



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0002052

(51)⁷ **C12Q 1/68, C12N 15/11**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00436

(22) 31.10.2018

(30) 2-2018-109 11.04.2018 VN

(45) 25.07.2019 376

(43) 25.12.2018 369

(73) 1. ĐỖ NHƯ BÌNH (VN)

Số 27, ngõ 4 Trần Phú, tổ 1, phường Mộ Lao, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

2. TRẦN VIỆT TIẾN (VN)

P2004B, chung cư Newskyline, khu đô thị Văn Quán, phường Văn Quán, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

3. NGUYỄN VĂN BA (VN)

Phòng T2002, chung cư Hancorp plaza, 72T Trần Đăng Ninh, phường Dịch Vọng, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Như Bình (VN), Trần Việt Tiến (VN), Nguyễn Văn Ba (VN), Lê Văn Nam (VN), Lê Quang Hòa (VN), Nguyễn Thành Trung (VN)

(54) **PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ARN CỦA VIRUT VIÊM GAN B TRONG MẪU
HUYẾT THANH CỦA BỆNH NHÂN MẮC BỆNH VIÊM GAN B MẠN TÍNH**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bị nhiễm HBV mạn tính bằng phương pháp realtime RT-PCR một bước bao gồm các bước: a) tách chiết ARN của HBV từ mẫu huyết thanh bệnh nhân; b) tiến hành phản ứng realtime RT-PCR một bước; và c) định lượng ARN của HBV trong huyết thanh dựa vào ngưỡng phát hiện ít nhất ở mức 10^2 phiên bản ARN/ml mẫu với khoảng định lượng 10^3 - 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp định lượng ARN của virus viêm gan B trong mẫu huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mạn tính bằng phương pháp realtime RT-PCR một bước (onestep realtime reverse transcription polymerase chain reaction).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nhiễm virus viêm gan B (Hepatitis B Virus - HBV) là một vấn đề y tế toàn cầu, mặc dù đã có sự phát triển các vaccin ngăn chặn bệnh hiệu quả từ những năm 1980 và việc bổ sung chương trình tiêm chủng mở rộng tại hơn 168 quốc gia, bệnh gan do nhiễm HBV mạn tính vẫn là gánh nặng khổng lồ đối với toàn xã hội.

Người nhiễm HBV mạn tính có nguy cơ tiến triển thành xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan (HepatoCellular Carcinoma - HCC) tăng từ 20-100 lần so với người không bị nhiễm và có khoảng 200.000 - 300.000 người mang các kháng nguyên bề mặt (Hepatitis B surface antigen - HbsAg) tử vong mỗi năm do xơ gan và HCC trên toàn thế giới.

Việt Nam nằm trong khu vực có tỉ lệ lưu hành virus viêm gan B trong cộng đồng vào loại cao nhất trên thế giới. Sự cấp thiết trong việc tìm ra hay thiết lập các công cụ theo dõi, kiểm soát điều trị, cũng như quản lý hạn chế sự lây nhiễm trong cộng đồng là rất rõ ràng trong bối cảnh phổ biến của nhiễm HBV mạn tính và sự phức tạp, khó khăn trong điều trị một cách triệt để các bệnh gan liên quan đến HBV.

Hiện nay, để điều trị bệnh viêm gan mạn tính, có thể sử dụng hai liệu pháp chính là: sử dụng thuốc điều hòa miễn dịch interferon theo đường tiêm và các loại thuốc kháng virus tương tự nucleosit theo đường uống.

Do liệu pháp điều trị bằng interferon có giá thành cao và thường gây ra nhiều phản ứng phụ, nên ở nước ta hiện thường sử dụng các loại thuốc kháng virus đồng đẳng nucleosit như Lamivudin, Adefovir, Telbivudine, Entecavir và Tenofovir. Tuy nhiên, một trong những vấn đề của các loại thuốc này là chỉ ức chế quá trình phiên mã ngược tổng hợp ADN của HBV, nhưng không ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp ARN tiền thể gen (pgARN-pregenomic RNA) và các loại ARN thông tin (mARN-messenger RNA) khác từ ADN mạch vòng kín đồng đẳng (cccADN: covalently closed circular DNA) của HBV trong nhân tế bào. Kết quả là pgARN và các kháng nguyên bề mặt (HbsAg), kháng nguyên lõi (Hepatitis B core antigen - HbcAg) và kháng nguyên e (Hepatitis B envelope antigen - HbeAg) tiếp tục được tạo ra. Do đó, khi ngừng điều trị liệu pháp sử dụng thuốc tương tự nucleosit quá sớm (khi quá trình phiên mã tạo pgARN và mARN khác vẫn diễn ra) sẽ làm bùng phát bệnh, tạo ra nguy cơ xuất hiện các biến chứng có khả năng kháng thuốc do enzym phiên mã ngược không có hoạt tính sửa chữa. Bản thân quá trình phiên mã tạo mARN mã hóa polymeraza của HBV từ cccADN cũng tồn tại nguy cơ tạo ra các thể đột biến kháng thuốc dưới áp lực chọn lọc của thuốc kháng virus.

Do đó, nhiều nghiên cứu gần đây đã chỉ ra sự cần thiết phải định lượng ARN của HBV trong huyết thanh của bệnh nhân bên cạnh định lượng ADN của HBV do ARN của HBV bùng phát trong huyết thanh là chỉ thị cho phép dự đoán sớm khả năng xuất hiện tính kháng thuốc ở HBV; ARN của HBV giảm dần theo thời gian là chỉ thị cho phép đánh giá hiệu quả của liệu pháp điều trị đang sử dụng; và ARN của HBV giảm dưới ngưỡng là chỉ thị cho phép dự đoán sớm khả năng chuyển đảo huyết thanh, cũng như dừng điều trị ở người mắc bệnh viêm gan B mạn tính.

Tuy nhiên, cho đến nay ở Việt Nam vẫn chưa phát triển được phương pháp định lượng ARN của HBV trong huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mạn tính và đặc biệt là bệnh nhân đang sử dụng thuốc kháng virus tương tự

nucleosit nhằm theo dõi, kiểm soát việc điều trị và hạn chế sự lây nhiễm HBV trong cộng đồng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để khắc phục nhược điểm trên, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mạn tính bằng phương pháp realtime RT-PCR một bước, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) tách chiết ARN của HBV từ mẫu huyết thanh của bệnh nhân đã được xử lý bằng enzym DNase trong 30 phút nhằm loại bỏ hoàn toàn ADN;

b) tiến hành phản ứng realtime RT-PCR một bước đối với khuôn mẫu là ARN được tách chiết thu được từ bước a) sử dụng bộ kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen) với các thành phần phản ứng cụ thể như sau:

Thành phần phản ứng	Thể tích (μ l)
ARN được tách chiết thu được từ bước a)	10
Bộ kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen)	
Enzym phiên mã ngược MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (invitrogen)	1
Platinum™ Taq ADN Polymeraza (invitrogen)	1
2X Hỗn hợp phản ứng (bao gồm 0,4 mM các dNTP và 6 mM MgSO ₄)	25
Môi xuôi	1
Môi ngược	1
Mẫu dò TaqMan	1
H ₂ O xử lý với diethyl pyrocarbonat (DEPC)	10
Tổng	50

trong đó, bộ môi xuôi, môi ngược và mẫu dò TaqMan như được thể hiện ở dưới đây:

Mẫu dò Taqman	Liu-HB-PR-1	TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT
	Liu-HB-PR-1	TATCGTTGGATGTGTCTGCGGCGT
Mồi xuôi	Liu-HB-F1	ACTCACCAACCTCTTGTCT
	Liu-HB-F2	ACTCACCAACCTCCTGTCT
	Liu-HB-F3	ACTCACCAACCTGTTGTCT
Mồi ngược	Liu-HB-R1	GACAAACGGGCAACATACCT
	Liu-HB-R2	GACACACGGGCAACATACCT

Chu trình nhiệt của phản ứng này gồm 2 giai đoạn

Các giai đoạn	Chu trình nhiệt
Phiên mã ngược ARN → ADN	$T^{\circ} = 57^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ phút
Realtime PCR	$Ta^{\circ} = 58^{\circ}\text{C}$, $t = 60$ giây, số chu kỳ tối đa 42

trong đó:

Giai đoạn phiên mã ngược: T° là nhiệt độ phiên mã ngược, t là thời gian phiên mã ngược.

Giai đoạn realtime PCR: Ta° là nhiệt độ gắn mồi, kéo dài cho phản ứng PCR; t là thời gian gắn mồi, kéo dài cho phản ứng PCR; và

c) định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh dựa vào ngưỡng phát hiện ít nhất ở mức 10^2 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh với khoảng định lượng 10^3 - 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Thể hiện kết quả xác định khoảng định lượng của phản ứng realtime RT-PCR một bước.

Hình 2: Thể hiện đường chuẩn ứng với khoảng định lượng từ 10^3 - 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh.

Hình 3: Thể hiện kết quả xác định tải lượng ARN của HBV bằng phản ứng realtime RT-PCR một bước ở bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phương pháp định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mạn tính bằng phương pháp realtime RT-PCR một bước theo giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết như sau:

a) tách chiết ARN của HBV từ mẫu huyết thanh bệnh nhân:

Việc tách chiết ARN của HBV từ mẫu huyết thanh bệnh nhân mắc viêm gan virus B mạn tính được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit QIAamp ARN Blood Mini (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dịch thu được sau khi tách chiết bằng bộ kit nêu trên được đem ủ với enzym DNase trong thời gian 30 phút nhằm loại bỏ hết ADN ra khỏi mẫu. Tiếp tục tinh sạch ARN bằng QIAGEN RNeasy Mini Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, ARN trong các mẫu tinh sạch được định lượng bằng real-time RT-PCR một bước.

b) tiến hành phản ứng realtime RT-PCR một bước:

Phản ứng realtime RT-PCR một bước với khuôn mẫu ARN được tách chiết thu được từ bước a) được thiết lập trên cơ sở bộ kit SuperScript III Platium One-Step qRT-PCR System (Invitrogen) với các thành phần phản ứng cụ thể như sau:

Thành phần phản ứng	Thể tích (μl)
ARN được tách chiết thu được từ bước a)	10
Bộ kit SuperScript III Platium One-Step qRT-PCR System (Invitrogen)	
Enzym phiên mã ngược MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (invitrogen)	1
Platinum™ <i>Taq</i> ADN Polymeraza (invitrogen)	1
2X Hỗn hợp phản ứng (bao gồm 0,4 mM các dNTP và 6 mM MgSO ₄)	25
Mồi xuôi	1
Mồi ngược	1
Mẫu dò TaqMan	1
H ₂ O xử lý với diethyl pyrocarbonat (DEPC)	10
Tổng	50

Trong đó bộ mỗi được sử dụng bao gồm các mỗi xuôi, mỗi ngược, mẫu dò TaqMan đã được nghiên cứu và công bố bởi tác giả Ying Liu và cs (2006), được thể hiện như sau:

Mẫu dò Taqman	Liu-HB-PR-1	TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT
	Liu-HB-PR-1	TATCGTTGGATGTGTCTGCGGCGT
Mỗi xuôi	Liu-HB-F1	ACTCACCAACCTCTTGTCCT
	Liu-HB-F2	ACTCACCAACCTCCTGTCCT
	Liu-HB-F3	ACTCACCAACCTGTTGTCCT
Mỗi ngược	Liu-HB-R1	GACAAACGGGCAACATACCT
	Liu-HB-R2	GACACACGGGCAACATACCT

Quy trình realtime RT-PCR một bước được thực hiện gồm hai giai đoạn tiến hành đồng thời đã được tối ưu hóa chu trình nhiệt bao gồm:

Các giai đoạn	Chu trình nhiệt
Phiên mã ngược ARN $\rightarrow$ ADN	$T^{\circ} = 57^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ phút
Realtime PCR	$Ta^{\circ} = 58^{\circ}\text{C}$, $t = 60$ giây, số chu kỳ tối đa 42

trong đó:

Giai đoạn phiên mã ngược: T° là nhiệt độ phiên mã ngược, t là thời gian phiên mã ngược.

Giai đoạn realtime PCR: Ta° là nhiệt độ gắn mỗi, kéo dài cho phản ứng PCR; t là thời gian gắn mỗi, kéo dài cho phản ứng PCR.

c) định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh dựa vào ngưỡng phát hiện và khoảng định lượng chuẩn của phản ứng realtime RT-PCR một bước.

Ngưỡng phát hiện và khoảng định lượng chuẩn của quy trình được tính toán dựa vào thử nghiệm sử dụng mẫu ARN tiền thể gen (pgARN) làm chứng dương và thử nghiệm nhiễm chủ động pgARN vào mẫu huyết thanh âm tính với HBV.

pgARN được phiên mã *in vitro* từ trình tự gen đích của HBV, lựa chọn từ 8 mẫu huyết thanh của bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định là nhiễm HBV mạn

tính, nhưng chưa được điều trị thuốc kháng virus đặc hiệu. Trình tự của pgARN được sử dụng làm chứng dương:

UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACAAACGGGCAACA
ACCUUGAUAGUCCAGAAGAACCAACAAGAAGAUGAGGCAUAGCAGC
AGGAUGCAGAGGAAGAUGAUAAAACGCCGCAGACACAUCAGCGAU
AACCAGGACAAAUUGGAGGACAAGAGGUUGGUGAGU

Mẫu pgARN được pha loãng đến nồng độ từ 10^9 đến 10^{-1} phiên bản ARN/ μ l và tiến hành thực hiện phản ứng realtime RT-PCR một bước với các thành phần và thông số đã được tối ưu hóa như nêu trên. Kết quả được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1: Kết quả xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng realtime RT-PCR

Số phiên bản pgARN/ μ l	Chu kỳ ngưỡng
10^{-1}	>45
10^0	>45
10^1	$34,00 \pm 0,51$
10^2	$31,50 \pm 0,21$
10^3	$27,70 \pm 0,02$
10^4	$24,07 \pm 0,26$
10^5	$20,07 \pm 0,18$
10^6	$16,22 \pm 0,05$
10^7	$12,44 \pm 0,15$
10^8	$8,02 \pm 1,24$
10^9	$5,42 \pm 0,05$

Kết quả thu được từ bảng 1 và hình 1 cho thấy độ nhạy của phản ứng realtime RT-PCR được thiết kế là 10^1 phiên bản/ μ l (tương ứng với 80 phiên bản ARN/ml) và khoảng định lượng là 10^1 đến 10^9 phiên bản/ μ l.

Nhiễm chủ động pgARN thu được ở trên vào mẫu huyết thanh âm tính với HBV, với liều lượng 10^2 ; 10^3 ; 10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh. Tiến hành tách chiết ARN từ 1 ml mẫu huyết thanh như nêu trong bước a),

rửa giải trong 50 μ l, sau đó chạy real-time RT-PCR một bước với các thông số đã được tối ưu hóa như đã nêu ở trên. Các mẫu được tách chiết lặp lại 2 lần, mỗi mẫu ARN được chạy real-time RT-PCR 2 lần với thành phần phản ứng trên cơ sở sử dụng bộ kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen), khuôn mẫu là ARN được tách chiết từ mẫu huyết thanh được nhiễm chủ động pgARN với thể tích 10 μ l. Kết quả được thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2. Ngưỡng phát hiện với mẫu huyết thanh nhiễm chủ động pgARN.

Mẫu	Chu kỳ ngưỡng
10^7 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh	$19,45 \pm 0,34$
10^6 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh	$24,91 \pm 0,31$
10^5 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh	$27,77 \pm 0,34$
10^4 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh	$31,16 \pm 0,38$
10^3 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh	$32,46 \pm 0,40$
10^2 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh	$33,40 \pm 0,51$

Kết quả phân tích trên bảng 2 cho thấy ngưỡng phát hiện của quy trình đạt ở mức 10^2 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh và khoảng định lượng của phương pháp là từ 10^3 - 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh để đảm bảo độ tuyến tính cao của khoảng định lượng (hệ số hồi quy $R^2=0,9556$) (xem hình 2).

Từ kết quả của hai thử nghiệm, các tác giả của giải pháp đã lựa chọn ngưỡng phát hiện chuẩn ít nhất ở mức 10^2 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh và khoảng định lượng 10^3 - 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh khi tiến hành quy trình real-time RT-PCR một bước nhằm định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mạn tính.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Tách chiết ARN của HBV trong mẫu huyết thanh của bệnh nhân bị mắc bệnh viêm gan virus B mạn tính

1ml mẫu huyết thanh bệnh nhân được sử dụng để phân lập và tách chiết ARN của virus HBV sử dụng Kit QIAamp ARN Blood Mini (Qiagen) thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lấy 200 µl dịch thu được sau khi tách chiết nêu trên được đem ủ với enzyme DNase trong thời gian 30 phút nhằm loại bỏ ADN trong dịch thu được.

Tiếp tục tinh sạch ARN bằng QIAGEN RNeasy Mini Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất, rửa giải trong 50 µl. Sau đó, ARN trong các mẫu tinh sạch được định lượng bằng real-time RT-PCR một bước.

Ví dụ 2: Định lượng ARN bằng phản ứng realtime RT-PCR một bước

ARN được tách chiết như nêu trong ví dụ 1 được định lượng bằng phản ứng realtime RT-PCR một bước bằng bộ kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen) như đã nêu ở trên với thành phần phản ứng bao gồm:

Tên thành phần	Thể tích (µl)
ARN được tách chiết thu được từ ví dụ 1	10
Bộ kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen)	
Enzym phiên mã ngược MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (invitrogen)	1
Platinum™ Taq ADN Polymeraza (invitrogen)	1
2X Hỗn hợp phản ứng (bao gồm 0,4 mM các dNTP và 6 mM MgSO ₄)	25
Môi xuôi	1
Môi ngược	1
Mẫu dò TaqMan	1
H ₂ O xử lý với diethyl pyrocarbonat (DEPC)	10
Tổng	50

Trong đó bộ môi được sử dụng bao gồm:

Mẫu dò Taqman	Liu-HB-PR-1	TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT
	Liu-HB-PR-1	TATCGTTGGATGTGTCTGCGGCGT
Môi xuôi	Liu-HB-F1	ACTCACCAACCTCTTGTCCT
	Liu-HB-F2	ACTCACCAACCTCCTGTCCT

	Liu-HB-F3	ACTCACCAACCTGTTGTCCT
Mồi ngược	Liu-HB-R1	GACAAACGGGCAACATACCT
	Liu-HB-R2	GACACACGGGCAACATACCT

Chu trình nhiệt bao gồm:

Các giai đoạn	Chu trình nhiệt
Phiên mã ngược ARN → ADN	$T^{\circ} = 57^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ phút
Realtime PCR	$Ta^{\circ} = 58^{\circ}\text{C}$, $t = 60$ giây, số chu kỳ tối đa 42

trong đó:

Giai đoạn phiên mã ngược: T° là nhiệt độ phiên mã ngược, t là thời gian phiên mã ngược.

Giai đoạn realtime PCR: Ta° là nhiệt độ gắn mồi, kéo dài cho phản ứng PCR; t là thời gian gắn mồi, kéo dài cho phản ứng PCR.

Sau khi chạy phản ứng realtime RT-PCR một bước, tiến hành định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh dựa vào ngưỡng phát hiện ít nhất ở mức 10^2 phiên bản ARN/ml mẫu với khoảng định lượng 10^3 - 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu.

Ví dụ 3: Ứng dụng quy trình định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh bệnh nhân mắc viêm gan B mạn tính

Để đánh giá khả năng ứng dụng của quy trình theo giải pháp hữu ích, 24 mẫu huyết thanh của các bệnh nhân mắc viêm gan B mạn tính được phân tích bằng phương pháp nêu trong ví dụ 2. Trong số 24 mẫu này, có 10 bệnh nhân được điều trị từ 4 đến 6 tháng bằng thuốc kháng virus đồng đẳng nucleosit đặc hiệu và 14 bệnh nhân chưa được điều trị.

Bảng 3. Kết quả định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh bệnh nhân mắc viêm gan B mạn tính

Bệnh nhân	Mean $C_T \pm SD$	HBV-RNA phát hiện được (phiên bản/ml)
1	$27,43 \pm 0,04$	$9,6 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^2$
2	<LOQ	<LOQ
3	>45	0

4	$33,09 \pm 0,24$	$3,3 \times 10^2 \pm 4,7 \times 10^1$
5	$24,86 \pm 0,31$	$4,5 \times 10^4 \pm 8,3 \times 10^3$
6	$35,05 \pm 1,79$	$1,3 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^2$
7	$23,36 \pm 0,13$	$1,0 \times 10^5 \pm 8,5 \times 10^3$
8	>45	0
9	<LOQ	<LOQ
10	$30,52 \pm 0,02$	$1,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^1$
11	>45	0
12	$23,77 \pm 0,10$	$8,5 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^3$
13	$24,18 \pm 0,11$	$6,7 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^3$
14	$35,32 \pm 1,36$	$1,0 \times 10^2 \pm 7,5 \times 10^1$
15	<LOQ	<LOQ
16	$35,85 \pm 0,04$	$6,4 \times 10^1 \pm 0,1 \times 10^1$
17	$25,20 \pm 0,15$	$3,7 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^3$
18	<LOQ	<LOQ
19	<LOQ	<LOQ
20	<LOQ	<LOQ
21	>45	0
22	$33,65 \pm 0,35$	$2,4 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$
23	$22,57 \pm 0,21$	$1,8 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4$
24	<LOQ	<LOQ

<LOQ: Below limit of quantification (dưới ngưỡng định lượng)

Mean Ct (threshold cycle) là số chu kỳ ngưỡng trung bình

SD (Standard Deviation) là độ lệch chuẩn

Kết quả phân tích ở bảng 3 cho thấy quy trình theo giải pháp hữu ích phát hiện được 20/24 mẫu dương tính với HBV. Tải lượng ARN của HBV trong 20 mẫu này từ mức dưới ngưỡng định lượng đến trên 10^5 phiên bản/ml, trong đó có 7 mẫu có tải lượng ARN dưới ngưỡng phát hiện được (hình 3). Các mẫu có tải lượng ARN dưới ngưỡng phát hiện được nằm trong số các bệnh nhân đang được điều trị ở giai đoạn 4-6 tháng, là cơ sở cho phép chỉ thị dự đoán sớm khả năng dừng điều trị ở người bệnh. Bên cạnh đó, các dữ liệu về tải lượng ARN của các bệnh nhân còn lại cũng cung cấp nguồn thông tin quan trọng trong việc đánh giá dự đoán sớm khả năng xuất hiện tính kháng thuốc ở HBV, cũng như hiệu quả của liệu pháp điều trị đang sử dụng và định hướng điều trị bệnh viêm gan B tiếp theo.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Phương pháp định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh của bệnh nhân bị mắc bệnh viêm gan B mạn tính theo giải pháp hữu ích được thực hiện theo cách đơn giản chỉ bằng phương pháp realtime RT-PCR một bước với các thông số được tối ưu hóa. Việc định lượng ARN này ở bệnh nhân mắc viêm gan virus B mạn tính, đặc biệt là các bệnh nhân đang được điều trị bằng thuốc kháng virus đồng đẳng nucleosit đặc hiệu được xem là cơ sở cho phép dự đoán sớm khả năng xuất hiện tính kháng thuốc ở HBV, đánh giá hiệu quả của liệu pháp điều trị đang sử dụng, cũng như khả năng dừng điều trị ở người bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mạn tính bằng phương pháp realtime RT-PCR một bước, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) tách chiết ARN của HBV từ mẫu huyết thanh của bệnh nhân đã được xử lý bằng enzym DNase trong 30 phút nhằm loại bỏ hoàn toàn ADN;

b) tiến hành phản ứng realtime RT-PCR một bước với các thành phần phản ứng cụ thể gồm:

Tên hóa chất	Thể tích (μl)
ARN được tách chiết thu được từ bước a)	10
Enzym phiên mã ngược MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (invitrogen)	1
Platinum™ Taq ADN Polymeraza (invitrogen)	1
2X Hỗn hợp phản ứng (bao gồm 0,4 mM các dNTP và 6 mM MgSO ₄)	25
Môi xuôi	1
Môi ngược	1
Mẫu dò TaqMan	1
H ₂ O xử lý với diethyl pyrocarbonat (DEPC)	10
Tổng	50

* Bộ môi (môi xuôi, môi ngược, mẫu dò TaqMan)

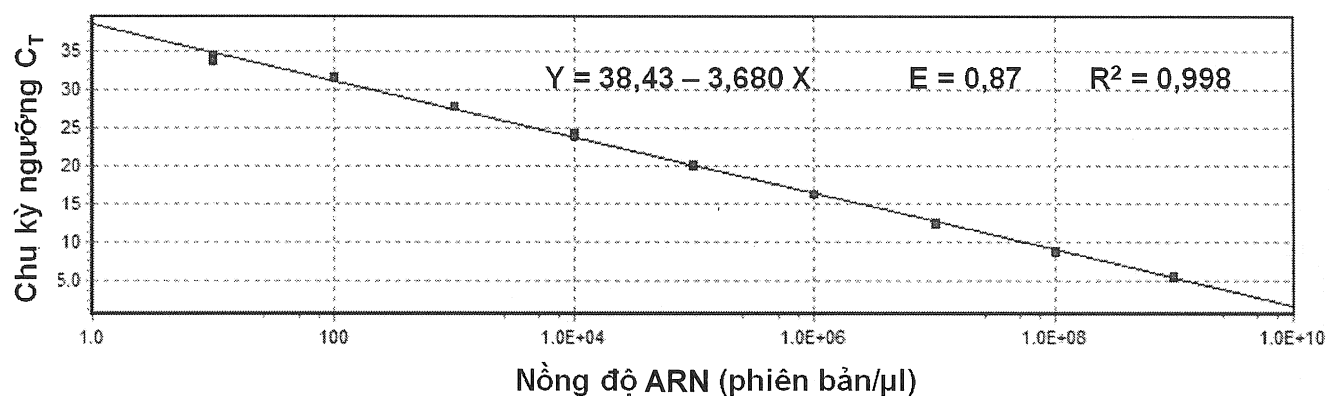
Mẫu dò Taqman	Liu-HB-PR-1	TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT
	Liu-HB-PR-1	TATCGTTGGATGTGTCTGCGGCGT
Môi xuôi	Liu-HB-F1	ACTCACCAACCTCTTGTCCT
	Liu-HB-F2	ACTCACCAACCTCCTGTCCT
	Liu-HB-F3	ACTCACCAACCTGTTGTCCT
Môi ngược	Liu-HB-R1	GACAAACGGGCAACATACCT
	Liu-HB-R2	GACACACGGGCAACATACCT

+ Chu trình nhiệt: 2 giai đoạn

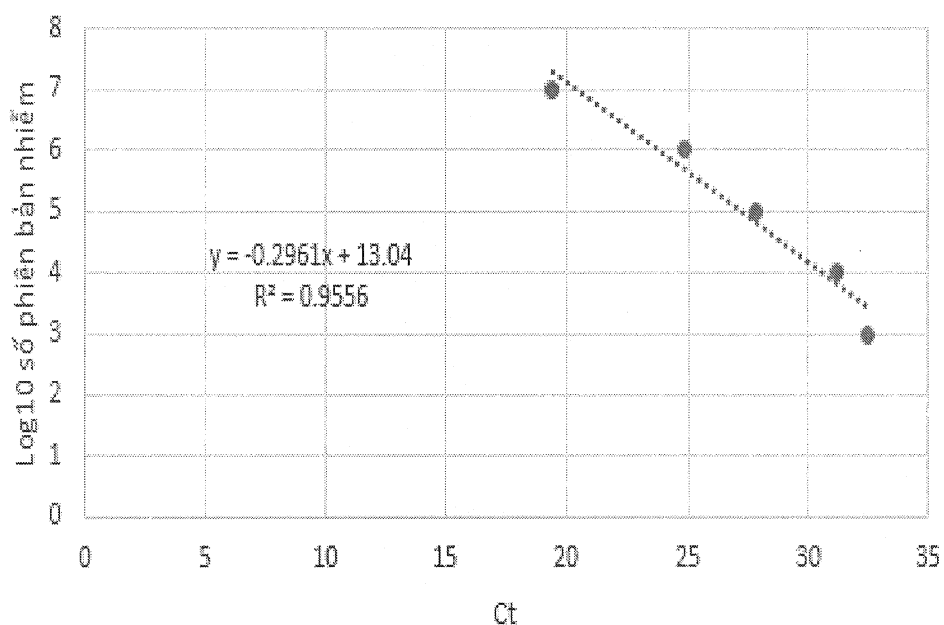
Các giai đoạn	Chu trình nhiệt
Phiên mã ngược ARN → ADN	$T^{\circ} = 57^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ phút
Realtime PCR	$Ta^{\circ} = 58^{\circ}\text{C}$, $t = 60$ giây, số chu kỳ tối đa 42

trong đó đối với phản ứng phiên mã ngược: T° là nhiệt độ phiên mã ngược, t là thời gian phiên mã ngược; và đối với phản ứng realtime PCR: Ta° là nhiệt độ gắn mẫu, kéo dài cho phản ứng PCR; t là thời gian gắn mẫu, kéo dài cho phản ứng PCR; và

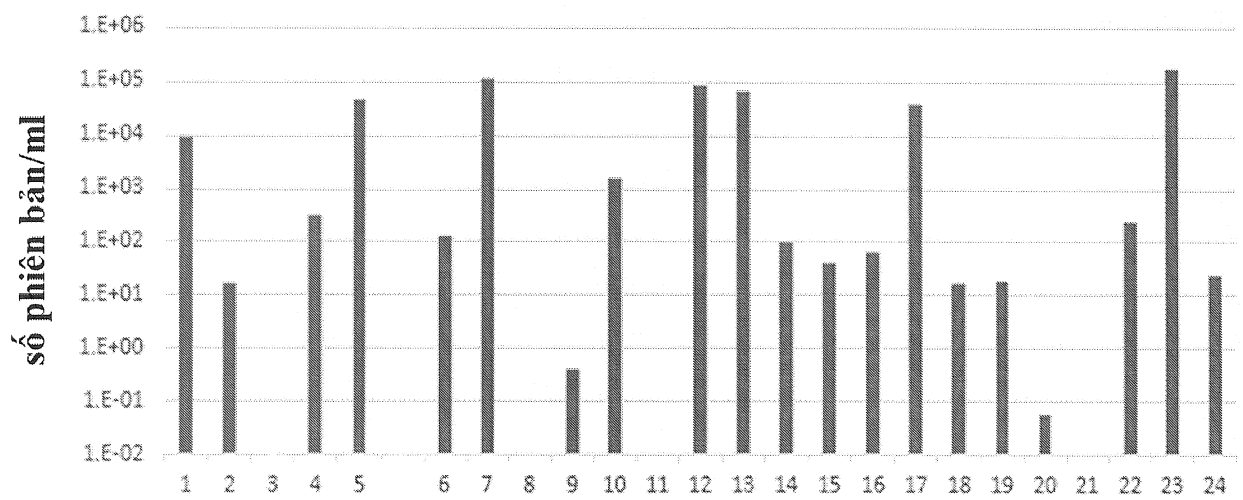
c) định lượng ARN của HBV trong mẫu huyết thanh dựa vào ngưỡng phát hiện ít nhất ở mức 10^2 phiên bản ARN/ml mẫu với khoảng định lượng 10^3 - 10^7 phiên bản ARN/ml mẫu.



Hình 1: Kết quả xác định khoảng định lượng của phản ứng real-time RT-PCR một bước



Hình 2. Đường chuẩn ứng với khoảng định lượng từ $10^3 - 10^7$ phiên bản ARN/ml mẫu huyết thanh



Hình 3. Tải lượng ARN của HBV trong các bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B.