

Ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt đối với giá trị CT trong kỹ thuật xác định SARS-CoV-2 bằng phương pháp realtime RT-PCR

Hoàng Xuân Quảng, Bùi Tiến Dũng, Đặng Tiến Trường*

Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, 222 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/11/2021; ngày chuyển phản biện 25/11/2021; ngày nhận phản biện 15/12/2021; ngày chấp nhận đăng 20/12/2021

Tóm tắt:

SARS-CoV-2 gây ra đại dịch COVID-19 toàn cầu vào năm 2019. Giá trị chu kỳ ngưỡng (CT) của kỹ thuật realtime RT-PCR là tiêu chuẩn vàng trong xác định nhiễm, đánh giá nguy cơ lây nhiễm và tiêu chuẩn ra viện, hết cách ly bệnh nhân. Bất hoạt nhiệt là giải pháp đơn giản, kinh tế giúp đảm bảo an toàn trong xét nghiệm SARS-CoV-2. Sự thay đổi của giá trị CT sau khi bất hoạt bằng nhiệt chưa được đánh giá đầy đủ. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của phương pháp bất hoạt bằng nhiệt tới giá trị CT trong kỹ thuật realtime RT-PCR xác định SARS-CoV-2. Bốn nhóm mẫu, gồm một nhóm không bất hoạt, ba nhóm bất hoạt ở 65°C/30 phút, 80°C/10 phút và 95°C/10 phút; mỗi nhóm gồm 16 ống bệnh phẩm, được chia từ 16 bệnh phẩm dịch tỵ hầu đã được xác định nhiễm SARS-CoV-2, các nhóm được xử lý bất hoạt, sau đó tiến hành phân tích bằng kỹ thuật realtime PCR. Kết quả cho thấy, bất hoạt virus bằng nhiệt trước làm tăng giá trị CT của kỹ thuật realtime RT-PCR trong xác định các mẫu dương tính với SARS-CoV-2. Nhiệt độ bất hoạt càng lớn thì giá trị CT càng tăng cao.

Từ khóa: bất hoạt bằng nhiệt, realtime RT-PCR, SARS-CoV-2.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Vào tháng 12/2019, một loại coronavirus có tên là SARS-CoV-2 xuất hiện ở TP Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc. Virus này nhanh chóng lây lan sang hầu hết các quốc gia trong vòng 2 tháng và trở thành đại dịch COVID-19 vào đầu năm 2020 [1-3]. Số lượng người nhiễm và tử vong liên tục tăng cao, gây ra gánh nặng cho nền y tế, làm tổn thất nặng nề về kinh tế, xã hội toàn cầu. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), tính đến ngày 7/11/2021, hơn 249 triệu trường hợp được xác nhận nhiễm COVID-19 và hơn 5 triệu trường hợp tử vong đã được báo cáo [4].

Do chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu nên việc chẩn đoán chính xác và nhanh chóng là rất quan trọng trong việc phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh [5]. Bên cạnh đó, xử lý đúng các mẫu bệnh phẩm nhiễm hoặc nghi ngờ nhiễm SARS-CoV-2 trước khi xét nghiệm có vai trò rất quan trọng để đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế, giúp ngăn ngừa nguy cơ phát tán virus ra môi trường, từ đó giúp bảo vệ cộng đồng [6]. SARS-CoV-2 có khả năng lây lan mạnh nên các mẫu bệnh phẩm được khuyến cáo cần được bất hoạt trước khi thực hiện xét nghiệm. Có nhiều phương pháp bất hoạt, tuy nhiên phương pháp bất hoạt bằng nhiệt đơn giản, kinh tế, tiết kiệm thời gian và có thể thực hiện với số lượng lớn nên phù hợp triển khai thực hiện ở nhiều phòng xét nghiệm ở các cấp độ khác nhau [3, 7].

Xét nghiệm realtime RT-PCR được coi là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán nhiễm COVID-19 [8]. Kết quả xét nghiệm dựa trên chỉ số CT của kỹ thuật realtime RT-PCR. Chỉ số CT để xác định kết quả âm tính hay dương tính khác nhau giữa các bộ kit. Chỉ số CT

của một bộ kit cũng có thể bị ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau. Trong đó, bất hoạt bằng nhiệt có thể làm thay đổi chỉ số CT của kỹ thuật. Đã có nghiên cứu chỉ ra việc giảm tỷ lệ phát hiện SARS-CoV-2, tăng tỷ lệ âm tính giả khi bất hoạt virus bằng nhiệt, tuy nhiên kết quả này không có sự thống nhất [9, 10]. Nghiên cứu này nhằm khảo sát ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt đối với giá trị CT của kỹ thuật realtime RT-PCR trong xét nghiệm SARS-CoV-2.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

16 mẫu bệnh phẩm dịch tỵ hầu, bảo quản trong môi trường vận chuyển không bất hoạt vì rút, thu từ 16 bệnh nhân khác nhau, được chẩn đoán nhiễm SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật realtime RT-PCR (giá trị CT ở bảng 1), tại phòng xét nghiệm khẳng định. Mẫu bệnh phẩm được bảo quản ở 2-8°C, trong vòng 12 giờ sau khi thu mẫu.

Bảng 1. Giá trị CT của 16 mẫu nghiên cứu.

Mã mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CT	16,5	15,2	15,3	16,6	16,8	17,1	17,5	13,8	15,5	15,6	16,0	17,4	16,2	17,5	16,8	17,4

2.2. Bất hoạt vi rút bằng nhiệt

Mỗi bệnh phẩm được trộn đều, chuyển vào 4 ống Eppendorf 1,5 ml, mỗi ống 350 µl. Các ống được chia thành 4 nhóm, gồm:

- Nhóm 1 (nhóm chứng): Không sấy, bảo quản mẫu ở tủ lạnh 2-8°C.
- Nhóm 2: Sấy ở 65°C trong 30 phút.
- Nhóm 3: Sấy ở 80°C trong 10 phút.
- Nhóm 4: Sấy ở 95°C trong 10 phút.

*Tác giả liên hệ: Email: truongdtvmmu@gmail.com

Effect of heat inactivation on CT value of realtime RT-PCR technique for SARS-CoV-2 detection

Xuan Quang Hoang, Tien Dung Bui,
Tien Truong Dang*

Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University,
222 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 17 May 2022; revised 2 June 2022; accepted 7 June 2022

Abstract:

SARS-CoV-2 was the cause of the global COVID-19 pandemic in 2019. The cycle threshold (CT) value of the real-time RT-PCR technique is the gold standard in infections diagnosis, infections risk assessment, discharged criteria, and patient isolation for SARS-CoV-2. Heat inactivation is a simple, economical solution for safety in testing for SARS-CoV-2. The change of CT values after heat inactivation has not been thoroughly evaluated. This study evaluated the effect of heat inactivation on CT value in the realtime RT-PCR technique of SARS-CoV-2 detection. Four groups of samples consisted of one non-inactivated group, three groups that were inactivated at 65°C/30min, 80°C/10min, and 95°C/10min; each group included 16 tubes, from 16 nasopharyngeal swabs samples that were confirmed to be infected with SARS-CoV-2. Groups were inactivated and then analysed by realtime PCR technique. The results show that virus inactivation by heat increased the CT value of realtime PCR in SARS-CoV-2 positive samples. The higher temperature was in the inactivation, and the higher CT value was increased.

Keywords: heat-inactivation, realtime RT-PCR, SARS-CoV-2.

Classification number: 3.1

Sau khi bất hoạt bằng nhiệt trên hệ thống HV 110 (Hirayama, Nhật Bản), các mẫu được mã hóa và thực hiện các bước tiếp theo.

2.3. Tách chiết ARN

ARN được tách chiết bằng bộ kit ab Genix TM Viral DNA/RNA Extraction Kit (AIT Biotech, Singapore) trên hệ thống tách chiết tự động ABGENIX theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ARN sau khi được tách chiết chuyển sang giai đoạn phân tích bằng kỹ thuật realtime RT-PCR.

2.4. Phát hiện SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật realtime RT-PCR

Phản ứng realtime RT-PCR sử dụng bộ kit LightPower SARS-CoV-2 1st RT-PCR (Vieta Corp) trên hệ thống AriaMx (Agilent) theo khuyến cáo của nhà sản xuất, được tóm tắt như sau: Mỗi phản ứng được bổ sung 5 µl ARN được tách chiết từ mẫu bệnh phẩm. Bộ kit được thiết kế trên vùng gen mục tiêu là gen N của

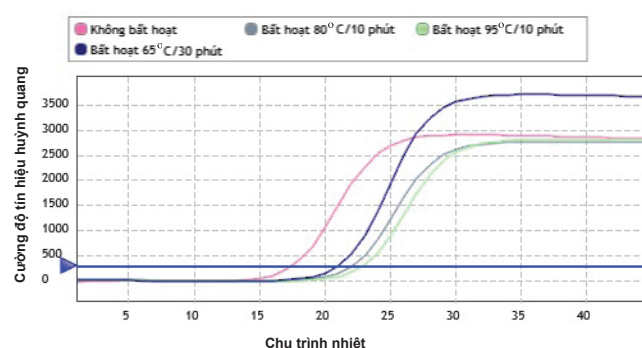
SARS-CoV-2, ARN của SARS-CoV-2 được thu nhập từ mẫu bệnh phẩm sau đó được chuyển thành cDNA rồi nhân bản bằng kỹ thuật realtime PCR. TaqMan probe màu FAM khuếch đại gen đích N của SARS-CoV-2. Chứng nội sinh (HEX) cho phép kiểm soát toàn bộ quá trình từ thu nhận mẫu đến thu nhận kết quả. Chu trình nhiệt gồm: giai đoạn RT ở 50°C trong 10 phút; tiếp theo, 1 chu kỳ ở 95°C trong 5 phút và 45 chu kỳ (95°C-15 giây, 55°C-45 giây).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả phân tích của các mẫu, các nhóm được phân tích tự động bằng phần mềm AriaMx (Agilent). Kết quả CT trung bình của các nhóm được so sánh và kiểm định Wilcoxon sign rank test.

3. Kết quả

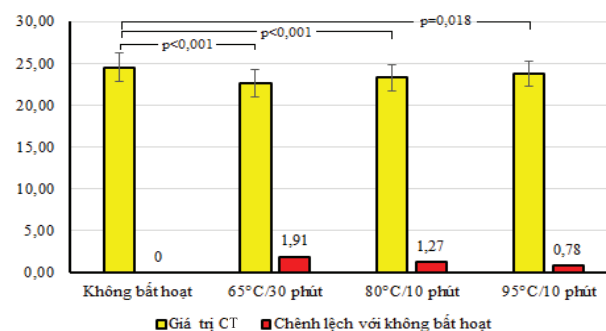
Kết quả chạy phản ứng realtime RT-PCR của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt được minh họa ở hình 1.



Hình 1. Minh họa kết quả realtime RT-PCR của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt.

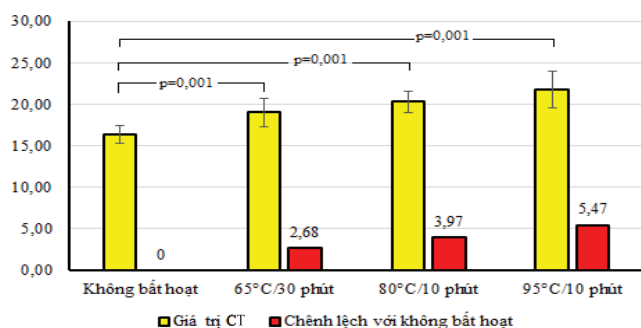
Kết quả hình 1 cho thấy, tín hiệu của nhóm không bất hoạt có tín hiệu lên sớm nhất, tiếp theo là nhóm bất hoạt ở 65°C/30 phút, nhóm 80°C/10 phút và cuối cùng là nhóm 95°C/10 phút.

CT của chứng nội chuẩn ở các mẫu, thuộc các nhóm đều đạt yêu cầu (CT<35). Giá trị CT nhóm bất hoạt bằng nhiệt, ở các nhiệt độ khác nhau đều thấp hơn giá trị CT của nhóm không được bất hoạt, cụ thể: bất hoạt 65°C/30 phút là 1,91, bất hoạt 80°C/10 phút là 1,27 và 0,78 với nhóm bất hoạt 95°C/10 phút với p lần lượt là 0,001, 0,001 và 0,018 (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Giá trị CT (chứng nội chuẩn) của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt.

Tất cả các mẫu thuộc các nhóm không được bất hoạt và được bất hoạt bằng nhiệt đều có kết quả dương tính. Tuy nhiên, giá trị CT của các nhóm bất hoạt bằng nhiệt đều cao hơn ở nhóm không bất hoạt bằng nhiệt. CT của mẫu được bất hoạt ở nhiệt độ cao thì cao hơn CT của mẫu được bất hoạt ở nhiệt độ thấp hơn ($p=0,001$) (biểu đồ 2). CT của nhóm không được bất hoạt là 16,32, thấp hơn CT của các nhóm được bất hoạt bằng nhiệt bất hoạt ở 65°C/30 phút là 2,68; 80°C/10 phút là 3,97; 95°C/10 phút là 5,47 ($p<0,001$).



Biểu đồ 2. Giá trị CT (gen N của SARS-CoV-2) của các nhóm bất hoạt và không bất hoạt.

4. Bàn luận

Vào đầu năm 2019, SARS-CoV-2 đã gây ra đại dịch toàn cầu, lây nhiễm hàng trăm triệu người, gây tử vong hàng triệu người, gây ra vấn đề lớn về y tế, kinh tế và xã hội cho các nước. Kỹ thuật realtime RT-PCR được coi là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán bệnh. CT của gen đích là giá trị giúp chẩn đoán xác định tình trạng nhiễm bệnh. Bên cạnh đó, CT là giá trị quan trọng trong tiêu chuẩn ra viện, khả năng lây nhiễm cho cộng đồng [11]. Vì vậy, tất cả các yếu tố ảnh hưởng đến giá trị CT trong quá trình tiến hành xét nghiệm SARS-CoV-2 đều cần được xem xét, đánh giá ở mỗi phòng thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, giá trị CT ở các nhóm bất hoạt bằng nhiệt đều cao hơn so với nhóm không bất hoạt bằng nhiệt. Thay đổi của CT càng lớn khi nhiệt độ bất hoạt càng lớn, thấp nhất là 2,68 ở 65°C/30 phút và cao nhất là 5,47 95°C/10 phút ($p<0,001$). Hiện tượng này có thể do một số lý do như: Thứ nhất, môi trường bảo quản vi rút đang được tạo ra với mục đích bảo vệ vi rút ở nhiệt độ thấp phục vụ cho việc xét nghiệm, chứ không phải bảo vệ vi rút ở nhiệt độ cao cho bất hoạt vi rút, do đó khi bất hoạt bằng nhiệt, axit nucleic của vi rút có thể bị phân hủy một phần. Thứ hai, bất hoạt vi rút ở nhiệt độ cao có thể gây thoái hóa ARN của SARS-CoV-2 trong thời gian ngắn. Thứ ba, việc đun nóng kéo dài có thể dẫn đến sản sinh chất ức chế phản ứng realtime RT-PCR [3].

Kết quả cho thấy, việc bất hoạt vi rút bằng nhiệt làm tăng giá trị CT của các mẫu dương tính. Điều này có nguy cơ xuất hiện tình trạng âm tính giả ở các mẫu có tải lượng vi rút thấp. Hơn nữa, với CT tiêu chuẩn là 30 được coi rất khó có thể lây nhiễm cho người xung quanh ở giai đoạn thoái lui của bệnh, là tiêu chuẩn ra viện

trong các phác đồ điều trị, quản lý bệnh nhân COVID-19 hiện nay. Ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt có thể làm tăng CT là 27 của các bệnh nhân vẫn còn khả năng lây nhiễm cho cộng đồng lên 30-31 sau khi được bất hoạt, được coi là không lây nhiễm cho cộng đồng.

Trong đại dịch, việc bất hoạt vi rút nhằm đảm bảo an toàn cho cộng đồng và nhân viên y tế là nguyên tắc cơ bản đảm bảo an toàn xét nghiệm. Tuy nhiên, kỹ thuật viên làm xét nghiệm cần hiểu rõ ảnh hưởng của phương pháp này đến giá trị CT của kỹ thuật và kết quả xét nghiệm. Việc này càng cần được quan tâm trong các trường hợp sàng lọc, mẫu gộp và chẩn đoán xác định tránh bỏ sót các trường hợp nhiễm bệnh cũng như giải phóng cách ly và cho ra viện quá sớm.

5. Kết luận

Bất hoạt vi rút bằng nhiệt trước giúp đảm bảo an toàn cho nhân viên và cộng đồng. Tuy nhiên, quá trình này có thể làm tăng giá trị CT của kỹ thuật realtime RT-PCR trong xác định các mẫu dương tính với SARS-CoV-2. Nhiệt độ bất hoạt càng lớn thì giá trị CT tăng lên càng cao. Phương pháp sấy mẫu ở 65°C trong 30 phút là tối ưu nên được áp dụng trong bất hoạt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/worldmalaria-report-2021>, accessed 2 May 2022.
- [2] N.C. Phong, M. Chavchich, H.H. Quang, et al. (2019), "Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins and *Plasmodium vivax* to chloroquine in Phuoc Chien commune, Ninh Thuan province, south-central Vietnam", *Malar. J.*, **18**(1), DOI: 10.1186/s12936-019-2640-2.
- [3] V. Duru, B. Witkowski, D. Ménard (2016), "*Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine: A major challenge for malaria elimination in Cambodia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **95**(6), pp.1228-1238, DOI: 10.4269/ajtmh.16-0234.
- [4] M.R. Ansbro, C.G. Jacob, R. Amato, et al. (2020), "Development of copy number assays for detection and surveillance of piperazine resistance associated *plasmepsin 2/3* copy number variation in *Plasmodium falciparum*", *Malar. J.*, **19**(1), DOI: 10.1186/s12936-020-03249-x.
- [5] C. Nsanabana (2019), "Resistance to artemisinin combination therapies (ACTs): Do not forget the partner drug!", *Trop. Med. Infect. Dis.*, **4**(1), DOI: 10.3390/tropicalmed4010026.
- [6] R. Amato, P. Lim, O. Miotto, et al. (2017), "Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: A genotype-phenotype association study", *Lancet Infect. Dis.*, **17**(2), pp.164-173, DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30409-1.
- [7] H.H. Quang, M. Chavchich, N.T.M. Trinh, et al. (2021), "Multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* parasites in the central highlands of Vietnam jeopardize malaria control and elimination strategies", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **65**(4), DOI: 10.1128/AAC.01639-20.
- [8] R.F. Medrano, C.A. de Oliveira (2014), "Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development", *Mol. Biotechnol.*, **56**(7), pp.599-608, DOI: 10.1007/s12033-014-9734-4.
- [9] N. Boonyalai, K. Kirativanich, C. Thamnurak, et al. (2022), "A single point mutation in the *Plasmodium falciparum* 3'-5' exonuclease does not alter piperazine susceptibility", *Malar. J.*, **21**(1), DOI: 10.1186/s12936-022-04148-z.
- [10] M.G. Robert, F.F. Tsombeng, M. Gendrot, et al. (2019), "Baseline *ex vivo* and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of Dihydroartemisinin-piperazine in Senegal", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**(5), DOI: 10.1128/AAC.02445-18.