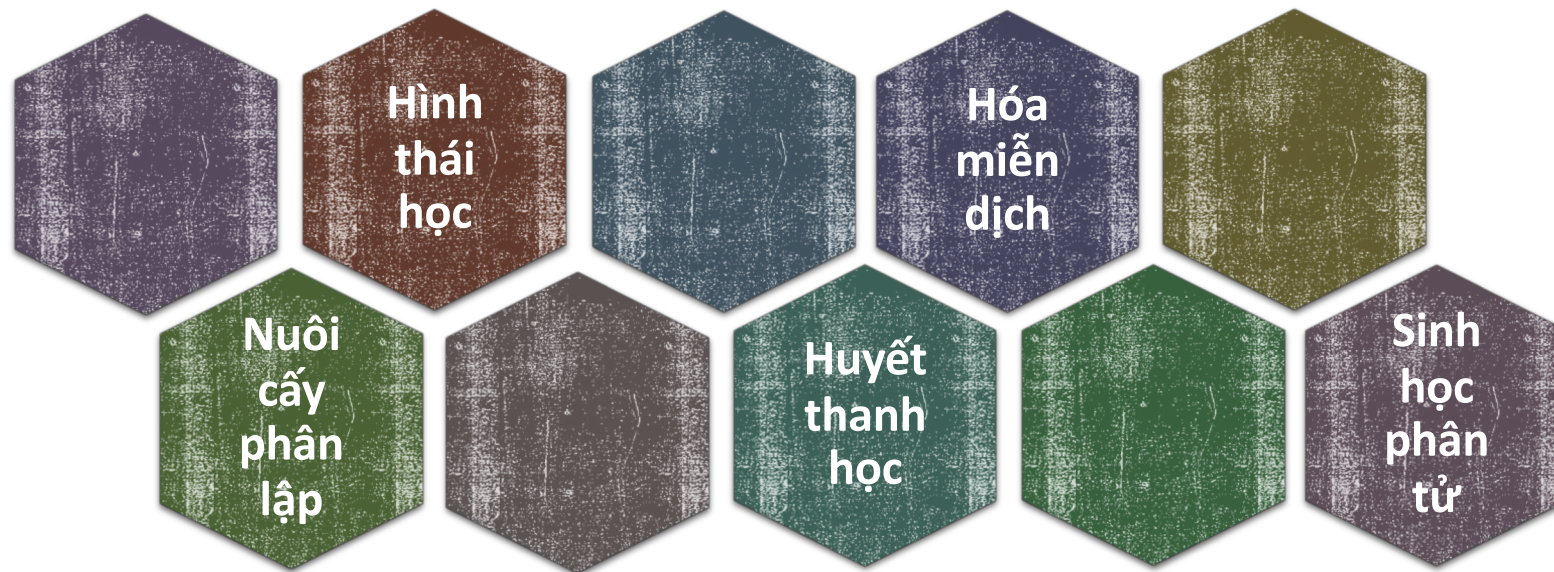


TỔNG QUAN

Các phương pháp XN vi sinh

Các ứng dụng của KT SHPT trong bệnh nhiễm

Các phương pháp xét nghiệm vi sinh



Các phương pháp xét nghiệm vi sinh truyền thống tồn tại các khuyết điểm gì?

- Đa số virus khó mọc hoặc không mọc trên môi trường nhân tạo;
- Nguy cơ cao khi nuôi cấy với những chủng virus độc lực mạnh;
- Δ hình thái học đòi hỏi nhiều kinh nghiệm của KTV;
- Δ huyết thanh học có thể không phát hiện được kháng nguyên do hàm lượng quá thấp; không phát hiện được kháng thể trong giai đoạn nhiễm sớm hoặc do tình trạng suy giảm miễn dịch của người bệnh;
- Việc tạo kháng thể hoặc kháng nguyên đặc hiệu cho Δ tốn nhiều công sức, tiền bạc và thời gian; ...

Các ứng dụng KT SHPT trong bệnh do virus

- Chẩn đoán xác định virus gây bệnh
- Sàng lọc nhanh để đối phó dịch (cúm A/H5N1, SARS, Ebola...)
- Tiên lượng, quyết định điều trị và theo dõi điều trị thông qua định lượng và định kiểu gen (HCV, HBV, HPV ...)
- Sàng lọc máu (HBV, HCV, HIV bằng KT NAT)

Các ứng dụng KT SHPT trong bệnh do VK và KST

- Định danh VK, KST gây bệnh (nhận diện *S. aureus* kháng methicillin (MRSA), nấm gây viêm màng não, KST sốt rét *P. falciparum*, định type *H. pylori* có nguy cơ sinh UT ...)
- Phát hiện nhanh nhóm VK khó hoặc không thể nuôi cấy (*M. tuberculosis*, *N.gonorrhoea*, *C.trachomatis*, *M.pneumonia*...)
- Xác định tính kháng thuốc của VK (phát hiện gen *mecA* của chủng MRSA, giải trình tự các gen *rpoB*, *hsp65*, *gyrA*, *inhA*... giúp phát hiện *M.tuberculosis* kháng và đa kháng thuốc ...)
- Xác định sự tái phát, tái nhiễm
- Xác định nguy cơ vũ khí sinh học (do *Bacillus anthracis*, *Yersinia petis*, ...)
- Nghiên cứu dịch tễ học phân tử.



CÁC KT SHPT THƯỜNG ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG BỆNH NHIỄM

- **KT không khuếch đại:** PP lai sử dụng các đoạn dò có đánh dấu đặc hiệu, ví dụ KT lai phát hiện genotype HCV bằng que inoLipa);
- **KT khuếch đại:** PCR, realtime PCR, sequencing, bDNA, LCR, RFLP ...).

KT realtime PCR thường được ưu chuộng hơn

- Nhanh, dễ phân tích kết quả;
- Không cần phân tích sau PCR;
- Định lượng được trong một phạm vi lớn (khác với KT PCR là phát hiện điểm cuối);
- Độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn PCR cổ điển.

BIOMEDICAL SERVICE UNIT

ID DVND29436/0608

Họ và tên

Ngày thực hiện

Người thực hiện

Loại xét nghiệm

Máy sử dụng PCR

Phương pháp thực hiện

HBV-DNA PCR

ICYCLER (Biorad)

PCR

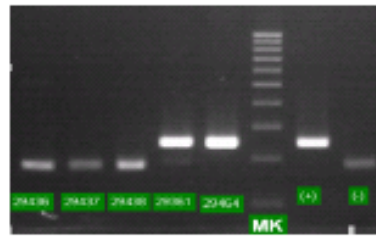
- khuếch đại đoạn DNA 259bp đặc hiệu HBV
- DNA chứng nội tại #190bp (được trích biệt cùng với mẫu)
- chứng [+] 100copies/ml chứng minh độ nhạy thử nghiệm
- chứng [-] là mẫu thực chứng minh qui trình không ngoại nhiễm

KẾT QUẢ

PCR
khuếch đại đoạn DNA
259bp đặc hiệu HBV

PCR 29436 : CƯỜNG
Không có band 259bp

PCR
DNA chứng nội tại #190bp



KẾT LUẬN:

ÂM TÍNH VỚI HEPATITIS B VIRUS

*Tp, HCM .Ngày 26 tháng 06 năm 2008
Trường phòng xét nghiệm*

DỊCH VỤ XÉT NGHIỆM Y SINH

ID **DVDH29372/0608**

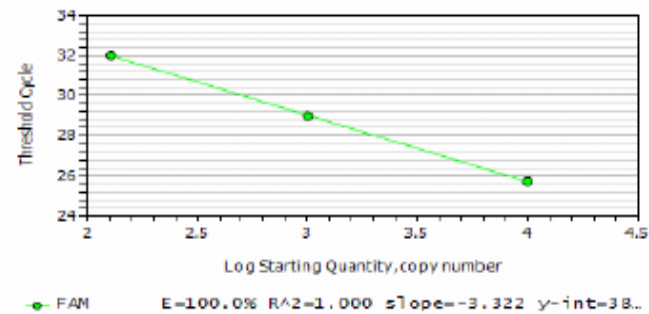
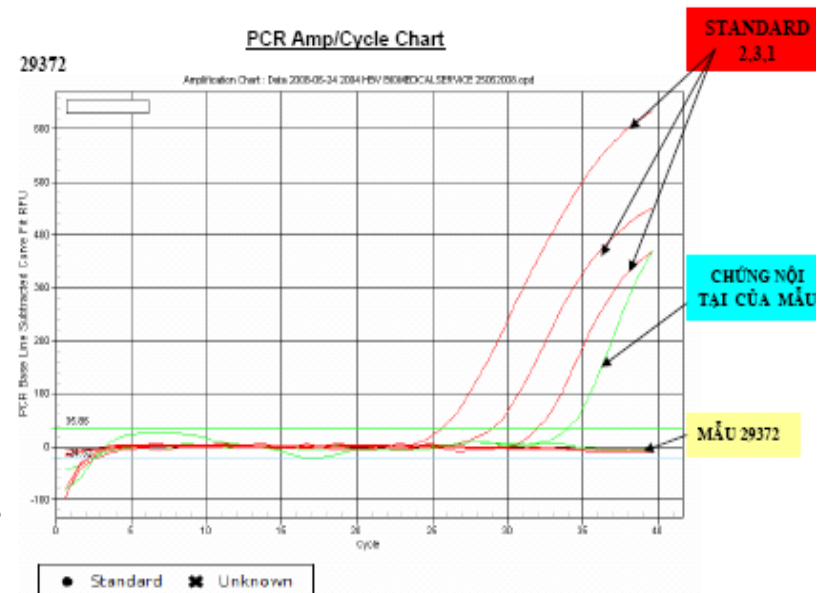
Họ và Tên **32**
Ngày thực hiện
Người thực hiện
Loại xét nghiệm **HBV-DNA ĐỊNH LƯỢNG PCR**
Máy sử dụng Realtime PCR **IQ 5(Biorad)**
Phương pháp thực hiện **Multi color real-time PCR dùng taqman probe**

- Probe gắn huỳnh quang Fam phát hiện HBV DNA, probe gắn huỳnh quang Texas Red phát hiện chứng nội tai được trích biệt cùng với mẫu
- Định lượng nhờ 3 nồng độ chuẩn (S1: 10.000 copies, S2: 1000 copies, S3: 100 copies) được phát hiện real-time cùng với mẫu

KẾT QUẢ

Nồng độ phát hiện virus trên bệnh nhân (copies/ml huyết thanh) **Dưới ngưỡng phát hiện**

Nồng độ phát hiện virus ngưỡng (copies/ml huyết thanh) **500** Copies
Giá trị này có thể qui đổi sang bDNA bằng cách : số copies/ml huyết thanh nhân thêm cho 10



PCR Standard Curve : Data 2008-06-24 2004 HBV BIOMEDICALSERVICE 25062008.opd

Standard Curve Data
Standard Curve Chart

Tp. HCM. Ngày 26 tháng 06 năm 2008
Trưởng phòng xét nghiệm

Ho Chi Minh City., 26 Jun 2008
Correspondance

BIOMEDICAL SERVICE UNIT

ID DVTA 29100/0608

Họ và Tên 1971
Ngày thực hiện
Người thực hiện
Loại xét nghiệm
Máy sử dụng giải trình tự

HBV GENOTYPE TÌM ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC LAMI-ADEF (kỹ thuật giải trình tự) CEQ 8000 (BECKMAN COULTER.)

KẾT QUẢ

GENOTYPE C

KẾT QUẢ GENOTYPE

CÁC NHÓM ĐỘT BIẾN KHÁNG LAMIVUDINE ĐƯỢC KHẢO SÁT

- L80V/I
I169T
V173L
L180M
A181T
T184S
M204I/V/S
V207M/I
Q215S

CÁC NHÓM ĐỘT BIẾN KHÁNG ADEFOVIR ĐƯỢC KHẢO SÁT

- V84M
S85A
L80V/I
A181V/T
V214A
Q215S
N236T

KẾT QUẢ GHI NHẬN ĐƯỢC

- KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
L180M(HZ)
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
M204V(HZ)
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY

KẾT QUẢ GHI NHẬN ĐƯỢC

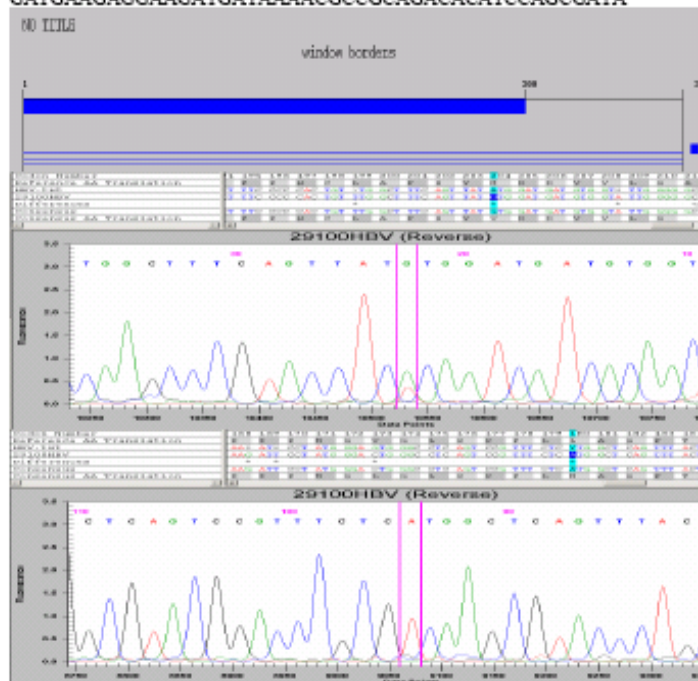
- KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY
KHÔNG TÌM THẤY

GHI CHÚ:

Heterozygote Detection: có nghĩa là phát hiện trên chủng HBV của Bệnh Nhân có một số tỉ lệ virus bị đột biến

Các thông tin liên quan đến kết quả giải trình tự thực hiện trên đoạn gen đặc hiệu khuếch đại từ virus viêm gan B của bệnh nhân

29100 HBV M204V(HZ) L180M(HZ)
GCCCCCAATACCACATCATCCACATAACTGAAAGCCAAACAGTGGGGGAA
AGCCCTACGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGAGCCATGAGAA
ACGGACTGAGGCCAGTCCCATAGGAATCTTGCAGAAAGCCAAAGATGATG
GGATGGGAATACAAGTGCAATTTCCGTCCGAAGGTTTTGTACAGCAACAA
GAGGGAAACATAGAGGTTCTTGAGCAGGAATCGTGCAGGTCCTTGCATGG
TCCCGTGCTGGTAGTTGATGTTCTCTGGAAGTAGAGGACAAACGGGCAACA
TACCTCGGTAGTCCAGAAGAACCAACAAGAAGATGAGGCATAGCAGCAG
GATGAAGAGGAAGATGATAAAACGCCGACACACATCCAGCGATA



KẾT LUẬN BỆNH NHÂN DƯƠNG TÍNH VỚI HEPATITIS B VIRUS (HBV)

NHẬN THẤY CÓ ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC LAMIVUDINE TRÊN CHỦNG HBV CỦA BỆNH NHÂN

Tp. HCM .Ngày 24 tháng 06 năm 2007
Trường phòng xét nghiệm

BIOMEDICAL SERVICE UNIT

ID DVND 29038/0608

Họ và Tên 50

Ngày thực hiện

Người thực hiện

Loại xét nghiệm

HBV TÌM ĐỘT BIẾN KHÁNG PROMOTER -
PRECORE(kỹ thuật giải trình tự)
CEQ 8000 (BECKMAN COULTER.)

Máy sử dụng giải trình tự

KẾT QUẢ

KẾT QUẢ GENOTYPE

GENOTYPE B

CÁC ĐIỂM ĐỘT BIẾN PROMOTOR-PRECORE

ĐƯỢC KHẢO SÁT

G1896A(Codon 632)

A1762T(Codon 588)

G1764A(Codon 588)

KẾT QUẢ GHI NHẬN ĐƯỢC

G1896A

(Ở vị trí 1896, Guanine bị thay thế bằng Adenine)

A1762T

(Ở vị trí 1762, Adenine bị thay thế bằng Thymine)

G1764A

(Ở vị trí 1764, Guanine bị thay thế bằng Adenine)

KẾT LUẬN

BỆNH NHÂN DƯƠNG TÍNH VỚI HEPATITIS B VIRUS (HBV) TYPE B

CÓ ĐỘT BIẾN PRECORE TRÊN CHÙNG HBV CỦA BỆNH NHÂN

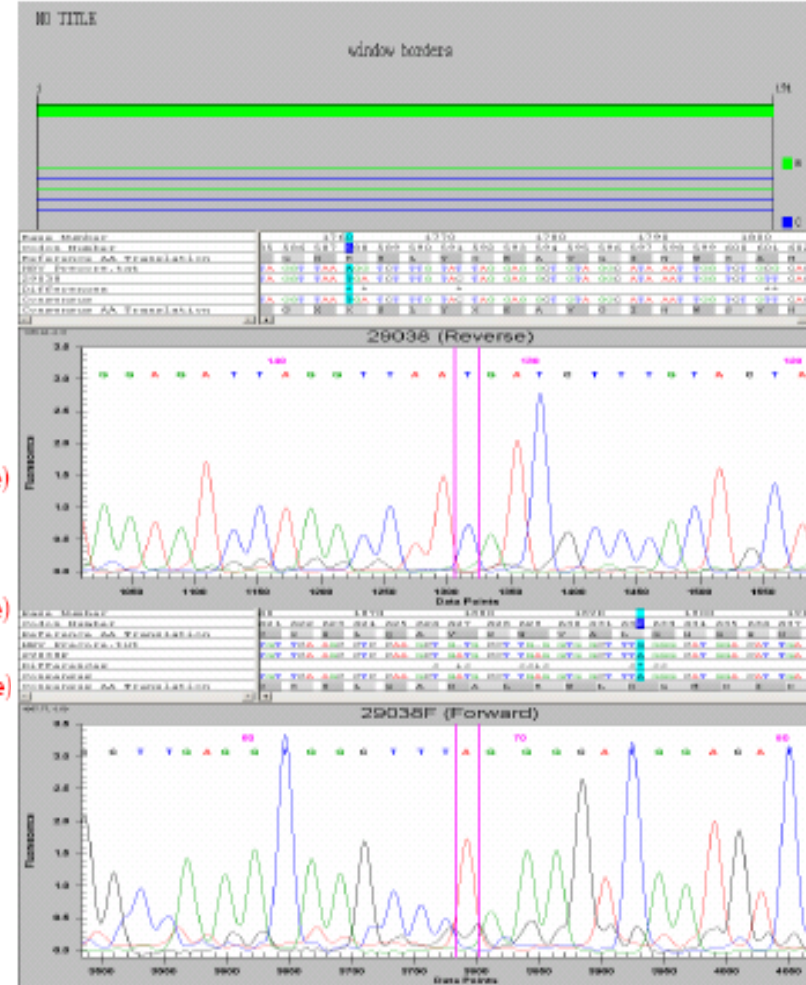
CÓ ĐỘT BIẾN PROMOTOR TRÊN CHÙNG HBV CỦA BỆNH NHÂN

Tp. HCM .Ngày 23 tháng 06 năm 2008

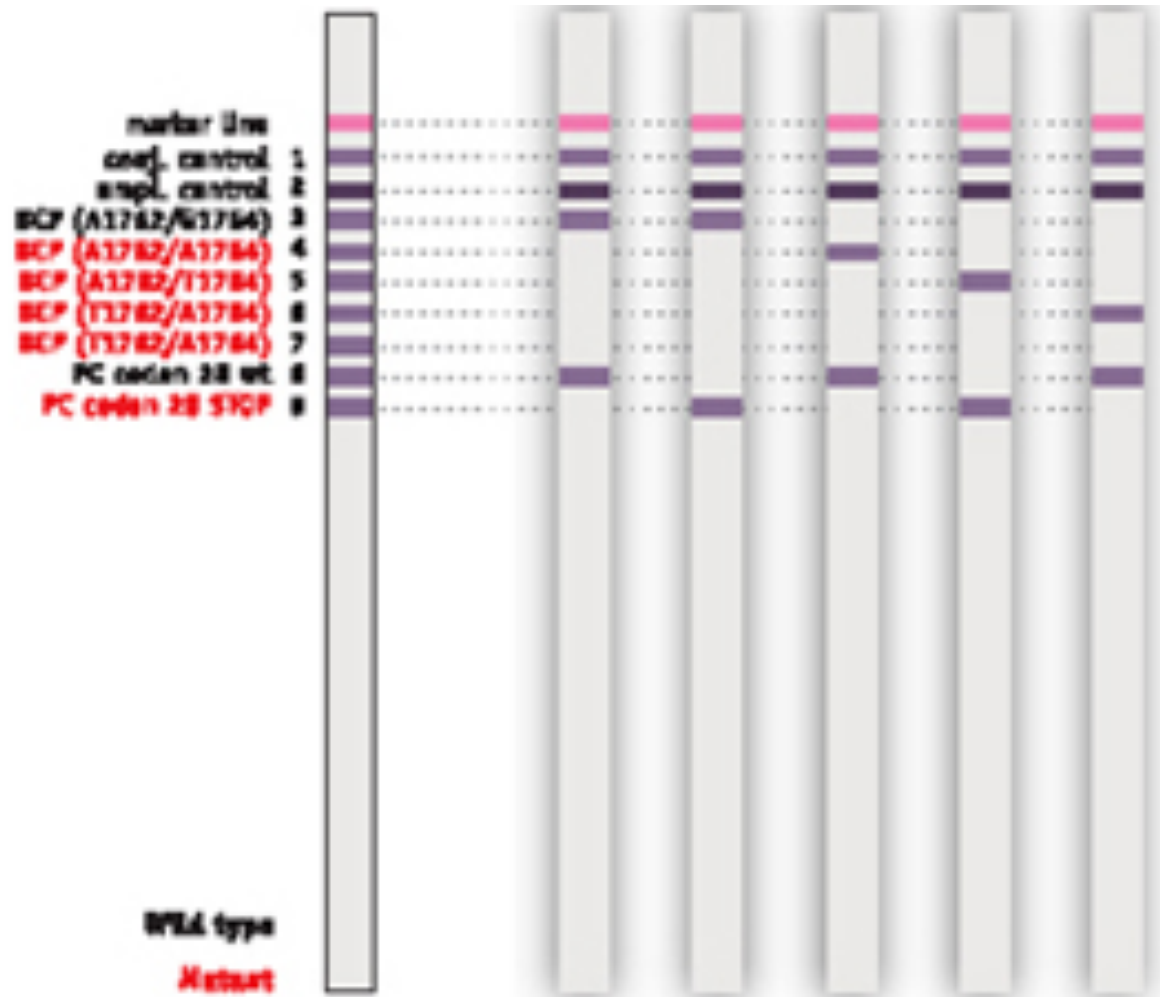
Trưởng phòng xét nghiệm

Các thông tin liên quan đến kết quả giải trình tự thực hiện trên
đoạn gen đặc hiệu khuếch đại từ virus viêm gan B của bệnh nhân

29038 HBV PRECORE A1762T G1764A G1896A
AAGCCACCCAAGGCACAGCTTGGAGGCTTGAACAGTAGGACATGAACAT
GAGATGATTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCATGGTGTGGTGAACAGAC
CAATTTATGCCTACAGCCTCCTAGTACAAAAGATCATTAAACCTAATCTCCTC
CCCCAACTCCTCCCACTCAGTAAACACACAGTCTTTGAAGTA

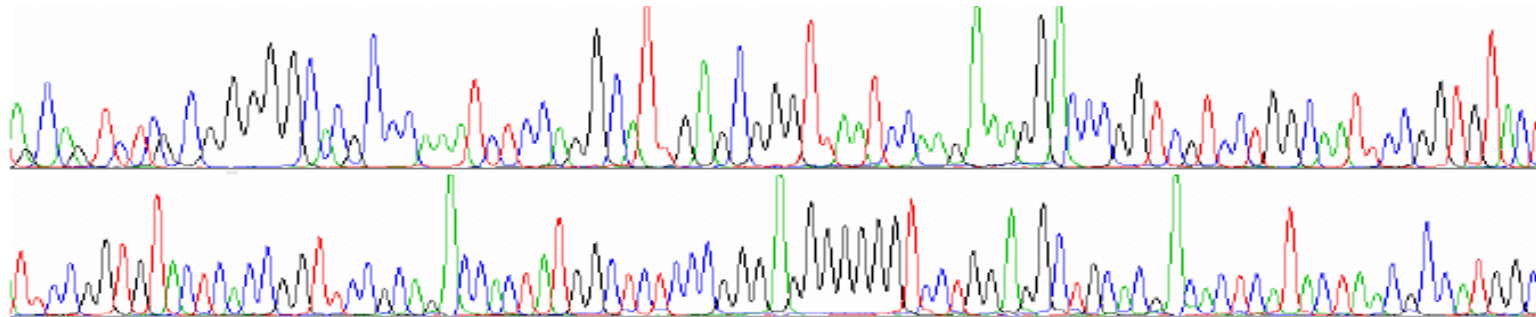


GENOTYPE HCV BẰNG INOLIPA



- Phân biệt các type và subtype HCV dựa vào trình tự nu. Trên vùng 5'UTR và vùng lõi
- cDNA của HCV được lai với các probe đặc hiệu cho các type và subtypes được gắn trên que thử.
- Độ đặc hiệu 96.7% và độ nhạy là 4800 UI/ml.

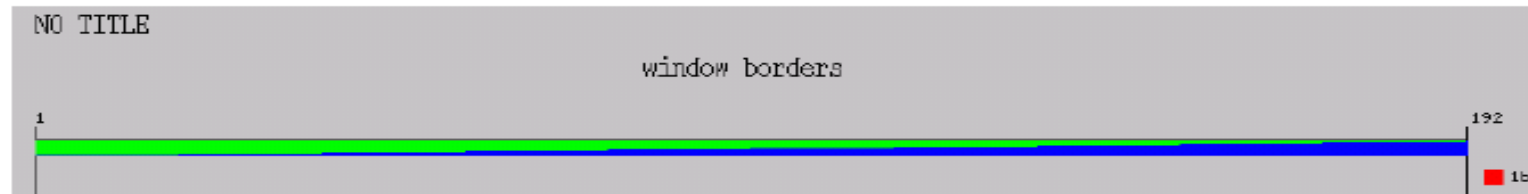
Định genotype HCV bằng phương pháp giải trình tự



Kết quả giải trình tự

19582 HCV

```
TCGCGCTAGCAGTCTCGCGGGGGGCACGCCCAAATCTCCAGGCATTGAGCG  
GGTTGATCCAAGAAAGGACCCGGTCGTCCTGGCAATTCCGGTGTACTCAC  
CGGTTCCGCAGACCACTATGGCTCTCCCGGGAGGGGGGGTCTGGAGGCT  
GCACGACACTCATACTAACGCCATGGCTAGACGCTTTCTGCA
```



KẾT QUẢ

HCV ĐỊNH LƯỢNG

1.821 Copies/ml huyết thanh

HCV GENOTYPE

1b



MỘT SỐ LƯU Ý KHI ÁP DỤNG CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ TRONG BỆNH NHIỄM

- Có thể được thực hiện từ mẫu bệnh không cần được bảo quản để giữ cho VSV sống sót.
- Có độ nhạy kỹ thuật tương đối tốt hơn đa phần các pp truyền thống.
- Thời gian trả KQ ngắn hơn pp cấy truyền thống,
- Có thể xác định nhiều tác nhân cùng lúc.

- Đối với các tác nhân gây bệnh có vật chất di truyền là RNA, cần đặc biệt chú ý đảm bảo chất lượng giai đoạn tách chiết và tinh sạch vật chất di truyền vì bản chất **RNA nhạy cảm, dễ bị hủy, gây âm tính giả.**
- Đối với VK, không nên dùng SHPT để **định lượng** vì không phân biệt được VK sống hoặc chết. Nồng độ được lựa chọn để phân định thể nhiễm bệnh (infected) và thể mang VK (carrier) cũng ít có ý nghĩa vì quyết định cuối cùng phụ thuộc vào cân nhắc của cán bộ lâm sàng;

- Đối với các tác nhân gây bệnh có tốc độ biến đổi di truyền (đột biến) cao, cần hết sức lưu ý trong **thiết kế cập môi vì dễ gây bỏ sót các chủng mới biến đổi** (cúm, HIV ...)

```

A/Taiwan/421/2006 (H1N1) GCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAATGGGGATCCAA 60
A/Taiwan/482/2005 (H3N2) .....C.....
A/HongKong/156/1997 (H5N1) .....A.....A.....A..C....
A/Canada/rv504/2004 (H7N3) .....
A/HongKong/2108/2003 (H9N2) .....G.....A.....A.....

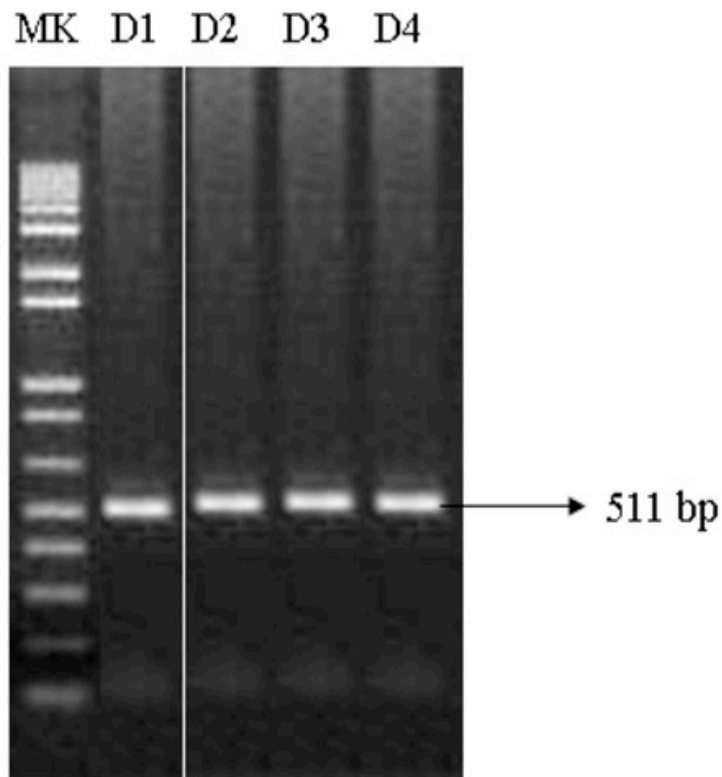
A/Taiwan/421/2006 (H1N1) ATAATATGGACAGAGCAGTTAAACTGTATCGAAAGCTTAAGAGGGAGATAACATTCCATG 120
A/Taiwan/482/2005 (H3N2) .....A.....A.....
A/HongKong/156/1997 (H5N1) .C.....A..C.AG....G.....A..G.....
A/Canada/rv504/2004 (H7N3) .C.....G..C.....G....A..A....A.....
A/HongKong/2108/2003 (H9N2) .C.....A..C.AG....G.....A..G.....

```

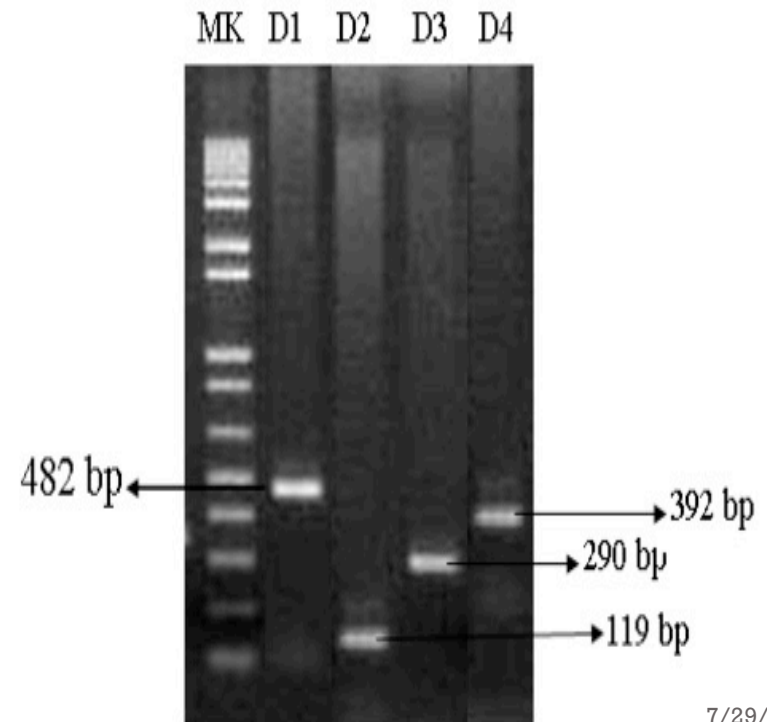
- Đối với việc xác định VK trong các mẫu bệnh phẩm đặc biệt (có nồng độ VK thấp) như mẫu phết, mẫu dịch ... đôi khi cần một số biện pháp giúp tăng sinh để tăng độ nhạy của KT, tránh âm tính giả do quá ít tác nhân gây bệnh trong bệnh phẩm ban đầu;
- Đối với việc xác định KST trong phân bằng KT dựa trên nền tảng PCR vẫn có khả năng âm tính giả do dùng lượng phân nhỏ và bị pha loãng → cần những kỹ thuật tăng sinh trước đó;

- Đối với Δ xác định KST, việc sử dụng các cặp mồi có độ đặc hiệu khác nhau (cho giống, cho loài) có thể gây ra tỷ lệ dương tính khác nhau.

Hình 4: PCR1 phát hiện virus Dengue với kích thước 511bp



Hình 5: Semi - nested Multiplex PCR2 phát hiện các type virus Dengue



Đo tải lượng (virus load) là gì?

- Định lượng/nồng độ virus trong một đơn vị thể tích huyết tương (HBV, HCV, HIV ...)
- Đơn vị là copies/mL hoặc IU/mL.
- Độ nhạy KT (LOD) và dải đo tùy thuộc bộ kit → khác biệt về chi phí.

Assay	Manufacturer	Technique	Lower limit of detection (qualitative assay)	Dynamic range of quantification (quantitative assay)
Amplicor® HCV v2.0	Roche Molecular Systems	Manual RT-PCR	50 IU/ml	NA
Cobas® Amplicor® HCV v2.0	Roche Molecular Systems	Semi-automated RT-PCR	50 IU/ml	NA
Versant® HCV RNA Qualitative Assay	Bayer HealthCare	Manual TMA	10 IU/ml	NA
Amplicor HCV Monitor® v2.0	Roche Molecular Systems	Manual RT-PCR	600 IU/ml	600-500,000 IU/ml
Cobas® Amplicor HCV Monitor v2.0	Roche Molecular Systems	Semi-automated RT-PCR	600 IU/ml	600-500,000 IU/ml
LCx HCV RNA Quantitative Assay	Abbott Diagnostic	Semi-automated RT-PCR	25 IU/ml	25-2,630,000 IU/ml
Versant® HCV RNA 3.0 Assay	Bayer HealthCare	Semi-automated bDNA	615 IU/ml	615-7,700,000 IU/ml
Cobas® TaqMan HCV Test	Roche Molecular Systems	Semi-automated real-time PCR	15 IU/ml	43-69,000,000 IU/ml
Abbott RealTime	Abbott Diagnostic	Semi-automated real-time PCR	30 IU/ml or 12 IU/ml*	12-100,000,000 IU/ml

IU/ml và copies/ml

Sử dụng đơn vị đo nào trong thực tiễn lâm sàng?

- Ý nghĩa thực sự của một copy (bản sao):
 - Một copy (bản sao) thực chất chỉ là một đoạn trình tự gen ngắn và không thực sự đại diện cho toàn bộ bộ gen của virus
 - Tín hiệu thu được có thể thu được từ:
 - * Virus không hoạt động
 - * Bộ gen không hoàn chỉnh của virus
 - Tín hiệu có thể không tương đương với số lượng virus, đặc biệt với những đoạn trình tự lặp lại trong bộ gen virus
 - Tín hiệu có thể không đại diện có số lượng virus đang hoạt động

IU/ml ~~←~~ copies/ml

$\text{copies/ml} = \text{IU/ml} \times \text{hệ số chuyển đổi}$: có tính chất tham khảo

- Đơn vị IU/ml – Đòi hỏi từ việc cần thiết phải tiêu chuẩn hóa xét nghiệm đo tải lượng virus
 - Chuẩn hóa theo nồng độ chuẩn của WHO
 - Được khuyến nghị sử dụng trong các bản đồng thuận quốc tế về chẩn đoán, điều trị, quản lý bệnh nhân viêm gan

Assay	Conversion Factor
Amplicor HCV Monitor v2.0 (manual procedure)	1 IU/mL = 0.9 copies/mL
Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 (semi-automated procedure).....	1 IU/mL = 2.7 copies/mL
Versant HCV RNA 3.0 Quantitative Assay.....	1 IU/mL = 5.2 copies/mL
Cx HCV RNA Quantitative Assay.....	1 IU/mL = 3.8 copies/mL
SuperQuant.....	1 IU/mL = 3.4 copies/mL

Assay	Conversion Factor
Digene HC - I & II	Không chuẩn hóa
Versant HBV DNA 3.0	1 IU/mL = 5.2 copies/mL
Amplicor HBV Monitor	1 IU/mL = 5.6 copies/mL
Cobas TaqMan HBV	1 IU/mL = 5.82 copies/mL





MỘT SỐ THÁCH THỨC CÒN TỒN TẠI

- Đặc điểm di truyền của các tác nhân gây bệnh thay đổi theo vùng miền, đối tượng ký chủ và sự đột biến tự nhiên.

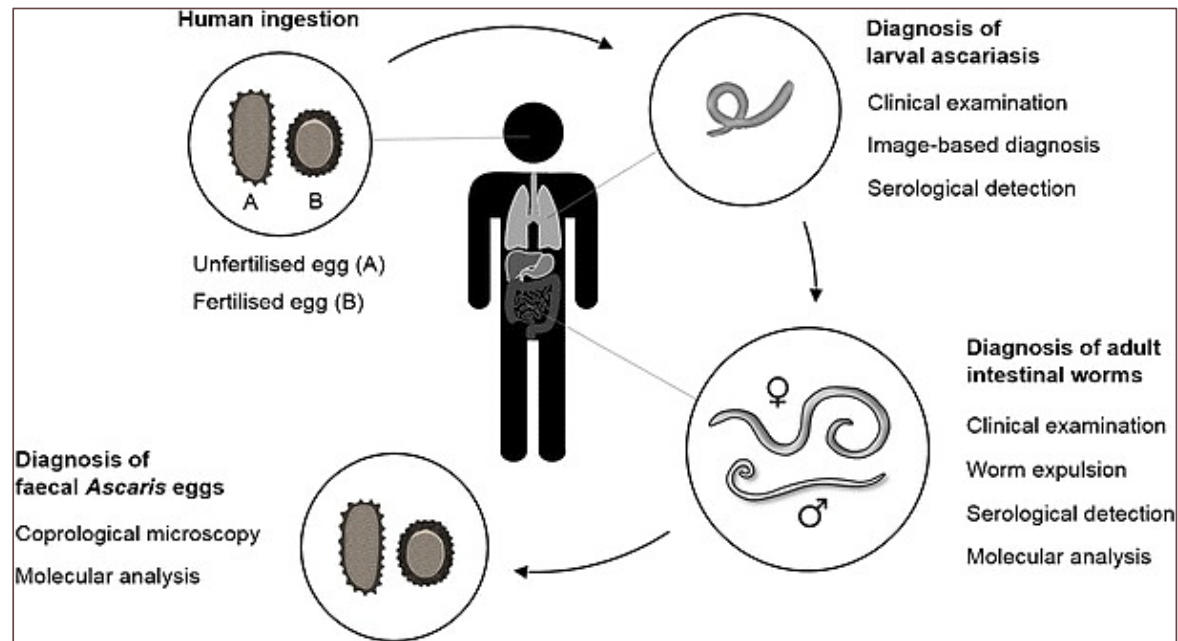
```

A/Taiwan/421/2006 (H1N1) GCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAATGCCCTTAATGGGAATGGGGATCCAA 60
A/Taiwan/482/2005 (H3N2) .....C.....
A/HongKong/156/1997 (H5N1) .....A.....A.....A..C....
A/Canada/rv504/2004 (H7N3) .....
A/HongKong/2108/2003 (H9N2) .....G.....A.....A.....

A/Taiwan/421/2006 (H1N1) ATAATATGGACAGAGCAGTTAAACTGTATCGAAAGCTTAAGAGGGAGATAACATTCCATG 120
A/Taiwan/482/2005 (H3N2) .....A.....A.....
A/HongKong/156/1997 (H5N1) .C.....A..C.AG.....G.....A..G.....
A/Canada/rv504/2004 (H7N3) .C.....G..C.....G.....A..A.....A.....
A/HongKong/2108/2003 (H9N2) .C.....A..C.AG.....G.....A..G.....

```

- Sự hạn chế của các nguồn mẫu phù hợp để thực hiện XN, bao gồm loại mẫu, thời điểm lấy mẫu và chất lượng của mẫu.



- Vấn đề Kiểm tra chất lượng và Đảm bảo chất lượng XN SHPT
 - ✓ Các yếu tố của mẫu bệnh phẩm ảnh hưởng đến KQ XN SHPT
 - ✓ Vai trò của các mẫu chứng (control)