



(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)



2-0002344

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00466

(22) 30/12/2016

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/07/2018 364A

(73) Học viện Quân y (VN)

Số 160 Phùng Hưng, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thái Sơn (VN); Bùi Tiến Sỹ (VN); Hoàng Xuân Sứ (VN); Đinh Thị Thu Hằng (VN); Nguyễn Văn An (VN); Hồ Hữu Thọ (VN).

(54) KIT REALTIME RT-PCR ĐA MỖI ĐỂ CHẨN ĐOÁN NHANH VIRUT EBOLA ZAIRE

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến kit realtime RT-PCR đa mẫu để chẩn đoán nhanh virus Ebola Zaire, kit có chứa hai cặp mồi cùng hai mẫu dò tương ứng dùng để khuếch đại đồng thời hai gen đích bao gồm một gen NP của virus Ebola Zaire và một gen rep của chủng nội. Kit realtime RT-PCR đa mẫu theo giải pháp hữu ích khác biệt ở chỗ chứa các cặp mồi và đoạn dò đặc hiệu cho phép chẩn đoán nhanh virus Ebola Zaire với một bước thực hiện có độ nhạy đạt 1414 FFU/ml bệnh phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học ứng dụng, cụ thể là đề cập đến kit realtime RT-PCR đa môi chứa chứng nội plasmit tái tổ hợp (internal control - IC) để chẩn đoán nhanh virus Ebola Zaire bằng kỹ thuật realtime PCR.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Dịch bệnh do virus Ebola bùng phát ở Tây Phi năm 2013 đã khiến 27.871 ca lây nhiễm và có 11.281 ca tử vong. Trong 5 loài gây bệnh bao gồm virus Ebola Zaire, virus Ebola Sudan, virus Ebola Bundibugy, virus Ebola Reston và virus Ebola Cote d'Ivoire, thì virus Ebola Zaire là loài nguy hiểm nhất bởi là nguyên nhân gây dịch chủ yếu và có tỷ lệ tử vong cao nhất, từ 57-90% ở người. Do đó, việc chẩn đoán nhanh, chính xác virus Ebola Zaire gây dịch là một yếu tố giúp ngăn chặn dịch hiệu quả. Diễn biến phức tạp của dịch bệnh đã khẳng định tầm quan trọng của các công cụ chẩn đoán nhanh, chính xác tác nhân này cũng như những thách thức trong phát triển các xét nghiệm chẩn đoán tối ưu.

Trên thực tế, việc phân lập các virus nguy hiểm như virus Ebola cần trang bị phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 4. Tuy nhiên, phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 4 chỉ có ở một số ít các nước phát triển như Hoa Kỳ, Canada, Pháp, Anh, Đức, Nam Phi, Thụy Điển, Nga, Nhật và gần đây là Trung Quốc. Trong khi đó với khuyến cáo của Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ thì chúng ta hoàn toàn có thể xử lý mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus Ebola để phục vụ cho chẩn đoán sinh học phân tử như kỹ thuật realtime PCR ở phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 2.

Đã có một số kit chẩn đoán được phát triển và cấp chứng chỉ IVD (*in vitro* diagnostics) để xét nghiệm virus Ebola ở người, ví dụ kit RT - PCR để chẩn đoán virus Ebola do Viện nghiên cứu các bệnh truyền nhiễm của Bộ Quốc phòng Hoa Kỳ nghiên cứu và phát triển. Tại châu Âu, công ty Altona Diagnostics ở Hamburg, Đức cũng phát triển kit realtime RT- PCR cho phát hiện virus Ebola, tuy nhiên kit này chỉ được khuyến cáo sử dụng cho nghiên cứu. Gần đây nhất, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ vừa chấp thuận cho kit được phát triển bởi công ty BioMérieux của

Pháp chẩn đoán virus Ebola (Wang G. et al., 2015, *The evaluation of 7 commercial real-time PCR kits for Zaire ebolavirus using virus-like particle-encapsulated EBOV RNA*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Vol. 83, No. 4, p. 355- 358; Cherpillod P. et al., 2016, *Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: A comparative study of 11 different procedures*, Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, Vol. 77, p. 9-14). Tuy nhiên, các kit này đòi hỏi đi kèm với trang thiết bị chuyên biệt với chi phí rất cao.

Do đó, để khắc phục tình trạng thiếu phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 4, việc nghiên cứu chế tạo kit realtime RT-PCR để phát hiện nhanh và chính xác virus Ebola Zaire là vô cùng quan trọng, giúp chẩn đoán nhanh, chẩn đoán sớm các ca nhiễm bệnh với chi phí thấp, có khả năng phát triển và thực hiện ngay cả trong các phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 2 để có các biện pháp phòng dịch và khống chế dịch lan rộng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể giải pháp hữu ích đề xuất kit realtime RT-PCR đa môi để chẩn đoán nhanh virus Ebola Zaire, trong đó kit này bao gồm:

- a) các đoạn môi, mẫu dò có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại tương ứng các đoạn gen đích là gen *NP* đặc trưng của virus Ebola Zaire và gen *rep* của chứng nội;
- b) thành phần để thực hiện phản ứng realtime RT-PCR bao gồm dung dịch đệm, các dNTP, enzym phiên mã ngược, enzym ADN polymeraza và $MgCl_2$; và
- c) chứng nội có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8.

Chứng nội là plasmit tái tổ hợp chứa đoạn gen *rep* của virus MS2 - là virus có hệ gen ARN mạch đơn thuộc họ *Leviviridae* gây nhiễm cho vi khuẩn *E. coli*, nhưng không gây bệnh cho người và động vật. Bằng cách đó, gen đích *NP* của virus Ebola Zaire được khuếch đại đồng thời trong phản ứng realtime RT-PCR đa môi nhờ cặp môi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1 và SEQ ID No. 2, và mẫu dò có trình tự nêu trong SEQ ID No. 3 tạo sản phẩm có kích thước 103 bp và có trình tự nêu trong SEQ

ID No. 7. Gen đích chứng nội được khuếch đại đồng thời trong phản ứng realtime RT-PCR đa mồi nhờ cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 4 và SEQ ID No. 5, và mẫu dò có trình tự nêu trong SEQ ID No. 6 tạo sản phẩm có kích thước 64 bp và có trình tự nêu trong SEQ ID No. 8.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh tín hiệu huỳnh quang khuếch đại của sản phẩm realtime RT-PCR đa mồi. Trong đó S1 là mẫu bệnh phẩm dương tính với virus Ebola Zaire; S2 là mẫu bệnh phẩm âm tính với virus Ebola Zaire; ĐC(+) và ĐC(-) là đối chứng dương và đối chứng âm; IC là mẫu chứng nội.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Gen *NP* (nucleoprotein) là gen đặc trưng của virus Ebola Zaire mã hóa cho protein nucleoprotein, quyết định đến yếu tố độc lực, thường được sử dụng trong chẩn đoán virus Ebola Zaire. Gen này có chiều dài 2971 bazơ và có số truy cập trên ngân hàng gen là NC_002549.1.

Gen *rep* (RNA replicase beta chain) là gen đặc trưng trên hệ gen virus MS2 gây nhiễm vi khuẩn, mã hóa cho enzym sao chép dựa trên ARN, đây là một trong bốn protein của virus MS2. Gen này có chiều dài 1638 bazơ và có số truy cập trên ngân hàng gen là NC_001417.

Giải pháp hữu ích đề xuất kit realtime RT-PCR đa mồi để chẩn đoán nhanh virus Ebola Zaire, trong đó kit này bao gồm:

a) các đoạn mồi, mẫu dò có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại tương ứng các gen đích là gen *NP* của virus Ebola Zaire và gen *rep* của chứng nội;

b) thành phần để thực hiện phản ứng RT-PCR bao gồm dung dịch đệm, các dNTP, enzym phiên mã ngược, enzym ADN polymeraza và $MgCl_2$; và

c) chứng nội có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 8.

Các cặp mồi và các mẫu dò tương ứng dùng để khuếch đại các gen đích *NP* và *rep*, được thiết kế dựa trên trình tự của các gen đích này đã được công bố trên ngân hàng gen với các mã số tương ứng là NP GeneID: NC_002549.1, rep GeneID: NC_001417.

Có nhiều phương pháp thiết kế cặp mồi và mẫu dò và có thể tìm được trong các tài liệu chuyên ngành. Theo giải pháp, các tác giả đã lựa chọn những vùng có độ bảo thủ cao nhất trong các gen nêu trên để thiết kế mồi và mẫu dò. Điểm khác biệt của giải pháp là tạo ra các đoạn mồi cùng với các mẫu dò thích hợp, đặc hiệu cho phản ứng realtime RT-PCR đa mồi để có thể phát hiện chính xác virus Ebola Zaire với độ nhạy cao và không khuếch đại chéo với 4 loài virus Ebola còn lại (Hình 1). Hai cặp mồi này cùng với các mẫu dò tương ứng phải không được bắt cặp chéo lẫn nhau cũng như đảm bảo không cạnh tranh, ức chế lẫn nhau. Theo giải pháp hữu ích, các tác giả đã lựa chọn thiết kế mẫu dò Taqman cho kit realtime RT-PCR để xác định virus Ebola Zaire. Mẫu dò Taqman có ưu điểm là dễ thiết kế, có thể sử dụng trong phản ứng realtime PCR đa mồi, phù hợp với nhiều hệ thống máy realtime PCR khác nhau.

Mẫu dò Taqman gồm ba phần chính gồm một trình tự nucleotit bổ sung với gen đích đặc trưng, một đầu phát màu huỳnh quang (reporter) và một đầu ức chế màu huỳnh quang (quencher). Mẫu dò Taqman thường có chiều dài từ 22-26 nucleotit, có thể lên đến 30 nucleotit, đảm bảo có thể lựa chọn được một nhiệt độ nóng chảy tối ưu mà không làm tăng khoảng cách giữa chất phát quang và chất ức chế. Do đó, ở trạng thái bình thường tín hiệu huỳnh quang do đầu phát huỳnh quang phát ra sẽ bị hấp thu bởi đầu ức chế huỳnh quang và máy không thu được tín hiệu huỳnh quang. Vị trí lý tưởng của mẫu dò là chỉ cách mồi xuôi hoặc mồi ngược từ 1-5 nucleotit, nhưng không được chồng lên các mồi. Nhiệt độ nóng chảy của mẫu dò tốt nhất là cao hơn nhiệt độ nóng chảy của các mồi từ 6-8°C. Nếu nhiệt độ nóng chảy của mẫu dò quá thấp thì ở nhiệt độ gắn mồi tỷ lệ mẫu dò gắn với trình tự đích thấp làm giảm hiệu quả của phản ứng realtime PCR. Nhiệt độ gắn mồi trong phản ứng realtime nên được thiết lập không thấp hơn 5°C so với nhiệt độ nóng chảy của mồi có nhiệt độ nóng chảy thấp hơn. Số lượng GC trong mẫu dò khoảng 35-65% và tránh Guanine ở đầu 5' để ngăn chặn sự phát tín hiệu huỳnh quang đầu 5'.

Theo đó, các tác giả đã tạo ra các cặp mồi có chiều dài từ 16 - 22 bp và tỷ lệ phần trăm của nucleotit G và C khá tương đồng với nhau để đảm bảo nhiệt độ bắt cặp của các cặp mồi này với gen đích cũng tương đương nhau, nhằm khuếch đại cùng lúc nhiều gen đích trong cùng một điều kiện về nhiệt độ và các thành phần của phản ứng realtime PCR đa mồi. Cụ thể, các tác giả đã thiết kế được cặp mồi và mẫu dò có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 3 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 103 bp của gen đích *NP*, cặp mồi và mẫu dò có trình tự nêu trong SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 64 bp của gen đích *rep* chứng nội có trình tự nêu trong SEQ ID No. 8. Hai mẫu dò được thiết kế theo chiến lược gắn đầu 5' phát màu huỳnh quang khác nhau là FAM và CY5 do được hấp thụ ở các bước sóng khác nhau là 530 nm và 670 nm, đảm bảo dễ dàng phân biệt tín hiệu huỳnh quang của các gen đích khác nhau cũng như không bị ảnh hưởng lẫn nhau. Các đoạn mồi và đoạn dò này được tổng hợp nhân tạo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Kit realtime RT-PCR đa mồi theo giải pháp hữu ích đề cập có sử dụng chứng nội (với nồng độ tối ưu được bổ sung trong giai đoạn tách chiết ARN) nhằm kiểm soát chất lượng của quá trình chẩn đoán và xác định được kết quả chẩn đoán là âm tính thật hay âm tính giả. Cụ thể, nếu các hóa chất và thao tác kỹ thuật của người thực hiện trong quá trình tách chiết ARN và thực hiện phản ứng realtime RT-PCR đảm bảo thì kết quả realtime RT-PCR đa mồi với chứng nội luôn xuất hiện tín hiệu khuếch đại của ít nhất 1 trong 2 trình tự đích hoặc chứng nội, thông thường sẽ xuất hiện cả 2. Trong trường hợp nồng độ trình tự đích quá lớn trong phản ứng realtime RT-PCR có thể làm cho không xuất hiện tín hiệu khuếch đại của chứng nội. Tuy nhiên tín hiệu khuếch đại của chứng nội phải luôn dương tính trong tất cả các trường hợp nồng độ của trình tự đích thấp hoặc âm tính. Trong trường hợp kết quả realtime RT-PCR âm tính đối cả chứng nội và trình tự đích, thì kết quả phản ứng realtime RT-PCR là vô hiệu do có lỗi và cần thực hiện lại phản ứng realtime RT-PCR này. Đây là ưu điểm nổi bật của chứng nội theo kit của giải pháp hữu ích. Theo giải pháp hữu ích, plasmit chứa trình tự khuếch đại đặc hiệu gen *rep* của MS2 do Khoa Sinh học Phân tử - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 cung cấp. Việc sử dụng chứng nội trong kit khắc phục được nhược điểm của việc chỉ bổ sung mẫu vào giai đoạn chạy realtime RT-PCR.

Ngoài các đoạn môi, đoạn dò nêu trên, kit realtime RT-PCR theo giải pháp hữu ích còn bao gồm các hoá chất để thực hiện phản ứng realtime RT-PCR, cụ thể bao gồm dung dịch đệm, các dNTP, các cặp môi, mẫu dò, enzym phiên mã ngược, enzym ADN polymeraza, $MgCl_2$. Các thành phần này là các hoá chất thông dụng của phản ứng realtime RT-PCR, và người có hiểu biết trung bình hoàn toàn có thể tạo ra các dung dịch này theo các tài liệu chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc kết hợp hai cặp môi cùng mẫu dò tương ứng theo giải pháp hữu ích để khuếch đại đồng thời hai gen đích là gen *NP* đặc trưng của virus Ebola Zaire và một gen đích *rep* của chúng nội trong một ống nghiệm cho kết quả độ nhạy cao đạt ngưỡng phát hiện 1414 FFU/ml bệnh phẩm với độ đặc hiệu 100% (được đánh giá tại Viện Y học nhiệt đới Bernhard Nocht, Cộng hòa Liên bang Đức) là ưu điểm vượt trội của kit theo giải pháp hữu ích. Về bản chất, để chẩn đoán virus Ebola Zaire bằng kit realtime RT-PCR phải thực hiện hai phản ứng, phản ứng thứ nhất là chuyển vật chất di truyền ARN của virus Ebola Zaire thành các ADN sợi đôi nhờ một phản ứng phiên mã ngược đó là phản ứng realtime RT-PCR (nhờ enzym RT). Phản ứng thứ hai là realtime PCR trên mẫu khuôn là các ADN sợi đôi vừa tổng hợp từ phản ứng thứ nhất. Hai phản ứng này có thể thực hiện riêng lẻ (phản ứng hai bước) hoặc thực hiện đồng thời trong cùng một ống phản ứng (phản ứng một bước).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Tối ưu phản ứng realtime RT-PCR

Để thiết lập điều kiện tối ưu, tránh được sự lây nhiễm, các thử nghiệm nhằm thiết lập phản ứng realtime RT-PCR đa môi một bước đã được tiến hành. Các tác giả đã lần lượt thử các thành phần trong phản ứng realtime RT-PCR đa môi với nồng độ khác nhau bao gồm dung dịch đệm, nồng độ $MgCl_2$, nồng độ môi, nồng độ mẫu dò, nồng độ các loại enzym. Đối với chu trình nhiệt cũng lần lượt thử với các điều kiện biến tính, gắn môi, kéo dài các chuỗi khác nhau dựa trên đặc điểm, thành phần môi, kích thước đoạn gen đích cần khuếch đại trên cơ sở chu trình chuẩn của phản ứng realtime RT-PCR. Trong mỗi điều kiện khảo sát, thông số được lựa chọn là giá trị mà cho kết quả chu kỳ xuất hiện tín hiệu huỳnh quang thấp nhất. Thành phần phản ứng thử nghiệm của kit cho mỗi phản ứng như trên Bảng 1.

Bảng 1: Thành phần của phản ứng realtime RT-PCR đa môi cho mỗi phản ứng

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	Môi có trình tự SEQ ID No. 1	0,6 μM	1,2
2	Môi có trình tự SEQ ID No. 2	0,6 μM	1,2
3	Mẫu dò có trình tự SEQ ID No. 3	0,1 μM	0,2
4	Môi có trình tự SEQ ID No. 4	0,3 μM	0,6
5	Môi có trình tự SEQ ID No. 5	0,3 μM	0,6
6	Mẫu dò có trình tự SEQ ID No. 6	0,05 μM	0,1
7	Dung dịch đệm	1X	12,5
8	Các dNTP	0,25 mM	2,5
9	Enzym ADN polymeraza	2,5 U	0,5
10	Enzym phiên mã ngược	0,5 U	0,2
11	MgCl ₂	0,4 mM	0,4
12	ARN chứng nội (SEQ ID NO.8)	1-10 ng/μl	5
Tổng thể tích		25μl	

Các sàng lọc với phản ứng realtime RT-PCR đa môi cho cả hai gen đích *NP* và *rep* chứng nội IC được được tối ưu với các trình tự môi và mẫu dò. Kết quả thử nghiệm tối ưu trong 500 thử nghiệm, xác định được ngưỡng phát hiện đạt 1414 FFU/ml bệnh phẩm. Điều kiện phản ứng được thực hiện như nêu trong Bảng 2.

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng realtime RT-PCR đa môi

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kì
1	Tổng hợp ADN sợi đôi	50	30 phút	1
2	Biến tính ban đầu	95	15 phút	1
3	Biến tính	94	15 giây	45
4	Gắn môi	60	1 phút	Thu nhận tín hiệu
5	Kết thúc phản ứng	40	∞	

Tiến hành so sánh với ngưỡng phát hiện của một số kit realtime RT-PCR chẩn đoán virus Ebola Zaire như bộ kit EZ1 realtime RT-PCR của Bộ Quốc phòng Mỹ kết hợp với Trung tâm Phòng chống và Kiểm soát dịch bệnh Hoa Kỳ triển khai thử nghiệm tại hiện trường ở Tây Phi trong chẩn đoán và kiểm soát dịch năm 2014 có

ngưỡng phát hiện là 7500 PFU/ml. Trong khi đó, bộ kit Lightmix Ebola Zaire rRT-PCR của hãng TIB-MOLBIOL (Đức) được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ và Tổ chức Y tế Thế giới chấp thuận có ngưỡng phát hiện là 4781 PFU/ml [Sealy T. K. et al., 2016, *Laboratory Response to Ebola - West Africa and United States*, The Morbidity and Mortality Weekly Report Supplements, Vol. 65, No. 3, p. 44-49]. Theo đó cho thấy kit theo giải pháp hữu ích có ngưỡng phát hiện đạt 1414 FFU/ml và có độ nhạy cao so với các kit đối chứng. Kit theo giải pháp hữu ích chứa hai cặp mồi cùng hai mẫu dò tương ứng dùng để khuếch đại đồng thời hai gen đích là gen *NP* của virus Ebola Zaire và *rep* của chứng nội để xác minh kết quả chẩn đoán, tránh hiện tượng âm tính giả.

Ví dụ 2. Ứng dụng chẩn đoán virus Ebola Zaire

Để thử nghiệm chẩn đoán virus Ebola Zaire bằng kit realtime RT-PCR đa mồi theo giải pháp hữu ích, các thành phần như nêu trong Bảng 1 được sử dụng cho mỗi phản ứng có bổ sung ARN khuôn được chiết từ mẫu bệnh phẩm cần chẩn đoán. Mẫu ARN khuôn được chuẩn bị bằng bất kỳ kit tách chiết ARN virus thương mại được bổ sung vào ống eppendorf đã chứa sẵn các thành phần của kit realtime RT-PCR đa mồi với nồng độ và thể tích như được thể hiện trong Bảng 1.

Tiếp đó đậy kín nắp ống eppendorf, ly tâm nhanh trong 5 giây rồi chuyển ngay các ống này vào máy realtime PCR và bắt đầu chương trình chạy với chu trình nhiệt như được thể hiện trong Bảng 2 nêu trên.

- Đọc và phân tích kết quả:

Đọc kết quả ở bước sóng 530 (kênh màu FAM) cho gen đích *NP* của virus Ebola Zaire và bước sóng 670 (kênh màu CY5) cho gen đích *rep* chứng nội IC.

Trường hợp 1: có tín hiệu huỳnh quang của mẫu ở kênh màu FAM (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ $C_t < 38$ và có tín hiệu huỳnh quang của chứng nội IC ở kênh màu CY5 (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ C_t 30-35. Mẫu này được xác định là dương tính với virus Ebola Zaire.

Trường hợp 2: không có tín hiệu huỳnh quang của mẫu ở kênh màu FAM (đường cong khuếch đại) và có tín hiệu huỳnh quang của chứng nội IC ở kênh màu CY5 (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ C_t 30-35. Mẫu này được xác định là dưới giới hạn phát hiện hoặc âm tính.

Trường hợp 3: không có tín hiệu huỳnh quang của mẫu ở kênh màu FAM (đường cong khuếch đại) và không có tín hiệu huỳnh quang của chứng nội IC ở kênh màu CY5 (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ Ct 30-35. Mẫu này không đủ cơ sở để kết luận, không có tín hiệu huỳnh quang của chứng nội IC chứng tỏ hóa chất bị hỏng hoặc quá trình thao tác có sai sót và cần thực hiện lại xét nghiệm.

Trường hợp 4: có tín hiệu huỳnh quang của mẫu ở kênh màu FAM (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ Ct từ 38 -45 và có tín hiệu huỳnh quang của chứng nội IC ở kênh màu CY5 (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ Ct 30-35. Cần tiến hành chạy lại, nếu kết quả chu kỳ Ct vẫn từ 38 -45, mẫu được xác định là âm tính.

Kết quả

- ARN của 2 mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus Ebola Zaire (S1 và S2) được tách chiết theo quy trình của nhà sản xuất (High Pure Viral Nucleic Acid Kit - Roche) sau khi bổ sung 10µl mẫu chứng nội (nồng độ IC là 10^3 bản sao/µl) cùng mẫu bệnh phẩm. Sau đó các mẫu axit nucleic này cùng đối chứng dương (ARN virus Ebola Zaire) và đối chứng âm (ARN virus Dengue - cũng là virus gây sốt xuất huyết nhưng khác với virus Ebola Zaire) được bổ sung vào các ống eppendorf chứa hỗn hợp phản ứng realtime RT-PCR đa môi với thể tích và nồng độ được thể hiện trong Bảng 1 nêu trên, tiếp đó tiến hành realtime RT-PCR như nêu trên.

Kết quả biểu đồ khuếch đại của phản ứng realtime RT-PCR đa môi được thể hiện trên Hình 1.

Ở đường chạy S1 của mẫu bệnh phẩm số 1, có tín hiệu huỳnh quang của mẫu ở kênh màu FAM ở chu kỳ Ct = 21, ĐC(+) có tín hiệu huỳnh quang ở chu kỳ Ct = 26, ĐC(-) không có tín hiệu huỳnh quang và có tín hiệu huỳnh quang của chứng nội IC ở kênh màu CY5 (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ Ct 30-35. Mẫu này được xác định là dương tính với virus Ebola Zaire.

Ở đường chạy S2 của mẫu bệnh phẩm số 2, không có tín hiệu huỳnh quang của mẫu ở kênh màu FAM (đường cong khuếch đại), ĐC (+) có tín hiệu huỳnh quang ở chu kỳ Ct = 26, ĐC(-) không có tín hiệu huỳnh quang và có tín hiệu huỳnh quang của chứng nội IC ở kênh màu CY5 (đường cong khuếch đại) ở chu kỳ Ct 30-35. Mẫu này được xác định là dưới giới hạn phát hiện hoặc âm tính.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Kit realtime RT-PCR đa môi theo giải pháp hữu ích chứa hai cặp môi cùng hai mẫu dò tương ứng dùng để khuếch đại đồng thời hai gen đích là *NP* của virus Ebola Zaire và gen *rep* chứng nội chỉ trong một ống phản ứng, do đó khắc phục được hiện tượng dương tính giả do nhiễm chéo so với việc phải thực hiện hai phản ứng riêng rẽ và rút ngắn thời gian chẩn đoán bệnh.

Kit realtime RT-PCR đa môi có chứa chứng nội cho hiệu quả chẩn đoán chính xác với độ nhạy cao, đạt giới hạn phát hiện 1414 FFU/ml bệnh phẩm, giảm tối đa các trường hợp bỏ sót chẩn đoán, đồng thời, chứng nội IC được khuếch đại đồng thời trong phản ứng realtime RT-PCR đa môi cho phép xác minh kết quả chẩn đoán.

YÊU CẦU BẢO HỘ

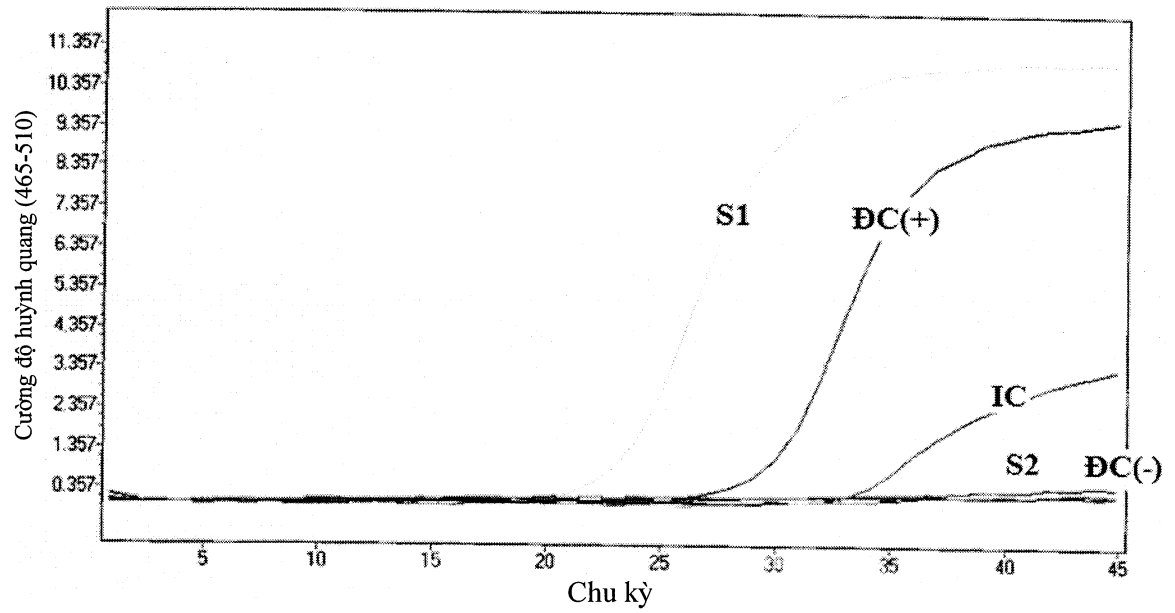
1. Kit realtime RT-PCR đa môi để chẩn đoán nhanh virus Ebola Zaire, trong đó kit này bao gồm:

a) các đoạn môi, mẫu dò có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại tương ứng các gen đích là gen *NP* của virus Ebola Zaire và gen *rep* của chủng nội;

b) thành phần để thực hiện phản ứng RT-PCR bao gồm dung dịch đệm, các dNTP, enzym phiên mã ngược, enzym ADN polymeraza và $MgCl_2$; và

c) chủng nội có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 8.

HÌNH 1



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Học viện Quân y

<120> Kit realtime RT-PCR đa môi để chẩn đoán nhanh virus Ebola Zaire

<130>

<160> 8

<170>

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<223>

<220>

<400> 1

gacaaattgc tcggaatcac

20

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<223>

<220>

<400> 2

atcttgtggt aatccatgtc ag

22

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221>

<223> Gắn huỳnh quang FAM

<220>

<400> 3

cagtgagact cggcgatcac caga

24

<210> 4

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<223>

<220>

<400> 4

cgctgctcgc ggatac

16

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <221> CDS
 <223>

<220>
 <400> 5

aacttgcggtt ctcgagcgat

20

<210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <221>
 <223> Gắn huỳnh quang CY5

<220>
 <400> 6

acctcggggtt tccgtcttgc tcgt

24

<210> 7
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Ebola Zaire
 <221>
 <223> CDS

<220>
 <400> 7

atcttggtggt aatccatgtc agattcagtg agactcggcg tcatccagac tttctgagga

60

cgagaatcca tactcggaat tttgtgattc cgagcaattt gtc

103

<210> 8
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Thực khuẩn thể M2
 <221>
 <223> CDS

<220>
 <400> 8

ggctgctcgc ggataccggt acctcggggtt tccgtcttgc tcgatacgct cgagaacgca

60

agtt

64