

Những vấn đề về kỹ thuật cần được quan tâm khi áp dụng PCR và real-time PCR trong phòng thí nghiệm chẩn đoán

Sự khác biệt giữa phòng thí nghiệm chẩn đoán và phòng thí nghiệm nghiên cứu

Phòng thí nghiệm nghiên cứu là phòng thí nghiệm mà các thử nghiệm được thực hiện để đáp ứng một nhu cầu nghiên cứu nào đó nhằm giúp nhà nghiên cứu giải đáp một vấn đề của khoa học. Kết quả của một phòng thí nghiệm nghiên cứu không liên quan trực tiếp và tức thời đến quyết định của người gửi mẫu xét nghiệm, do vậy trong chăn nuôi hay thủy sản sẽ không liên quan đến quyết định hủy hay cô lập một quần thể gia súc hay tôm cá, hay trong y học không liên quan đến quyết định điều trị của bác sĩ trên bệnh nhân. Do vậy kết quả của phòng thí nghiệm nghiên cứu sẽ không cần thiết phải kịp thời đến tay người gửi mẫu xét nghiệm.

Phòng thí nghiệm chẩn đoán là phòng thí nghiệm có nhiệm vụ chính yếu là làm xét nghiệm trên các mẫu thử để phát hiện được tác nhân gây bệnh và trả lời kết quả đến người gửi yêu cầu xét nghiệm để họ thể cho các cách giải quyết cụ thể trên các vật chủ được lấy mẫu gửi đi xét nghiệm. Trong chăn nuôi hay thủy sản, kết quả của một phòng thí nghiệm chẩn đoán sẽ rất quan trọng vì có liên quan đến quyết định của giới hữu trách để tiêu hủy hay cô lập một bầy đàn gia súc hay tôm cá. Trong y học, phòng thí nghiệm chẩn đoán còn được gọi là phòng thí nghiệm lâm sàng vì kết quả xét nghiệm sẽ được các nhà lâm sàng tham khảo để đưa ra phát đồ điều trị trên bệnh nhân. Chính vì vậy một phòng thí nghiệm chẩn đoán phải là phòng thí nghiệm không chỉ cho kết quả chính xác mà còn phải cho kết quả kịp thời đến tay người làm xét nghiệm.

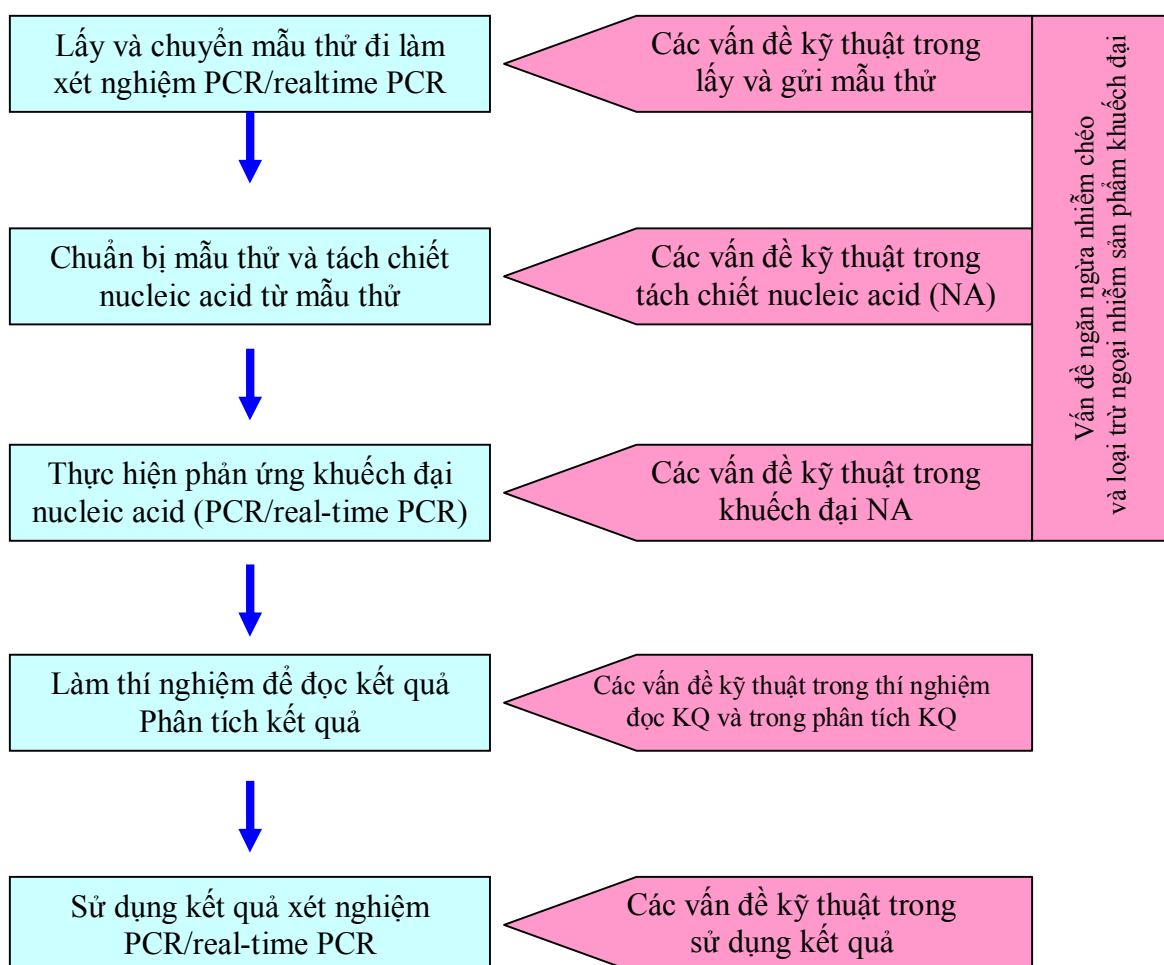
Việc ứng dụng PCR và real-time PCR trong chẩn đoán đã trở nên ngày càng dễ dàng vì đây là một công nghệ mở, phòng thí nghiệm có thể tự pha chế các thuốc thử để thực hiện thử nghiệm. Ngoài ra, nhu cầu sử dụng PCR và real-time PCR trong chẩn đoán ngày càng nhiều vì có nhiều tác nhân gây bệnh chỉ có thể chẩn đoán hay theo dõi được bằng công nghệ PCR và real-time PCR. Không chỉ vậy, hiện nay trên thế giới, công nghệ PCR chẩn đoán sắp hết bản quyền nên đang có sự bùng nổ các sản phẩm chẩn đoán dựa trên công nghệ PCR và real-time PCR được nhiều hãng sản xuất cung cấp. Do vậy, có thể nói PCR hiện nay không còn bó hẹp trong cánh cửa của các phòng thí nghiệm nghiên cứu mà đã dần dần xâm nhập vào trong các phòng thí nghiệm chẩn đoán.

Tuy nhiên việc áp dụng PCR và real-time PCR trong chẩn đoán cũng đòi hỏi người làm thí nghiệm phải biết quan tâm đến các vấn đề kỹ thuật có liên quan để kết quả xét nghiệm đạt được độ chính xác cao, và đạt được độ nhạy cảm tuyệt vời đúng như bản chất của PCR và real-time PCR, và phải kịp thời đến tay người chỉ định xét nghiệm.

Các vấn đề kỹ thuật cần quan tâm áp dụng PCR và real-time PCR trong chẩn đoán

1. Tiến trình xét nghiệm PCR và real-time PCR

Kể từ khi lấy mẫu thử gửi đến phòng thí nghiệm để làm xét nghiệm PCR hay real-time PCR chẩn đoán cho đến khi kết quả xét nghiệm đến tay người cho chỉ định xét nghiệm, tiến trình sẽ qua các bước mà trong mỗi bước đều có những vấn đề kỹ thuật rất cần được quan tâm bởi người làm xét nghiệm, người lấy mẫu xét nghiệm, và người nhận để sử dụng kết quả xét nghiệm này. **Sơ đồ 3** dưới đây trình bày các bước trong một tiến trình xét nghiệm.



Sơ đồ 3: Tiến trình một xét nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán và các vấn đề kỹ thuật cần được quan tâm

2. Các vấn đề kỹ thuật cần quan tâm

a. Các vấn đề kỹ thuật cần quan tâm khi lấy và gửi mẫu thử

Mẫu thử được lấy làm xét nghiệm PCR/real-time PCR là các mẫu được lấy từ vật chủ tại nơi mà người lấy mẫu cho là có thể có sự hiện diện của nucleic acid của tác nhân đích, do vậy phải lấy mẫu thử đúng chỗ. Ví dụ để phát hiện *M. tuberculosis* gây lao phổi trên bệnh nhân thì mẫu thử phải lấy là đàm hay dịch hút từ rửa khí/phế quản, không thể lấy máu hay huyết thanh. Hay muốn phát hiện *Cytomegalovirus* trong bệnh nhân thì mẫu thử tốt nhất là máu toàn phần để tách huyết tương hay tách bạch cầu, không thể là máu đông để tách huyết thanh được.

Vật liệu dùng để lấy và giữ mẫu thử cũng phải được quan tâm vì nếu không, các nucleic acid của tác nhân đích có trong mẫu sẽ bị phân hủy hay mẫu thử sẽ chứa các chất ức chế phản ứng khuếch đại sau này. Do vậy vật liệu tốt nhất để lấy và giữ mẫu thử là các vật liệu tinh sạch về mặt sinh học, nghĩa là không nhiễm các protein hay các nuclease tiết ra từ các vi sinh vật như endonuclease, ribonuclease; và chỉ sử dụng một lần, không nên được rửa xài lại. **Hình 59** mô tả một số vật liệu nên được sử dụng để lấy và giữ các mẫu thử làm xét nghiệm PCR/qPCR. Các vật liệu này hiện có sẵn tại công ty Nam Khoa.



Hình 59: Các lọ và tube như thế này nên được sử dụng để lấy và giữ các mẫu thử làm xét nghiệm PCR/qPCR

Để bảo quản và chuyên chở mẫu thì vấn đề kỹ thuật cần quan tâm là làm thế nào mẫu giữ nguyên trạng, nucleic acid của tác nhân đích không bị phân hủy trong quá trình bảo quản. Do vậy đối với các mẫu mà nucleic acid đích cần phát hiện là DNA thì có thể bảo quản ngắn ngày (trong vòng 48 giờ) ở tủ mát 2-8°C, còn nếu bảo quản lâu dài thì cần giữ -18°C đến -30°C. Đối với RNA, nếu là các mẫu ít hay không bị tạp nhiễm như máu, dịch cơ thể thì có thể bảo quản 48 giờ ở 2-8°C, nhưng đối với các mẫu

tạp nhiễm nhiều như quệt họng, quệt mũi sau tìm virus, đàm...hay cần bảo quản dài ngày thì phải giữ mẫu ở -70°C . Để chuyên chở mẫu thì chỉ cần chuyên chở trong thùng lạnh với thời gian chuyên chở không quá 48 giờ. Nếu thời gian chuyên chở lâu hơn thì rất cần phải giữ trong đá khô.

Nói chung, các vấn đề kỹ thuật được nêu lên là chỉ nhằm một mục tiêu, đó là lấy mẫu cho đúng chỗ là nơi có sự hiện diện của nucleic acid đích muốn tìm, phải giữ và chuyên chở mẫu thử đến phòng thí nghiệm trong điều kiện sao cho nucleic acid muốn tìm không bị phân hủy cũng như mẫu thử không bị nhiễm các chất sinh học gây ức chế phản ứng khuếch đại và mẫu thử không bị nhiễm chéo.

b. Các vấn đề kỹ thuật trong chuẩn bị mẫu thử và tách chiết nucleic acid

Trong khâu này, mục tiêu chính là phải làm sao tách chiết được tối đa nucleic acid đích dù lượng nucleic acid của tác nhân đích có nhỏ và có bị pha loãng quá thấp trong mẫu thử. Tách chiết thu được phải tinh khiết, không lẫn các protein hay chất gây ức chế phản ứng khuếch đại.

Tùy loại mẫu thử và cũng tùy loại tác nhân đích có trong mẫu thử mà có những mẫu thử có thể đưa vào tách chiết nucleic acid ngay, nhưng cũng có những mẫu thử cần phải được chuẩn bị trước khi đưa vào tách chiết nucleic acid (NA). Ví dụ các mẫu thử như huyết thanh, huyết tương, cấy tế bào...với các tác nhân đích như virus hay các vi khuẩn có cấu tạo tế bào không đặc biệt thì có thể đưa vào tách chiết nucleic acid ngay, nhưng với các mẫu thử như mẫu mô, mẫu sinh thiết hay các vi khuẩn có cấu tạo tế bào đặc biệt như *M. tuberculosis*, nấm men, nấm sợi, mô thực vật như cây-lá-rễ-hoa thì cần phải được đưa vào chuẩn bị trước để các cấu trúc của mô tan đi (vdụ phải sử lý proteinase K), để tế bào vỡ ra (vdụ dùng các chất tẩy TRITON X100, hay tán siêu âm, hay nghiền trong nitrogen lỏng...), hay như trong trường hợp các lát cắt sinh thiết đúc sấp thì cần phải loại bỏ sấp khỏi mô, hoặc các mẫu có các chất nhầy như đàm thì cần phải làm tan nhầy (bằng NALC...) trước khi đưa vào tách chiết nucleic acid...Do vậy, người làm xét nghiệm cần phải biết không chỉ các mẫu thử nào cần phải qua giai đoạn xử lý mẫu trước khi tách chiết NA mà còn phải biết phải sử dụng phương pháp gì với qui trình kỹ thuật như thế nào.

Tùy loại mẫu thử; tùy loại tác nhân đích là vi khuẩn, virus, vi nấm, hay tế bào có nhân; và tùy NA phải tách chiết là DNA hay RNA mà phải lựa chọn phương pháp tách chiết cho phù hợp, không nên lẫn lộn. Ví dụ phương pháp Boom rất tốt để tách chiết các dịch sinh học hay các mẫu thử ít lẫn DNA của vật chủ vì nguyên tắc là dựa vào sự hấp phụ của DNA trên hạt silica, nên nếu mẫu có quá nhiều DNA vật chủ như các mô sinh thiết thì DNA tác nhân đích sẽ bị cạnh tranh không bám được vào hạt silica. Do vậy, để tách chiết DNA cho các mẫu thử là mô và sinh thiết thì nên chọn phương pháp phenol/chloroform hơn là phương pháp BOOM. Cũng không thể sử dụng phương pháp tách chiết cho RNA vào để tách chiết DNA, do vậy mà chúng ta thấy phương pháp BOOM rất tốt cho tách chiết DNA nhưng lại rất kém cho tách chiết RNA. Khi lựa chọn phương pháp hay bộ thuốc thử tách chiết cho tác nhân virus hay vi khuẩn đích, cũng phải xem kỹ bộ tách chiết hay phương pháp tách chiết NA mà mình đang lựa chọn có áp dụng được cho vi khuẩn hay virus không? Vì có khi sự thất bại trong xét nghiệm PCR là do những sự vô ý này.

Tách chiết NA là một khâu rất quan trọng; tách chiết NA phải đảm bảo được độ nhạy thì xét nghiệm PCR mới có thể đạt được độ nhạy mong muốn. Do vậy khi tự pha một bộ thuốc thử tách chiết NA hay khi sản xuất một bộ thuốc thử tách chiết NA, trước khi đưa vào sử dụng trong xét nghiệm PCR/real-time PCR, phòng thí nghiệm hay nhà sản xuất phải kiểm tra chất lượng để xem bộ tách chiết có đảm bảo được độ nhạy hay không. Phương pháp kiểm tra là phải thử trên các độ pha loãng của một tác nhân đích (là đối tượng mà phòng thí nghiệm hay người dùng sẽ phải sử dụng bộ tách chiết NA để thực hiện xét nghiệm) hay của một tác nhân khác tương đương. Đạt độ nhạy là bộ tách chiết NA khi thử nghiệm trên các độ pha loãng tác nhân đích này phải đạt được giới hạn phát hiện (limit of detection, LOD), tức là đạt được số lượng vi khuẩn đích thấp nhất có trong một đơn vị thể tích mẫu thử mà phương pháp hay bộ thử nghiệm có thể tách chiết và phát hiện được.

Minh họa dưới đây (**hình 60**) là một kết quả kiểm tra chất lượng bộ kit tách chiết DNA tên là ^{NK}DNAPREP-BOOM do công ty Nam Khoa sản xuất và được kiểm tra chất lượng. Phương pháp kiểm tra là sử dụng các độ pha loãng của vi khuẩn *M. tuberculosis*, cho vào tách chiết DNA với bộ thuốc thử đã sản xuất đồng thời so sánh với bộ thuốc thử ^{NK}DNAPREP-BOOM được sản xuất trước đó. Kết quả kiểm tra cho

thấy bộ thuốc thử ^{NK}DNAPREP-BOOM mới sản xuất và bộ thuốc thử ^{NK}DNAPREP-BOOM sản xuất trước đó đều đạt được khả năng tách chiết vi khuẩn đích đến độ pha loãng 10^{-4} , chứa 1 vi khuẩn trong một thể tích 100 μ l dịch vi khuẩn đưa vào tách chiết. Trong phương pháp này nếu huyền dịch vi khuẩn có bị giảm chất lượng thì kết quả kiểm tra vẫn có thể đọc được nhờ có so sánh ^{NK}DNAPREP-BOOM mới sản xuất với ^{NK}DNAPREP-BOOM sản xuất lô trước đó và lô này đã đạt chất lượng.



Hình 60: Kết quả kiểm tra chất lượng bộ thuốc thử ^{NK}DNAPREP-BOOM do công ty Nam Khoa sản xuất. Đối tượng dùng để kiểm tra bộ thuốc thử là huyền dịch vi khuẩn *M. tuberculosis* TB1 chứa 10.000 tế bào vi khuẩn/ml được pha loãng theo hệ số 10 để có 1,000 tế bào vi khuẩn/ml (T2), 100/ml (T3), 10/ml (T4), và 1/ml (T5). Phương pháp kiểm tra là sử dụng bộ thuốc thử ^{NK}DNAPREP-BOOM cần kiểm tra và bộ ^{NK}DNAPREP-BOOM được sản xuất trước đó để thực hiện tách chiết trên các huyền dịch vi khuẩn đã pha loãng này, thể tích huyền dịch để tách chiết là 100 μ l, rồi lấy 10 μ l dịch tách chiết để chạy PCR phát hiện *M. tuberculosis*. Phát hiện DNA của *M. tuberculosis* có trong dịch tách chiết qua điện di phát hiện sản phẩm khuếch đại 249bps. Kết quả cho thấy cả hai bộ thuốc thử ^{NK}DNAPREP-BOOM mới và cũ đều đạt LOD là 1 tế bào vi khuẩn *M. tuberculosis* trong thể tích tách chiết.

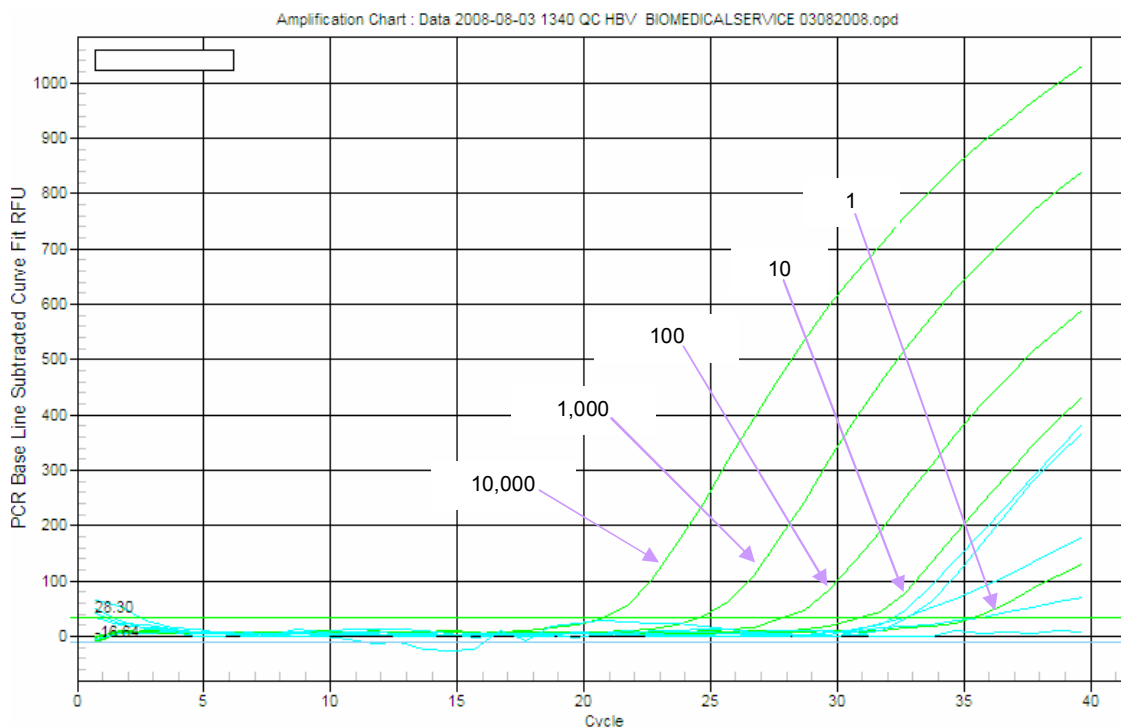
Không chỉ kiểm tra chất lượng các bộ thuốc thử tách chiết NA được pha chế trước khi sử dụng, mà ngay cả trong mỗi lần sử dụng để làm xét nghiệm, bộ thuốc thử tách chiết cũng phải được kiểm soát độ nhạy bằng cách cho nucleic acid chứng nội tại ở nồng độ LOD vào mẫu chứng [-] và nếu muốn, có thể cho vào mẫu thử để được thực hiện tách chiết cùng lúc với các mẫu thử (xem phần chứng nội tại).

c. Các vấn đề kỹ thuật trong khuếch đại nucleic acid đích

Về nguyên tắc thì PCR/real-time PCR đạt được độ nhạy rất cao, tuy nhiên trên thực tế thì độ nhạy còn tùy thuộc rất nhiều vào sự thiết kế hay chọn lựa môi; vào thiết bị luân nhiệt; vào hóa chất, đặc biệt là enzyme Taq polymerase được sử dụng. Khâu

khuếch đại sẽ rất khó đạt được độ nhạy và duy trì độ nhạy trong quá trình lưu trữ nếu nhà sản xuất hay người làm thí nghiệm không chọn lọc Taq polymerase để sử dụng.

Ngoài các yếu tố kỹ thuật cần phải quan tâm ở trên, để đảm bảo được độ nhạy của khâu khuếch đại, nếu tự pha hay sản xuất PCR mix cho phản ứng khuếch đại, người làm thí nghiệm hay nhà sản xuất phải kiểm tra độ nhạy của các PCR mix trước khi đưa vào sử dụng. Phương pháp kiểm tra là thử nghiệm trên các độ pha loãng của DNA đích đã biết trước số lượng copy trong một đơn vị thể tích. PCR mix được gọi là đạt độ nhạy khi đạt được giới hạn phát hiện (LOD) là một copy DNA đích cho vào PCR mix, nghĩa là trong thể tích mẫu cho vào PCR mix chỉ cần có 1 copy DNA đích là có thể cho kết quả khuếch đại thành nhiều bản sao có thể phát hiện được khi phân tích kết quả (xem mục kiểm tra độ nhạy của PCR mix đã pha ở bài PCR-các vấn đề cơ bản).



Biểu đồ 16: Kết quả kiểm tra chất lượng real-time PCR mix sử dụng môi và Taqman probe định lượng HBV-DNA. Kết quả kiểm tra cho thấy độ nhạy của PCR mix đạt LOD 1 copy HBV-DNA trong một thể tích mẫu cho vào PCR mix. Các đường biểu diễn màu xanh sáng là đường biểu diễn khuếch đại của chứng nội tại được cho vào PCR mix ở nồng độ LOD cùng với mẫu kiểm tra.

Biểu đồ 16 minh họa một kết quả kiểm tra chất lượng real-time PCR mix dùng môi và Taqman probe để phát hiện và định lượng HBV-DNA do công ty Nam Khoa sản xuất. Kết quả kiểm tra cho thấy độ nhạy của PCR mix đạt LOD là 1 copy cho một thể tích mẫu cho vào PCR mix, đây chính là độ nhạy đòi hỏi của PCR/real-time PCR chẩn đoán.

Ngoài việc kiểm tra chất lượng các PCR mix trước khi đưa vào sử dụng, người làm xét nghiệm khi thực hiện xét nghiệm PCR cũng phải kiểm soát cho được độ nhạy của PCR mix được sử dụng trong mỗi lần làm xét nghiệm. Thực hiện vấn đề kiểm soát này là một điều kiện bắt buộc vì dù PCR mix có được kiểm tra đạt chất lượng sau khi pha chế hay sản xuất, vẫn có thể giảm chất lượng trong quá trình lưu trữ hay bảo quản, đặc biệt khi được pha chế bằng nguồn Taq polymerase không đảm bảo chất lượng.

Có nhiều cách để kiểm soát chất lượng PCR mix mỗi khi làm xét nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán. Có thể sử dụng chứng [+] là DNA đích được pha sẵn hay được nhà sản xuất cung cấp ở nồng độ LOD cho vào PCR mix trong mỗi lần làm xét nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán, hay có thể sử dụng DNA chứng nội tại sử dụng chung mỗi được pha ở nồng độ LOD cho vào PCR chung với tách chiết DNA từ mẫu để kiểm soát ức chế PCR và đồng thời kiểm soát độ nhạy của PCR mix (xin xem thêm ở các mục chứng nội tại, chứng dương, và chứng âm trong phần các chuẩn mực và kiểm soát chất lượng cho xét nghiệm PCR/real-time PCR dành cho chẩn đoán).

d. Ngừa nhiễm chéo và loại trừ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại

Muốn sử dụng PCR/real-time PCR trong chẩn đoán, người làm xét nghiệm phải nhận diện được để có các biện pháp kỹ thuật ngăn ngừa hay loại trừ các nguy cơ ngoại nhiễm làm cho mẫu thử không có tác nhân đích lại bị có kết quả dương tính khi làm xét nghiệm, nghĩa là bị nguy cơ dương tính giả. Ngoại nhiễm trong xét nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán có thể xảy ra do hai nguyên do.

Nguyên do thứ nhất là nhiễm chéo làm cho mẫu âm hay các thuốc thử làm xét nghiệm bị nhiễm nucleic acid đích từ các mẫu dương. Với nguyên do này thì người làm thí nghiệm hoàn toàn có thể phòng ngừa được bằng các bộ trí phòng thí nghiệm một cách hợp lý với các phương tiện và thiết bị phù hợp, ví dụ thiết kế để khu vực pha các thuốc thử cách xa khu làm mẫu; không để lẫn lộn các thuốc thử đã pha và đang dùng với các nguyên liệu và dung dịch sẽ được dùng để pha thuốc thử; các dụng cụ và tài liệu dùng trong khu vực làm mẫu không được đem qua khu vực pha thuốc thử; không để phòng thí nghiệm vi sinh nuôi cấy tác nhân đích trong phòng thí nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán phát hiện đúng tác nhân đó. Ngoài cách bố trí phòng thí nghiệm làm việc cho hợp lý, người làm xét nghiệm PCR/real-time PCR phải được

huấn luyện để nhuần nhuyễn các thao tác vô trùng đặc biệt trong đóng mở tube, chai lọ, thao tác pipetting, trong bố trí các vật liệu và dụng cụ khi thao tác...

Đối với nguyên do thứ hai là ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại thì chỉ với các giải pháp kỹ thuật như đã nêu trên vẫn khó có thể tránh được nguy cơ này, lý do là trong một phòng xét nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán, sản phẩm PCR sẽ tích tụ ngày càng nhiều và chắc chắn không sớm thì muộn các sản phẩm PCR này sẽ nhiễm vào các dụng cụ, thuốc thử, thiết bị...và đến một lúc nào đó người làm xét nghiệm sẽ nhận dạng được thảm họa này khi các mẫu xét nghiệm PCR đều cho kết quả dương tính. Đến lúc này thì chỉ có một giải pháp là đổ bỏ toàn bộ thuốc thử, khử nhiễm toàn bộ phòng thí nghiệm, đóng cửa vài tháng...Rồi lại mở cửa làm lại, rồi thảm họa tái xuất hiện...Mô tả như vậy để chúng ta thấy rằng không thể có biện pháp nào hiệu quả để ngừa ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại, mà chỉ có một cách duy nhất đó là phải loại trừ được nguy cơ này. Để làm được điều này thì cách duy nhất là phòng thí nghiệm PCR chẩn đoán ngay từ đầu phải sử dụng các PCR mix có pha thêm dUTP và UNG. Cơ chế loại trừ được ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại bằng dUTP và UNG đã được nói chi tiết trong mục loại trừ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại của bài PCR-các vấn đề cơ bản.

Qua phân tích như trên, chúng ta thấy là nếu muốn làm được xét nghiệm PCR chẩn đoán, không thể không sử dụng biện pháp dùng PCR mix có pha dUTP và UNG. Nếu không áp dụng biện pháp này, không sớm thì muộn, thảm họa ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại sẽ xảy ra. Tuy nhiên cũng có các vấn đề kỹ thuật khi dùng dUTP và UNG vì nếu không chọn được enzyme UNG hiệu quả và phù hợp thì độ nhạy của PCR/real-time PCR sẽ giảm và/hay không thể có hiệu quả loại trừ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại. Chính vì vậy người sử dụng phải kiểm tra độ nhạy và kiểm tra khả năng loại trừ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại của PCR mix được công bố là có dUTP và UNG. Hiện nay tất cả các hãng nước ngoài sản xuất các PCR mix dùng cho PCR/real-time PCR chẩn đoán đều sử dụng dUTP và UNG. Tại Việt Nam, công ty Nam Khoa là công ty tiên phong và hàng đầu áp dụng giải pháp này. Tất cả các bộ thuốc thử PCR/real-time PCR dùng trong chẩn đoán do công ty Nam Khoa sản xuất đều sử dụng PCR mix có dUTP và UNG bằng nguồn hóa chất chọn lọc để đảm bảo không giảm độ nhạy mà hiệu quả loại trừ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại vẫn cao với bằng chứng kiểm tra chất lượng về độ nhạy luôn đi kèm với sản phẩm.

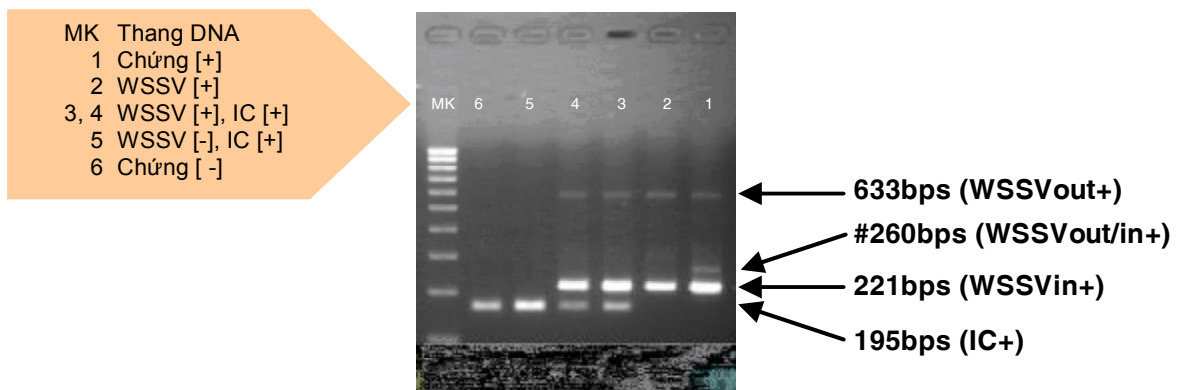
e. Các vấn đề kỹ thuật trong thử nghiệm điện di trên thạch để đọc kết quả

Đối với phương pháp PCR cổ điển thì muốn đọc được kết quả, người làm thí nghiệm phải làm tiếp thí nghiệm để xác định được trong ống phản ứng có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu hay không. Phương pháp thường được áp dụng nhất trong các phòng thí nghiệm PCR chẩn đoán là dùng kỹ thuật điện di để xác định kích thước sản phẩm khuếch đại có đúng như kích thước mong muốn hay không. Chính vì đây là phương pháp thường được sử dụng nhất, nên chúng tôi xin đưa ra đây một số vấn đề kỹ thuật cần được người làm thí nghiệm quan tâm.

- Chọn tỷ lệ % agarose để điện di cho phù hợp với kích thước sản phẩm khuếch đại. Trung bình nhất là dùng tỷ lệ 2%. Đối với các sản phẩm khuếch đại lớn trên 500bps thì nên dùng agarose 1.5%, còn đối với các sản phẩm khuếch đại kích thước dưới 100bps thì nên dùng agarose trên 2.5%.
- Khi pha gel agarose, lưu ý là phải làm tan hoàn toàn agarose trong đệm điện di, và để làm được điều này phải cho agarose vào bình đã có sẵn một ít dung dịch đệm điện di, nhờ vậy tránh agarose bị bám vào đáy bình rồi sẽ không tan được sau khi đun. Trước khi cho vào lò vi sóng phải lắc trộn để agarose hòa đều trong dung dịch đệm. Khi đun, phải ít nhất hai lần lấy bình ra khỏi lò vi sóng để lắc trộn đều rồi mới cho vào đun tiếp. Phải đảm bảo agarose tan đều trong dung dịch đệm, không còn thấy lợn cợn dù rất nhỏ. Có như vậy mới có kết quả điện di tốt.
- Trước khi đổ agarose vào khuôn, phải đảm bảo khuôn nằm trên mặt phẳng nằm ngang kiểm tra bằng bóng khí để bề dày của agarose thật sự dày đều như nhau và kết quả điện di sẽ chính xác hơn
- Trong PCR chẩn đoán, không nên trộn đệm tải với sản phẩm PCR trên giấy paraffin vì làm như vậy sẽ gây nguy cơ ngoại nhiễm. Nên cho đệm tải với thể tích bằng ¼ thể tích của dung dịch phản ứng có trong tube PCR rồi trộn ngay trong tube.
- Thể tích mẫu cho vào giếng không nên quá ít mà phải từ 15µl trở lên vì có như vậy mới có thể phát hiện được các kết quả [+] yếu
- Luôn điện di kèm với thang DNA vì đây là một chuẩn không chỉ dùng để xác định kích thước của các vạch điện di trong các mẫu mà còn là một chuẩn để kiểm

soát chất lượng của điện di. Gọi là chất lượng điện di tốt khi thang DNA tách được nhau rõ ràng và đủ tất cả các vạch của thang.

▪ Trong một kết quả điện di chuẩn mực cho PCR chẩn đoán còn cần phải có một giếng cho chứng [+] để so sánh kích thước của sản phẩm khuếch đại trong vạch điện di từ các giếng chứa mẫu, và một giếng cho chứng âm để chứng minh quá trình làm xét nghiệm PCR chẩn đoán không bị ngoại nhiễm (xem chuẩn mực cho PCR/real-time PCR chẩn đoán). **Hình 61** minh họa một kết quả chuẩn mực của xét nghiệm PCR đọc qua điện di, phân tích trên hình chúng ta sẽ thấy luôn có chứng [+], chứng [-] và thang DNA.



Hình 61: Minh họa một kết quả nonstop nested PCR phát hiện WSSV được thực hiện tại công ty Nam Khoa. Lưu ý kết quả điện di phải luôn luôn có các chứng [+], chứng [-], và phải có thang DNA

- Phải thay dung dịch đệm điện di trong máng điện di trong vòng không quá 1 tuần để đảm bảo chất lượng điện di luôn tốt.
- Nếu không muốn tiếp xúc với ethidium bromide, một hóa chất có tiềm năng gây ung thư mạnh, thì có thể sử dụng các màu huỳnh quang chèn khác ít độc hại hơn như SYBR (SYBR safe của Invitrogene), hay hoàn toàn không độc hại như GelRed hay GelGreen (của Biotium). Tuy nhiên giải pháp này sẽ mắc tiền hơn rất nhiều.
- Nếu phải sử dụng ethidium bromide thì phải tuyệt đối chú ý các biện pháp an toàn. Các biện pháp an toàn khi sử dụng ethidium bromide được trình bày tiếp theo đây.

f. Biên pháp an toàn khi sử dụng ethidium bromide

Tại sao phải thao tác với ethidium bromide?

Ethidium bromide (EB) là một loại màu chèn (intercalating dye) có đặc điểm chèn vào các sợi đôi DNA và làm các sợi đôi này phát huỳnh quang được dưới ánh sáng cực tím. Dựa vào đặc điểm cơ bản này của EB mà trong sinh học phân tử, người thực hiện thử nghiệm thường dùng EB để nhuộm các băng điện di (các vạch DNA tách biệt nhau dựa vào kích thước sau khi điện di trên thạch hay trên gel polyacrylamide) và phát hiện các băng này qua hộp đèn UV trên mặt kính lọc.

Để có thể nhuộm các băng DNA trên thạch điện di, người ta có thể cho EB pha vào trong thạch khi đổ thạch hay nhuộm thạch sau điện di bằng cách ngâm thạch điện di vào chậu nước có pha EB. Tùy thuộc vào sự chọn lựa ưu điểm nào mà người làm thử nghiệm có thể chọn cách pha EB vào thạch hay các nhuộm EB sau khi điện di. Cách pha EB vào thạch thì sẽ cho phép đọc kết quả ngay sau khi điện di nhưng lại làm cho toàn bộ hệ thống máng-khay-lượt điện di đều bị nhiễm EB. Cách nhuộm EB sau điện di thì giữ được hệ thống máng-khay-lượt điện di không bị nhiễm EB nhưng phải chờ đến 30 phút sau khi điện di để nhuộm EB rồi mới đọc được kết quả.

Thao tác an toàn với Ethidium bromide

Vì đặc điểm chính của EB chèn vào các sợi đôi DNA nên EB được xem và đã được chứng minh là một chất sinh ung thư mạnh. Do vậy người sử dụng EB làm thí nghiệm phải tuân theo các qui tắc an toàn để tránh nguy cơ tiếp xúc trực tiếp với EB. Sau đây là một số qui tắc an toàn nên tuân thủ:

- Phụ nữ đang có thai, cho con bú, hay đang dự tính mang thai không nên làm việc trong phòng thí nghiệm có sử dụng EB.
- Trong phòng thí nghiệm phải có hai thùng chứa chất thải có nhiễm EB: một thùng dành cho chất lỏng và thạch, một thùng dành cho chất rắn như găng tay, giấy lau, đồ nhựa. Tại các nước tiên tiến, hai thùng chất thải này phải được gửi đi huỷ bỏ một cách đặc biệt. Tại Việt Nam, chúng ta chưa có một cơ quan nào đứng ra xử lý các loại chất thải đặc biệt nguy hại như EB nên tạm thời có thể xử lý như sau trước khi cho vào rác y tế: đó là trước khi cho chất thải vào thùng, phải lót thùng với bao nylon dày để chất thải được cho vào bao nylon chứ không tiếp xúc

trực tiếp với thùng, ngâm chất thải với cloramin P 10% (chất thải lỏng hay thạch) hay rắc trực tiếp bột chloramin P (chất thải rắn) và giữ ít nhất 1 tháng trước để EB bị cloramin P phân huỷ trước khi giao qua xử lý rác y tế.

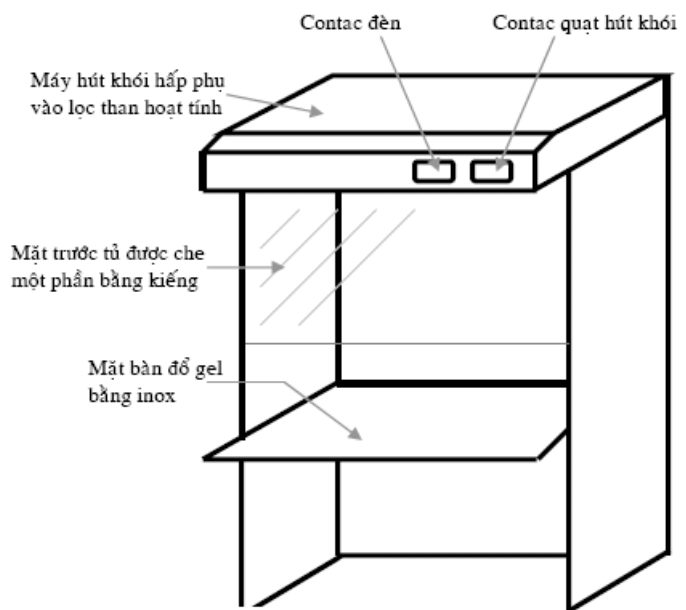
▪ Tránh tuyệt đối nguy cơ tiếp xúc trực tiếp EB qua các biện pháp như sau:

(1) Khi cân hay pha EB thì phải mang găng tay, khẩu trang, và đeo kính bảo vệ. Sau khi cân thì bất cứ các dụng cụ nào tiếp xúc với EB kể cả găng tay, khẩu trang đều phải cho vào thùng chứa chất thải rắn. Nên dùng que xúc hoá chất bằng nhựa để xúc EB khi cân và sau đó bỏ que xúc này đi cùng với găng tay chứ không nên dùng que xúc hoá chất bằng inox vì chúng ta không thể đảm bảo lau sạch EB sau khi cân.

(2) Nếu pha EB vào trong thạch thì phải dùng một chai đun thạch không nhiễm EB và sau khi đã đun tan hoàn toàn thạch, chúng ta cho thạch vào một chai thứ hai là chai thường dùng để trộn EB vào thạch. Chờ thạch trong chai thứ 2 này nguội đến 50°C rồi mới cho EB vào (thường mỗi 50ml thạch, chỉ cho 1-2µl EB 10mg/ml), tránh cho EB vào thạch khi thạch còn nóng vì nguy cơ EB bốc lên cùng với hơi nước khi thạch còn nóng. Sau khi đổ thạch vào máng, chai chứa thạch có nhiễm EB phải được súc bằng nước để làm sạch thạch và nước súc chai này phải được cho vào thùng chứa chất thải EB lỏng. Phải đeo găng, khẩu trang và kính bảo vệ khi thao tác, và sau khi thao tác, phải bỏ găng tay và khẩu trang cũng như đầu pipette hút EB vào thùng chứa chất thải EB rắn. Micropipette dùng để hút EB là chỉ được chuyên dùng để hút EB, phải được ghi chú “pipette nhiễm EB” và được giữ riêng trong một hộp có ghi chú “hộp chứa nhiễm EB”. Tốt nhất thao tác trộn EB vào thạch và đổ EB vào trong máng điện di phải được thực hiện trong một hood pha hoá chất độc có áp suất âm và khí thải qua lọc hấp phụ hoá chất trước khi đưa ra ngoài (biosafety class I). Nếu không có tủ này thì nên tự đóng một tủ đổ thạch trên nắp tủ là máy hút lọc than hoạt tính (xem **hình 62**) và lọc này phải được thay mỗi 4-6 tháng một lần. Sau khi thạch đặc hoàn toàn, nếu chưa sử dụng thì có thể giữ thạch nguyên trong khuôn rồi cho vào bao nylon dày có một ít dung dịch đệm điện di rồi hàn hay cột miệng lại. Thao tác cho thạch vào bao nylon phải thật sự thận trọng để tránh mặt ngoài bao bị nhiễm EB. Bao nylon chứa thạch phải cho vào giữ trong tủ mát 2-8°C tại một ngăn hay hộp dành riêng cho đến khi sử dụng.

Bao nylon chứa thạch sau khi dùng xong phải cho vào thùng chứa thải rắn. Thạch sau khi điện di nếu chưa dùng hết các giếng thì không lấy khỏi máng điện di mà nên để lại ngay trong máng điện di cho đến khi dùng hết (không nên quá 1 tuần). Thạch điện di sau khi dùng hết thì phải cho vào thùng chứa thải EB lỏng. Dung dịch đệm điện di cũng vậy, phải thay sau mỗi tuần và dung dịch đệm bỏ đi phải đổ vào thùng thải EB lỏng, không được đổ vào chậu rửa trong phòng thí nghiệm. Máng-khuôn-lượt điện di sau khi dùng nên ngâm rửa trong một chậu nhựa riêng có ghi chú “chậu rửa nhiễm EB” và dịch rửa này phải được đổ vào thùng chứa thải EB lỏng. Phải có một hộp chứa riêng để giữ các máng-khuôn-lượt nhiễm EB và phải ghi chú “hộp chứa nhiễm EB”. Phải mang găng tay khi sờ đến các máng hay hộp chứa “nhiễm EB” này, và găng tay sau khi dùng phải cho vào thùng chứa thải EB rắn.

(3) Nếu nhuộm EB sau điện di thì các thao tác đổ thạch, bảo quản thạch sẽ không bị nhiễm EB nên chúng ta không lo về an toàn ở các khâu này. Nhưng khi thao tác pha thuốc nhuộm, nhuộm và sau nhuộm thì chúng ta phải chú ý các biện pháp an toàn: Trước hết phải dùng một khay nhuộm riêng biệt và có ghi rõ là “khay nhuộm nhiễm EB”. Phải mang găng tay, khẩu trang và kính bảo vệ khi pha dung dịch nhuộm, thao tác nhuộm và sau nhuộm. Găng tay, khẩu trang và các đầu pipette dùng hút EB phải được cho vào thùng chứa thải rắn EB sau khi dùng xong. Micropipette dùng để hút EB là chỉ được chuyên dùng để hút EB, phải được ghi chú “pipette nhiễm EB” và được giữ riêng trong một hộp có ghi chú “hộp chứa nhiễm EB”. Phải mang găng tay khi sờ đến các vật liệu có ghi chú “nhiễm EB” này, và găng



Hình 62: Mô hình một tủ dùng để đổ gel điện di tự động. Tủ này hiện đang được công ty Nam Khoa sản xuất và cung cấp đến các phòng thí nghiệm PCR khi có yêu cầu.

tay sau khi dùng phải cho vào thùng chứa thải EB rắn. Dung dịch nhuộm sau khi dùng xong, phải đổ vào thùng chứa thải EB lỏng.

(4) Phải đặc biệt quan tâm đến an toàn khi thao tác quan sát thạch điện di trên hộp đèn UV vì đây là khâu mà người làm thí nghiệm dễ bị nguy cơ tiếp xúc trực tiếp với EB nhất. Sau đây là các khâu cần lưu ý:

(i) Phải mang găng tay khi lấy thạch sau khi điện di mang đến hộp đèn UV, và để tránh rơi vãi các giọt dung dịch có EB từ thạch xuống sàn nhà, người thao tác phải dùng một giấy thấm hứng bên dưới khi mang thạch đến hộp đèn UV và giấy thấm này phải cho vào thùng chứa thải rắn nhiễm EB. Tốt nhất cho thạch lên một khay có ghi chú “khay nhiễm EB” để mang đến quan sát trên hộp đèn UV.

(ii) Sau khi đặt thạch lên hộp đèn UV, phải dùng ngón tay chưa chạm gì đến EB để bật công tắc mở và tắt đèn UV để công tắc này không bị nhiễm EB. Nếu dùng hệ thống geldoc của Biorad thì các thao tác mở cửa, bật tắt công tắc hay nhấn các nút chỉnh trên geldoc hay trên bàn phím vi tính phải được thao tác bằng một bàn tay không nhiễm EB.

(iii) Hộp đèn UV sau khi dùng xong phải được lau sạch bằng giấy thấm nước và các giấy lau này phải được cho vào thùng chứa thải rắn nhiễm EB.

(iv) Hộp đèn UV là nơi nhiễm EB rất cao, do vậy tránh sờ hay chạm vào hộp đèn UV với tay trần.

(v) Một lưu ý cần được luôn tuyệt đối tuân theo: tránh để bàn tay mang găng đã nhiễm EB đụng đến bất cứ vật dụng gì trong phòng thí nghiệm, đặc biệt các nơi rất dễ bị sờ vào bởi tay trần như: Micropipette; tay nắm mở cửa tủ lạnh, ngăn kéo; tay nắm cửa, bút viết...

Trên là các thao tác an toàn trong phòng thí nghiệm có thao tác với EB mà phòng thí nghiệm nên tổ chức và nhân viên nên tuân theo. Nên nhớ là nhiễm EB vào cơ thể không cho tác hại tức thì mà có thể gây hậu quả sau đó nhiều năm. Do vậy “cẩn tắc vô áy náy”, tuy nhiên cũng không nên quá cực đoan và phóng đại các mối nguy có thể phòng ngừa được này để tẩy chay không dùng EB vì đây là một hoá chất hữu hiệu nhất và rẽ tiền nhất để phân tích được kết quả sau điện di.

g. Vai trò của chứng [+], chứng [-] và chứng nội tại

Chứng [+] cho PCR mix

Định nghĩa: Đó là DNA được cho vào PCR mix để cho sản phẩm khuếch đại có kích thước và trình tự đúng giống hệt sản phẩm khuếch đại của DNA đích tách chiết được từ bệnh phẩm. Thông thường chứng [+] cho PCR mix là dung dịch pha loãng ở nồng độ biết trước của plasmid có chèn đoạn DNA đích.

Vai trò: Chứng [+] cho PCR mix nên được cho vào một PCR mix cho mỗi lần chạy PCR vì các mục đích sau:

- Kiểm tra độ nhạy của PCR mix đang sử dụng xem có đạt không nếu chứng [+] được cho vào PCR mix với nồng độ LOD để cho được sản phẩm khuếch đại phát hiện được. PCR mix được cho là đạt độ nhạy khi chứng [+] cho kết quả [+] phát hiện được bằng các phương pháp trên, và không đạt độ nhạy khi chứng [+] cho kết quả [-] tính.
- Đối với PCR phát hiện sản phẩm khuếch đại bằng điện di thì kết quả điện di sản phẩm PCR của chứng [+] sẽ cho vạch điện di đúng kích thước mong đợi, nhờ vậy người đọc kết quả có thể dễ dàng so sánh với các vạch điện di sản phẩm PCR của mẫu bệnh phẩm để kết luận mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính (khi cho vạch điện di trùng với kích thước vạch điện di của sản phẩm PCR của chứng [+]) hay âm tính (khi cho vạch điện di không trùng với kích thước vạch điện di của sản phẩm PCR của chứng [+]) hay không có vạch điện di).
- Tuy nhiên chứng [+] cho PCR mix không kiểm tra được qui trình tách chiết nucleic acid từ mẫu có đạt hay không. Muốn kiểm tra được vấn đề này thì người thực hiện thử nghiệm phải có một mẫu bệnh phẩm đã biết trước [+] hay một mẫu giả bệnh phẩm [+] để thực hiện tách chiết nucleic acid mẫu này song song với các mẫu bệnh phẩm thật.

Vì các mục đích như vậy nên khi thực hiện thử nghiệm PCR, người thực hiện thử nghiệm nên luôn để dành một PCR mix để cho chứng [+].

Chứng [-] cho PCR mix

Định nghĩa: Chứng [-] cho PCR mix là mẫu nước tinh sạch hay TE 1X được cho vào PCR mix trong mỗi lần làm xét nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán.

Vai trò: Chứng [-] cho PCR mix nên được cho vào một PCR mix cho mỗi lần chạy PCR, và cho vào cuối cùng sau khi đã cho mẫu và chứng [+] vào các PCR mix tương ứng vì các mục đích sau:

- Chứng minh thao tác cho mẫu và chứng [+] vào các PCR mix không bị nhiễm chéo hay không bị nhiễm sản phẩm khuếch đại vì nếu chứng [-] cho PCR mix lại có kết quả [+] sản phẩm khuếch đại thì có thể các thao tác trên bị nhiễm chéo hay ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại.
- Chứng minh PCR mix đang sử dụng là hoàn toàn tinh sạch không bị nhiễm các DNA ngoại lai vì nếu chứng [-] lại có kết quả sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu [+] thì chứng tỏ PCR mix đã bị nhiễm các DNA ngoại lai.
- Tuy nhiên chứng [-] cho PCR mix không kiểm tra được toàn bộ qui trình thực hiện thử nghiệm PCR có bị ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại hay nhiễm chéo không. Muốn kiểm tra được toàn bộ qui trình thực hiện thử nghiệm PCR thì người thực hiện thử nghiệm phải thực hiện qui trình PCR trên một mẫu thử đã biết trước [-] tính và thực hiện song song với các mẫu bệnh phẩm.

Vì các mục đích như vậy nên khi thực hiện thử nghiệm PCR, người thực hiện thử nghiệm nên luôn để dành một PCR mix để cho chứng [-].

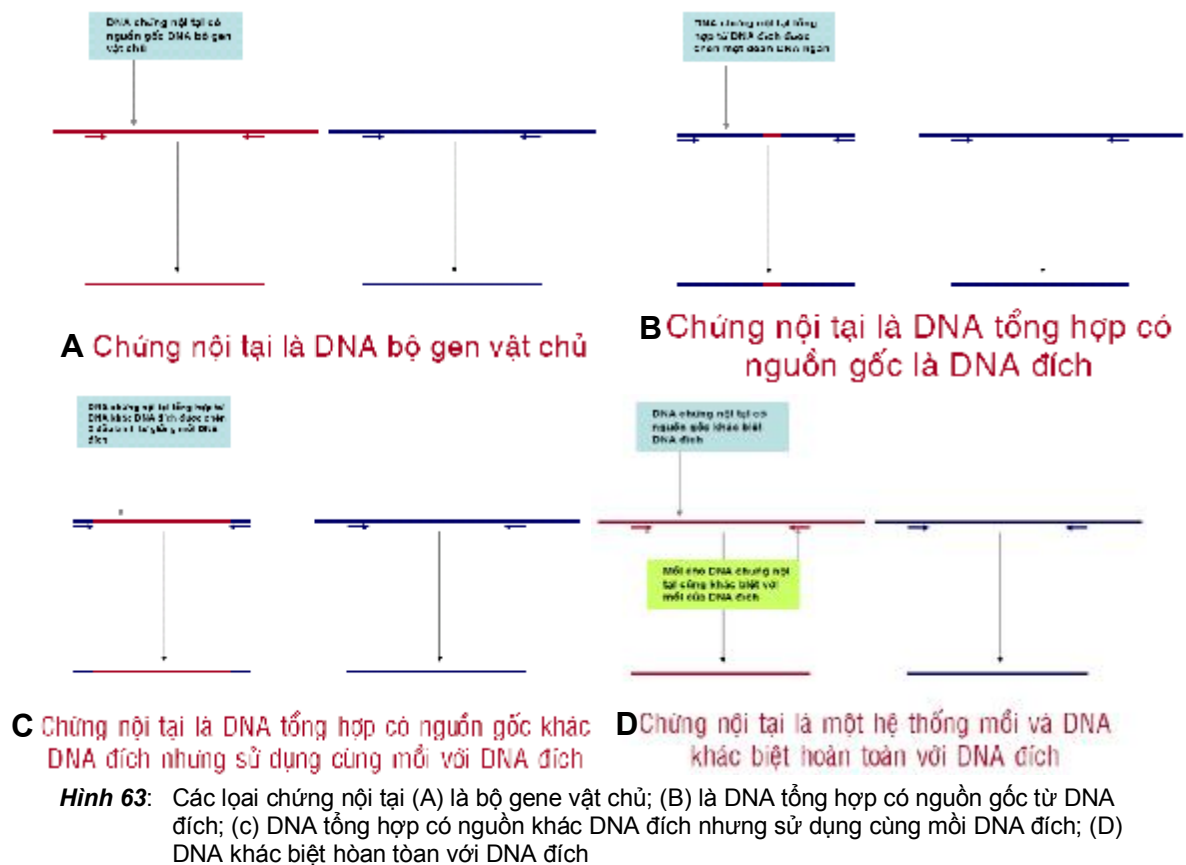
Chứng nội tại (Internal control, IC)

Định nghĩa: Là DNA được khuếch đại song song với DNA đích nhưng cho sản phẩm khuếch đại có: (1) kích thước khác (trong PCR kinh điển) sản phẩm khuếch đại của DNA đích nhờ vậy có thể phân biệt được khi điện di; và/hay (2) trình tự khác hoàn toàn hay khác một phần (trong PCR-ELISA hay trong real-time PCR) nhờ vậy có thể phân biệt được khi sử dụng dò đặc hiệu (specific probe).

Các loại chứng nội tại: Có 4 loại chứng nội tại sau đây, tùy nguồn gốc và thiết kế:

- Chứng nội tại là DNA bộ gen vật chủ (hình 63-4), ví dụ β globin gene nếu bệnh phẩm là mô lấy từ người, hay myoglobin gene của tôm nếu bệnh phẩm là các

mẫu tiêu chuẩn. Để có thể khuếch đại được DNA chứng nội tại, chúng ta phải cho thêm vào trong PCR mix một cặp mồi đặc hiệu với DNA chứng nội tại và nên thiết kế mồi sao cho nhiệt độ bắt cặp tương tự nhiệt độ bắt cặp của mồi dành cho DNA đích, và không tạo ra các dimer primer với mồi của DNA đích. Do sử dụng DNA bộ gene vật chủ nên chứng nội tại này kiểm soát được mẫu thử có đủ không, kiểm soát được hệ thống tách chiết nucleic acid trên mẫu thử có tốt không, kiểm soát được ức chế có hay không. Tuy nhiên loại chứng nội tại này không kiểm soát được hệ thống khuếch đại DNA đích vì dùng mồi khác biệt và chỉ dùng cho một số bệnh phẩm có chứa đủ lượng tế bào mô vật chủ.



- Chứng nội tại là DNA tổng hợp có nguồn gốc là DNA đích (hình 63-B), đó là DNA được tổng hợp bằng cách dùng đúng sản phẩm khuếch đại của DNA đích nhưng cắt ngắn đi hay chèn một đoạn DNA nhỏ để làm cho nó dài hơn. Chứng nội tại loại này sử dụng cùng mồi với DNA đích nên không cần thiết kế mồi để cho thêm vào PCR mix.
- Chứng nội tại là DNA tổng hợp có nguồn gốc khác DNA đích nhưng sử dụng cùng mồi với DNA đích (hình 63-C), đó là DNA được tổng hợp bằng cách dùng

sản phẩm khuếch đại của DNA khác biệt với DNA đích nhưng chèn ở hai đầu các trình tự giống hệ trình tự môi của DNA đích. Do sử dụng cùng môi với DNA đích nên không cần thiết kể môi để cho thêm vào PCR mix.

- Chứng nội tại là một hệ thống môi và DNA khác biệt với DNA đích (hình 63-D). Được khuếch đại song song với DNA đích nhưng dùng môi khác biệt DNA đích và DNA chứng nội tại có nguồn gốc khác biệt hoàn toàn với DNA đích. Để có thể khuếch đại được DNA chứng nội tại, phải cho thêm vào trong PCR mix một cặp môi đặc hiệu với DNA chứng nội tại và nên thiết kế môi sao cho nhiệt độ bắt cặp tương tự nhiệt độ bắt cặp của môi dành cho DNA đích, và không tạo ra các dimer primer với môi của DNA đích.

Vai trò chứng nội tại: Tùy được cho vào các giai đoạn nào mà chứng nội tại có thể được dùng cho các vai trò sau:

- Kiểm soát được sự tách chiết trên mẫu bệnh phẩm tốt hay không nếu được cho vào bệnh phẩm ở lượng tối thiểu vừa đủ (LOD) hay có sẵn trong bệnh phẩm.
- Kiểm soát được ức chế để xác định được kết quả là âm tính thật hay âm tính giả do có ức chế còn hiện diện trong các mẫu tách chiết nếu được cho vào PCR mix ở nồng độ LOD trước hay sau khi cho tách chiết DNA từ bệnh phẩm
- Kiểm soát được hệ thống khuếch đại DNA đích có đạt được độ nhạy hay không nếu chứng nội tại dùng chung môi với DNA đích và hiện diện trong mẫu thử hay cho vào trong PCR mix ở nồng độ LOD.
- Kiểm soát được hệ thống tách chiết đang dùng có tốt hay không và thao tác có ngoại nhiễm không nếu có sẵn trong mẫu thật làm chứng âm hay được cho vào mẫu thật làm chứng âm để được tham gia tách chiết cùng với mẫu bệnh phẩm

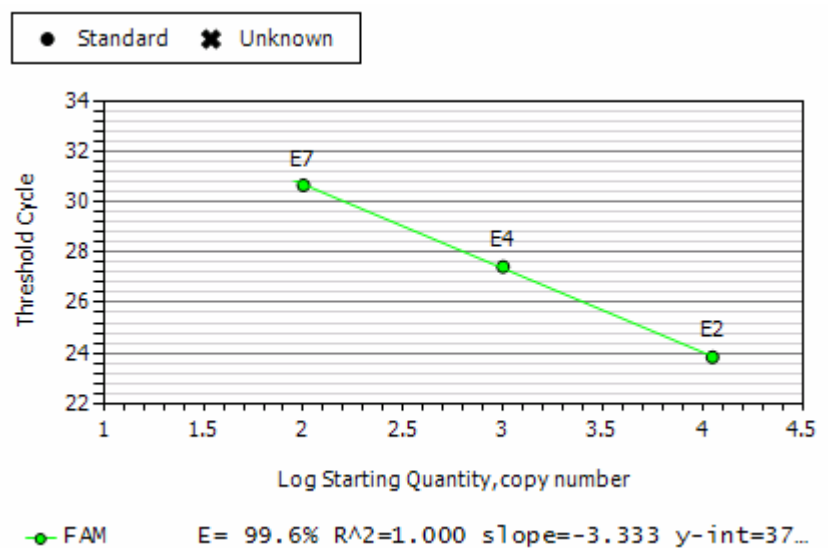
h. Các vấn đề kỹ thuật cần biết khi đọc và phân tích một kết quả real-time PCR định lượng sử dụng môi và taqman probe

Sau khi hoàn tất chương trình chạy real-time PCR trên máy, phân tích để có kết quả định lượng chính xác là một vấn đề rất quan trọng đòi hỏi người phân tích phải hiểu rõ các vấn đề lý thuyết cũng như kỹ thuật real-time PCR. Ở đây chúng tôi xin trình bày các bước phân tích một kết quả real-time PCR với môi đặc hiệu và Taqman probe gắn màu FAM phát huỳnh quang dành phát hiện/định lượng DNA đích, còn

Taqman probe gắn màu Hex phát huỳnh quang dành phát hiện sản phẩm khuếch đại từ chúng nội tại sử dụng chung môi DNA đích. Phân tích kết quả nên theo các bước sau

Trước hết chọn giếng chứng [-]: Chỉ chọn giếng để phân tích là giếng chứng [-]. Chọn kênh huỳnh quang “Fam”, chúng ta sẽ thấy giếng chứng [-] có đường biểu diễn khuếch đại không vượt qua khỏi đường huỳnh quang nền (baseline) tức là âm tính. Nếu ở kênh “Fam” mà chứng [-] có đường biểu diễn khuếch đại vượt qua khỏi baseline (dương tính) thì có nguy cơ ngoại nhiễm trong quá trình cho mẫu vào các PCR mix. Bỏ kênh huỳnh quang “Fam”, chọn kênh huỳnh quang “Hex”, lúc này chứng [-] có đường biểu diễn khuếch đại vượt qua khỏi baseline (dương tính). Nếu ở kênh “Hex” mà chứng [-] cho đường biểu diễn khuếch đại không vượt qua khỏi baseline (âm tính) thì cũng có nguy cơ là PCR mix không đủ nhạy cảm cho khuếch đại/phát hiện DNA chứng nội tại hay chứng nội tại cho vào bị hư (khi đó trong tất cả các giếng khác, đường biểu diễn khuếch đại ở kênh Hex đều âm tính, ở tình huống này phải yêu cầu nhà sản xuất cung cấp lại chứng nội tại).

Định đường chuẩn: Chỉ chọn kênh huỳnh quang “Fam” là kênh huỳnh quang cho taqman probe của DNA đích, không chọn kênh “Hex”. Chọn các giếng chuẩn và giếng chứng [-], đồng thời loại trừ các giếng có mẫu thử cũng như các giếng khác. Sau đó cho các giá trị số bản sao (copies) DNA đích chuẩn ban đầu



Biểu đồ 17: Một biểu đồ chuẩn được đánh giá đạt khi có E trong khoảng 90-105%, còn $R^2 \geq 0.99$. Phải có biểu đồ chuẩn đạt mới tiếp tục phân tích kết quả

vào các giếng chứa các độ pha loãng DNA chuẩn. Sau khi đã cho các giá trị số copies vào các giếng chuẩn, chúng ta để máy chọn đường baseline theo chế độ tự động để có biểu đồ chuẩn (gọi là standard graph). Nếu đường baseline mà máy chọn theo chế độ tự động cắt phải đường biểu diễn của chứng [-] thì người sử dụng trước hết chỉnh *baseline cycle* (các chu kỳ nền) của giếng chứng [-] để xem đường biểu diễn chứng [-] có hạ

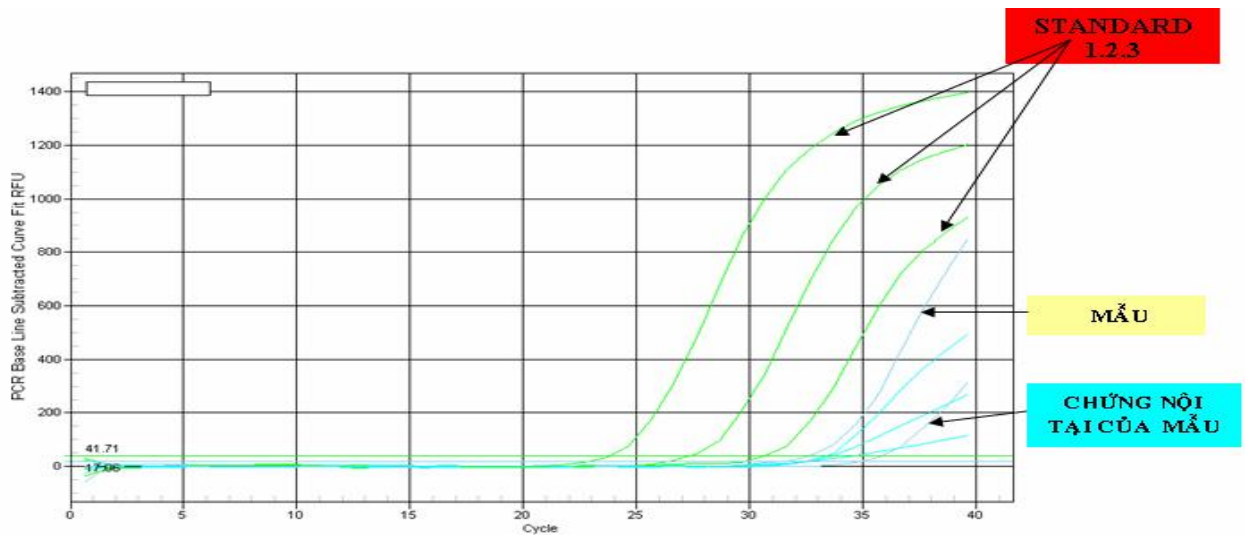
xuống không, nếu không được thì có thể phải nâng đường baseline lên để đường baseline này không cắt đường biểu diễn của chứng âm. Đánh giá biểu đồ chuẩn lý tưởng nhất (**biểu đồ 17**) là biểu đồ cho hệ số tương quan (R) là ≥ 0.990 ; đồng thời hiệu quả PCR (PCR efficiency = E) từ 90% đến 105%, độ dốc (slope) của đường biểu diễn trong khoảng -3.4 đến -3.6. Nếu đường biểu diễn không đạt thì chúng ta, trước hết xem lại từng giếng chuẩn để điều chỉnh *baseline cycle* của từng giếng kết hợp với việc nâng lên hay hạ xuống đường baseline để có thể đưa các giá trị R và E về các trị số lý tưởng. Nếu vẫn chưa đưa được R và E về các giá trị lý tưởng thì có thể thay đổi giá trị của các trị số copies trong khoảng cho phép không quá một độ pha loãng (ví dụ nếu giá trị ghi là 10 copies, có thể thay giá trị từ 10 đến 99; hay nếu giá trị ghi là 100 thì có thể thay giá trị từ 100 đến 999) để chúng ta có được đường biểu diễn chuẩn đạt lý tưởng (tuy nhiên chỉ làm cách này một cách bất khả kháng thôi vì thật ra nếu phải thay đổi giá trị số copies chuẩn có nghĩa là chúng ta đã phải chấp nhận sai số khi thao tác pipetting rồi, mà nếu chấp nhận như vậy thì chúng ta cũng sẽ phải chấp nhận có sai số trong kết quả định lượng). Chuyển biểu đồ khuếch đại sang dạng log để cố định được đường nền rồi sau đó chuyển lại dạng graph bình thường. Ghi nhận trị số baseline của đường chuẩn.

Lưu ý: Việc thực hiện PCR các mẫu chuẩn có hai ý nghĩa: (1) Cho được đường chuẩn để làm cơ sở tính toán số copies ban đầu của mẫu thử; (2) Kiểm soát được thao tác pipetting của người làm thí nghiệm có tốt không, qua trị số R và E có đạt không. Do vậy mà người làm thí nghiệm bắt buộc phải cho các mẫu chuẩn và chạy PCR. Một số công ty trong nước không hiểu được ý nghĩa của việc này nên họ cung cấp chuẩn đã cho sẵn vào PCRmix, và làm như vậy thì kết quả định lượng chắc chắn sẽ không đảm bảo được sự chính xác vì không thể kiểm soát được thao tác pipetting của người làm xét nghiệm có tốt không.

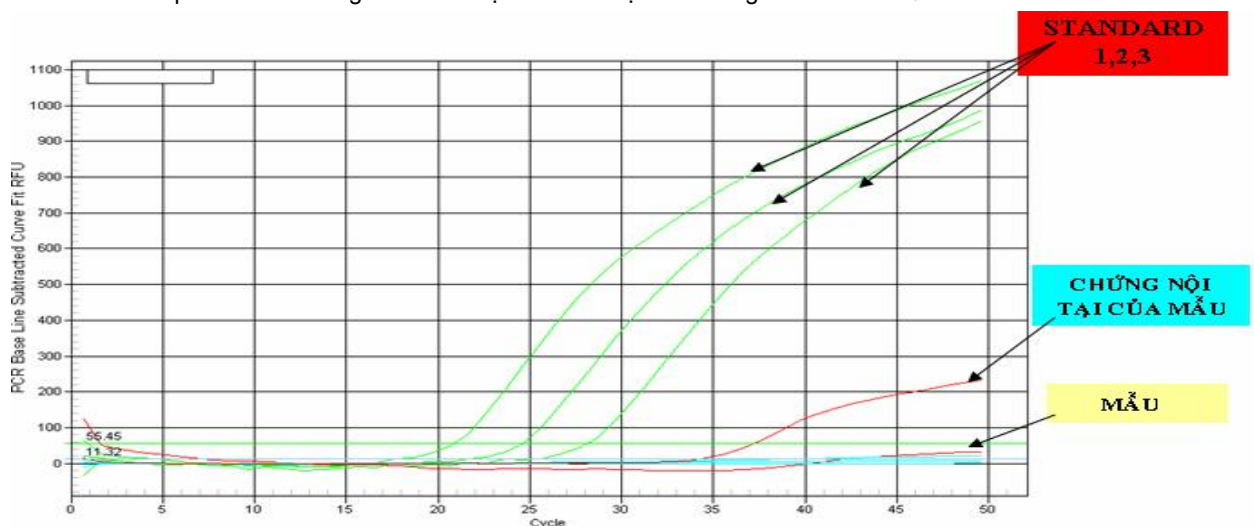
Định số lượng copies ban đầu có trong các giếng chứa mẫu thử: Sau khi đã có đường chuẩn, xác định số lượng copies ban đầu (SQ = starting quantity) của DNA đích trong các giếng mẫu thử bằng cách chọn từng giếng vào phân tích cùng với các giếng chuẩn.

Đối với các mẫu có đường biểu diễn khuếch đại cắt được đường baseline thì số lượng định lượng được chính là SQ có trong thể tích mẫu đưa vào phản ứng (**biểu đồ 18**). Để tính được số copies trong 1ml huyết thanh, chúng ta sẽ nhân SQ với hệ số K (là

hệ số có liên quan đến độ thu hồi sau tách chiết các mẫu chuẩn biết rõ số copy có chèn DNA).



Biểu đồ 18: Mẫu có đường biểu diễn khuếch đại ngóc lên cắt được baseline là mẫu định lượng dương tính. Trị số định lượng SQ được xác định là số copies có trong thể tích mẫu thử cho vào ống phản ứng. Số lượng copiesDNA có trong 1 ml máu bệnh nhân được tính bằng cách nhân SQ với 50



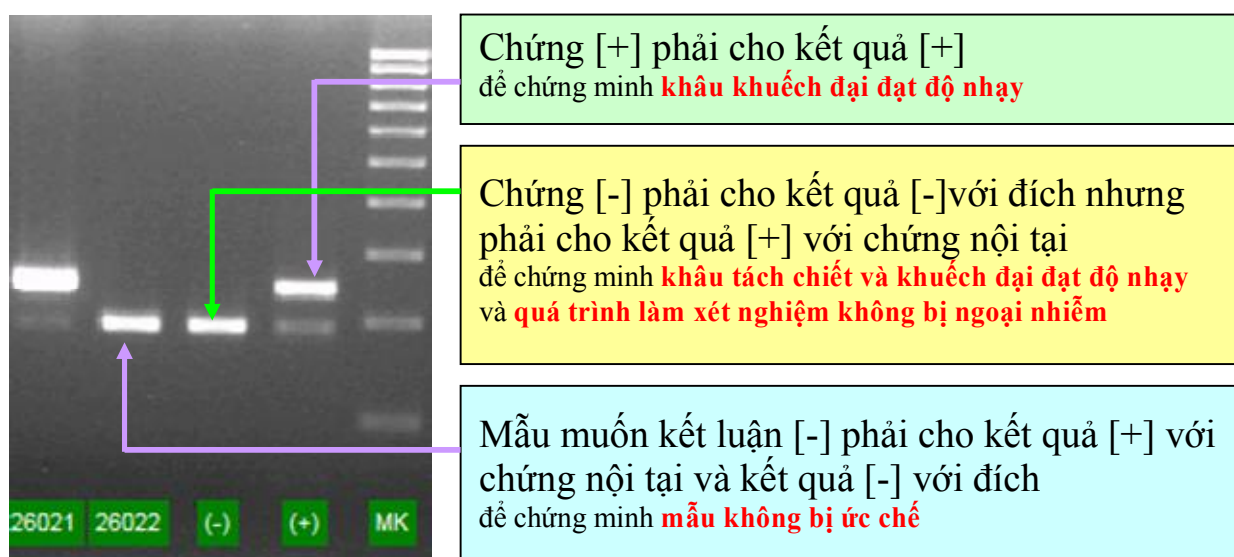
Biểu đồ 19: Mẫu chỉ có thể kết luận âm tính (đường biểu diễn khuếch đại đọc bằng kênh FAM không ngóc lên) hay dưới ngưỡng phát hiện (đường biểu diễn khuếch đại đọc bằng kênh FAM ngóc lên nhưng không cắt được đường baseline) khi có tín hiệu khuếch đại của chứng nội tại đọc được bằng kênh huỳnh quang HEX

Đối với các mẫu mà đường biểu diễn khuếch đại không ngóc lên được hay ngóc lên được nhưng vẫn không cắt được baseline thì chọn thêm kênh màu “Hex” để xem có đường biểu diễn khuếch đại của DNA chứng nội tại hay không? Nếu có thì kết luận là “mẫu âm tính” đối với các mẫu có đường biểu diễn khuếch đại không ngóc lên được (**biểu đồ 19**) và trả lời là “mẫu dưới ngưỡng phát hiện” đối với các mẫu có đường biểu diễn khuếch đại ngóc lên được nhưng không cắt được đường baseline. Nếu không có đường biểu diễn khuếch đại của chứng nội tại thì có thể có khả năng là mẫu còn chất ức chế, nên thực hiện lại tách chiết, nếu mẫu vẫn còn bị ức chế (không có tín hiệu

khuếch đại của DNA chứng nội tại) thì kết luận là “mẫu bị ức chế, xin mẫu khác để làm lại”. Đối với các mẫu có đường biểu diễn khuếch đại cắt đường baseline quá sớm hay là góc lên quá sớm cắt đường baseline rồi lại không góc lên thêm nữa, chọn giếng này, chỉnh lại baseline cycle vì có khi máy tự động chọn khoảng baseline cycle quá ngắn nên đã làm mẫu có tín hiệu khuếch đại góc lên quá sớm. Nếu sau khi chọn lại các mẫu này có đường biểu diễn khuếch đại giống các mẫu âm tính thì phân tích như các mẫu âm tính. Nếu có đường biểu diễn khuếch đại giống các mẫu dương tính thì phân tích giống các mẫu dương tính.

i. Trả lời kết quả PCR/real-time PCR chuẩn mực

PCR/real-time PCR là một xét nghiệm rất nhạy cảm và đặc hiệu. Tuy nhiên vì chất lượng xét nghiệm rất tùy thuộc vào phương pháp và trình độ thực hiện xét nghiệm, do vậy ưu điểm này chỉ đạt được khi người làm xét nghiệm có đủ tri thức để kiểm soát được các sơ sót trong quá trình thực hiện xét nghiệm thông qua các chuẩn mực bắt buộc phải có khi làm xét nghiệm.

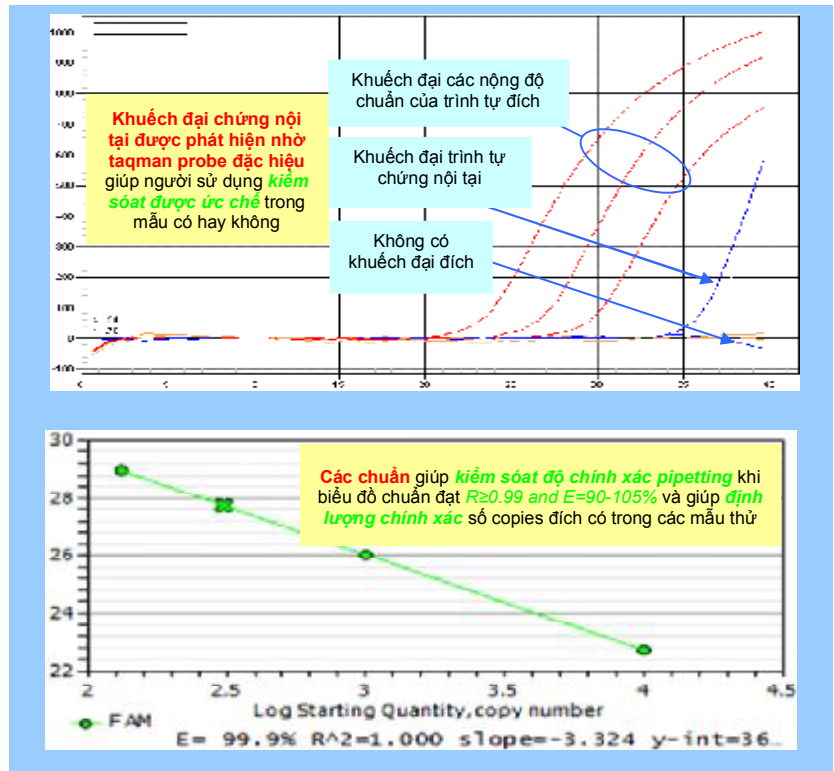


Hình 64: Một kết quả PCR định tính chuẩn mực phải thể hiện được tất cả các điểm kiểm soát quá trình làm xét nghiệm như được giải thích

Ngoài ra một đòi hỏi rất quan trọng nữa đối với real-time PCR định lượng, đó là phải có kết quả định lượng chính xác. Trong y sinh học, bất cứ một xét nghiệm định lượng nào cũng đòi hỏi phải chạy mẫu thử cùng lúc với mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn trong PCR định lượng phải cho kết quả đạt tuyến tính cao với hiệu quả PCR tuyệt đối để chứng minh người làm xét nghiệm thao tác pipetting chuẩn, không có sơ sót. Không

chỉ phải biết sử dụng các chuẩn mực để kiểm soát chất lượng của các khâu khi làm xét nghiệm, mà ngay cả trong khâu trả lời kết quả xét nghiệm, người làm thí nghiệm cũng phải thể hiện được các kiểm soát này trên phiếu trả lời.

Một kết quả xét nghiệm PCR định tính đến tay người chỉ định xét nghiệm sẽ không được xem là chuẩn mực nếu trên phiếu trả lời kết quả không thể hiện và chứng minh được các kiểm soát có thực hiện trong quá trình làm xét nghiệm. **Hình 64** minh họa và cắt nghĩa các chuẩn mực phải thể hiện trên kết quả xét nghiệm PCR định tính.



Biểu đồ 20: Minh họa một trình bày kết quả PCR định lượng chuẩn mực với biểu đồ chuẩn chứng minh mẫu luôn chạy chung với chuẩn và thao tác pipetting được kiểm soát chuẩn mực (B), nhờ vậy mà kết quả định lượng là chính xác (A)

Một kết quả xét nghiệm PCR định lượng khi đến tay người chỉ định xét nghiệm sẽ không được xem là chuẩn mực nếu trên phiếu trả lời kết quả không thể hiện và chứng minh được là

- (i) mẫu thử được chạy chung với mẫu chuẩn qua đường biểu diễn chuẩn có vị trí của mẫu thử,
- (ii) thao tác định lượng chuẩn mực qua hiệu quả PCR và hệ số tương quan trên biểu đồ chuẩn đạt các thông số lý tưởng, và
- (iii) nếu mẫu kết luận âm tính hay dưới ngưỡng phải có đường biểu diễn khuếch đại của chứng nội tại. Các **biểu đồ 20-A** và **20-B** minh họa và cắt nghĩa các chuẩn mực phải thể hiện trên kết quả xét nghiệm real-time PCR định lượng

Thao tác thí nghiệm chuẩn mực và thể hiện kết quả chuẩn mực, đó mới là PCR/real-time PCR chuẩn đoán.

j. Các vấn đề kỹ thuật cần biết khi sử dụng một kết quả PCR/real-time PCR chẩn đoán

PCR/real-time PCR là một công cụ tuyệt vời dùng trong chẩn đoán vì độ nhạy cảm khó có thể có một xét nghiệm nào sánh kịp, đồng thời độ đặc hiệu của PCR/real-time PCR trong chẩn đoán phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh cũng không khác gì phương pháp vi sinh nuôi cấy. Tuy nhiên việc sử dụng kết quả PCR/real-time PCR có hiệu quả hay không là rất tùy thuộc vào sự hiểu biết của người sử dụng kết quả và cho chỉ định làm xét nghiệm. Chúng tôi xin đưa ra một số minh họa trong sử dụng kết quả PCR/real-time PCR để phát hiện tác nhân vi sinh gây bệnh cho người

Kết quả PCR/real-time PCR [+] có xác định được người bị thử nhiễm tác nhân vi sinh gây bệnh?: Đúng như vậy vì PCR/real-time PCR phát hiện trực tiếp tác nhân vi sinh gây bệnh thông qua phát hiện các nucleic acid đích đặc hiệu vi sinh vật có mặt trong bệnh phẩm lấy từ bệnh nhân. Tuy xác định được là người bị thử thử nhiễm tác nhân vi sinh gây bệnh nhưng có xác định được người đó bị bệnh hay không để được điều trị là một vấn đề khác. Lấy ví dụ một người thử đàm phát hiện vi khuẩn lao bằng thử nghiệm PCR, kết quả [+], bác sĩ vẫn chưa nên cho chỉ định điều trị lao mà phải xem thử X quang phổi có thâm nhiễm rõ ở đỉnh phổi tiêu biểu cho nhiễm lao hay không rồi mới điều trị. Nếu X quang phổi vẫn trong và bình thường thì chỉ nên theo dõi tiếp quan xét nghiệm PCR và qua X quang phổi để xem có diễn tiến đến lao hay không trong vòng 1-3 tháng, nếu không diễn tiến đến lao thì không cần thiết để điều trị cho bệnh nhân.

Kết quả PCR/real-time PCR [-] có xác định được người bị thử không mang tác nhân gây bệnh không? Không chắc như vậy vì PCR/real-time PCR không thể cho giá trị tiên đoán âm (negative predictive value, NPV) đạt 100% cho dù lấy mẫu chính xác và thử nghiệm chính xác, vì kết quả còn tùy thuộc rất nhiều vào diễn tiến của tác nhân gây bệnh trong cơ thể người thử. Ví dụ một người HbsAg [+], thử HBV-DNA cho kết quả [-], có thể nói người đó không nhiễm HBV hay không? Chắc chắn là không, vì người đó vẫn còn mang HBV trong gan và đang ở trong giai đoạn mà miễn dịch không đặc hiệu của cơ thể còn át chế được virus nên HBV chỉ ở trong gan và tạo ra các virus không hoàn chỉnh là các kháng nguyên bề mặt không có lõi DNA mà thôi. Đây chính là các trường hợp người lành mang HBV, vẫn là người đang bị nhiễm HBV và vẫn có

nguy cơ lây nhiễm cho người khác. Do vậy chúng ta cũng rất thường gặp nhiều kết quả HBV-DNA [-] trên bệnh nhân HBsAg [+].

Sử dụng kết quả real-time PCR định lượng như thế nào cho đúng? Đây cũng là một vấn đề cần bàn. Chúng ta đều biết real-time PCR dùng trong định lượng tác nhân vi sinh đích, nay gọi là qPCR, rất có giá trị để đánh giá và theo dõi được hiệu quả điều trị các bệnh nhiễm virus như HBV, HCV, HIV. Tuy nhiên làm thế nào để biết được sự khác biệt về kết quả định lượng là có ý nghĩa? Có nhiều người nhầm lẫn vấn đề này nên cho đánh giá hay nhận xét sai lầm về hiệu quả điều trị. Kết quả định lượng chỉ được coi là khác biệt khi sự khác biệt giữa hai lần thử là trên hay bằng 100 lần, gọi là $2 \log_{10}$. Lý do phải $2 \log_{10}$ là vì khi định lượng người ta đã xây dựng đường chuẩn dựa vào các độ pha loãng theo hệ số 10 của các nồng độ DNA chuẩn, và do sai số có thể chấp nhận được là trong vòng 1 độ pha loãng nên kết quả chỉ được xem là khác biệt khi cách nhau 2 độ pha loãng, tức là $2 \log_{10}$. Chính vì vậy, để tránh cho các nhà lâm sàng đánh giá sai, hiện nay trên thế giới các nhà bệnh học chấp nhận trả lời kết quả là \log_{10} chứ không phải là số lượng copy chính xác. Ví dụ kết quả là 425,379,000 copy thì nay sẽ trả lời là 4.25 log 8, hay đơn giản là log 8. Như vậy nếu kết quả lần 2 là 117,318,000 copy thì sẽ trả lời là 1.17 log 8, hay đơn giản là log 8. Với cách trả lời này bác sĩ điều trị sẽ thấy được là lượng virus chưa giảm sau thời gian điều trị. Ngoài ra, nhà điều trị một khi đã hiểu được vấn đề này, họ sẽ không chỉ định cho bệnh nhân làm xét nghiệm định lượng trong thời gian quá ngắn chỉ trong vài tuần sau khi xét nghiệm định lượng, vì chắc chắn chỉ trong thời gian ngắn như vậy rất khó để đánh giá và so sánh kết quả định lượng với nhau.

Xây dựng một phòng thí nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán

Một phòng thí nghiệm PCR chẩn đoán sẽ bao gồm các phòng và khu vực làm việc như sau:

1. Phòng tách chiết nucleic acid

Đây là phòng làm nhiệm vụ tách chiết nucleic acid và cho các mẫu tách chiết vào các PCR/real-time PCR mix để chuẩn bị cho vào máy chạy PCR.

Phòng này cần trang bị các thiết bị và dụng cụ sau:

Một buồng thao tác PCR là một tủ thao tác khí tinh có trang bị đèn chiếu sáng và đèn cực tím, buồng này có thể đặt từ các hãng sản xuất nước ngoài hay tự đóng (*hình 65*). Kích thước tối thiểu cho 2 người làm việc. Trong buồng thao tác này phải trang bị các dụng cụ và thiết bị như sau: vortex x 2, máy ủ nhiệt khô x 2, máy hút chân không x 1, micropipette 1000ul x 2, micropipette 20-200ul x 2, micropipette 1-20ul x 1, lọ để vật liệu dơ, nhiễm x 2.

Các thiết bị khác phải có: máy ly tâm 13,000 x 2, máy ly tâm lạnh 13,000 x 1, máy ly tâm bàn 4000 cho tube 15ml x 1, tủ đông -18 đến -30°C với số lượng tùy vào mẫu nhiều hay ít, tủ mát # 280 lít cũng với số lượng tùy mẫu nhiều hay ít.

2. Phòng đặt máy PCR và real-time PCR

Đây là phòng làm nhiệm vụ chạy máy PCR và real-time PCR. Phòng này cần trang bị máy real-time PCR và máy PCR thường với số lượng tùy mẫu nhiều hay ít. Để làm chẩn đoán thì nên đặt máy của các hãng có giấy phép quốc tế (licence) được cung cấp máy PCR/real-time PCR dùng cho chẩn đoán và hiện nay Biorad là công ty có được giấy phép này.

Để đảm bảo máy chạy ổn định, không bị tắt khi cúp điện giữa chừng thì nên trang bị bộ lưu điện 6KVA và phải có dây nối đất.

Phòng đặt máy PCR nên thông với phòng tách chiết nucleic acid.

3. Phòng điện di đọc kết quả

Đây là phòng làm nhiệm vụ chế các gel điện di, thực hiện điện di và đọc kết quả điện di. Phòng này phải trang bị các thiết bị và dụng cụ sau:

Một buồng thao tác điện di: là một tủ thao tác khí tinh có trang bị đèn chiếu sáng và đèn cực tím, buồng này có thể đặt từ các hãng sản xuất nước ngoài hay tự đóng (*hình 65*). Kích thước tối thiểu cho 1 người làm việc. Trong buồng thao tác này phải trang bị các dụng cụ và thiết bị như sau: vortex x 1, bộ điện di agarose loại minigel x 2, máy ly tâm compact x 1, micropipette 1-20ul x 1, hộp nhựa đựng gel đã dùng xong x 1, hộp nhựa đựng gel chưa/đang dùng x 1, hộp nhựa đựng đầu pipette dơ x 1.

Các dụng cụ và thiết bị khác phải có là: một lò vi sóng, một hệ thống chụp ảnh gel, một tủ đổ gel, một cân điện tử để cân agarose.

Phòng điện di đọc kết quả nên tách biệt hay chỉ thông được với phòng đặt máy PCR/real-time PCR

4. Phòng pha chế thuốc thử PCR và real-time PCR

Chỉ có các phòng thí nghiệm chẩn đoán lớn mới nên có phòng này, và phải tách rất ra 3 phòng nói trên. Phòng này trước khi vào phải thay áo bằng áo chuyên chỉ dùng trong phòng này mà thôi. Các thiết bị, hóa chất, dụng cụ để pha chỉ để trong phòng, không được đem ra ngoài. Nói chung đây là phòng phải tinh sạch. Các thiết bị và dụng cụ trong phòng nên có là:

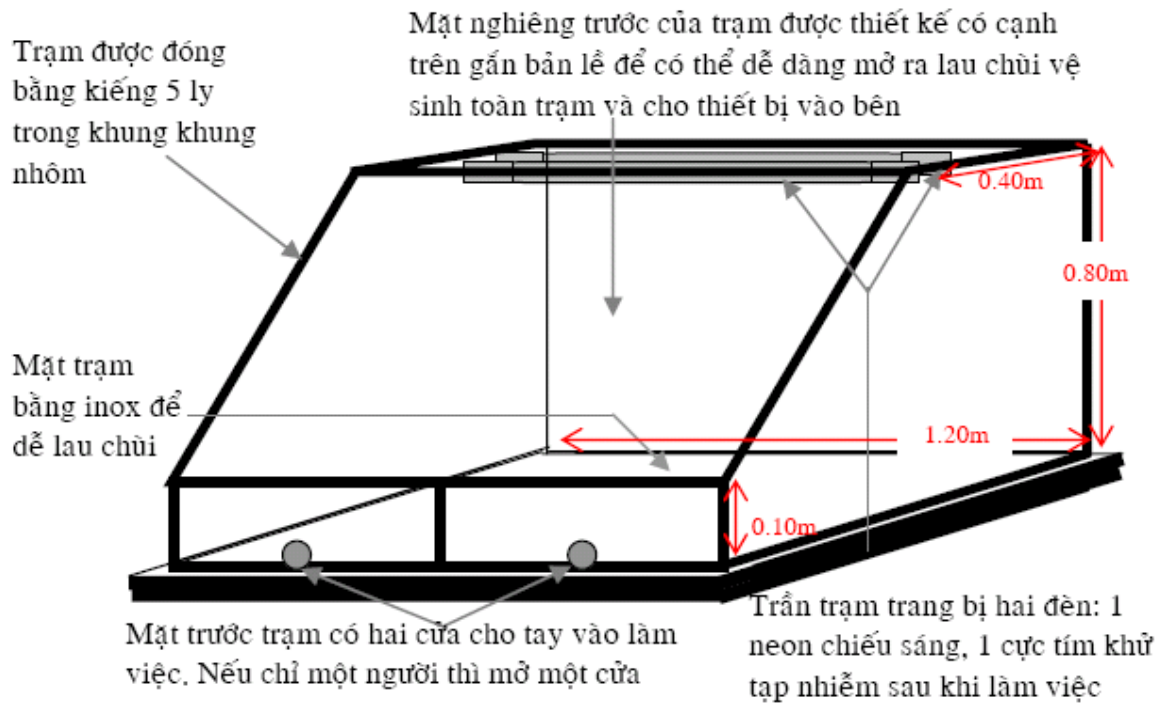
Tủ thao tác pha chế thuốc thử, nên là các clean bench dành cho 2 người có trang bị đèn cực tím và đèn chiếu sáng. Trong tủ này trang bị: vortex x 1, máy ủ nhiệt khô x 1, máy ly tâm 13000 x 1, micropipette 1000ul x 2, micropipette 20-200ul x 2, micropipette 1-20ul x 1, lọ để vật liệu dơ, nhiễm x 2.

Tủ thao tác cân chỉnh pH, cũng nên là các clean bench dành cho 1 hay 2 người có trang bị đèn cực tím và đèn chiếu sáng, bên trong có: cân điện tử x 1, máy đo pH x1, khuấy từ x 1, micropipette 1000ul x 1, micropipette 200ul x 1, micropipette 20ul x1.

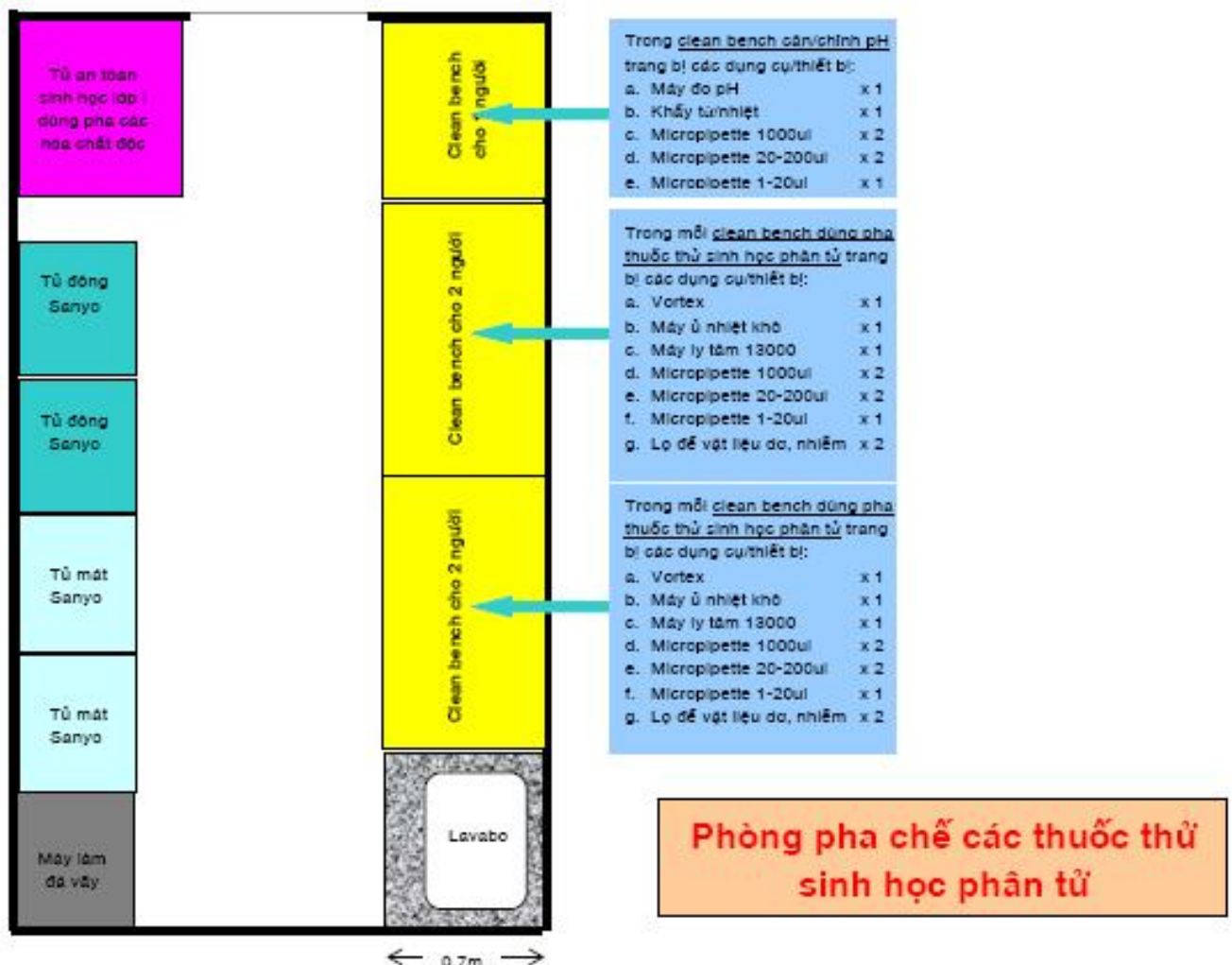
Tủ thao tác pha các hóa chất độc, nên là tủ an toàn sinh học lớp 1 bên trong cũng trang bị cân điện tử x 1, máy đo pH x1, khuấy từ x 1, micropipette 1000ul x 1, micropipette 200ul x 1, micropipette 20ul x 1, pipette aid x 1.

Các thiết bị khác, có số lượng tùy qui mô, như máy làm đá vảy, máy ly tâm 13,000 x1, máy ly tâm bàn 4000 cho tube 15ml x 1, tủ đông -18 đến -30°C với số lượng tùy vào mẫu nhiều hay ít, tủ mát # 280 lít cũng với số lượng tùy mẫu nhiều hay ít.

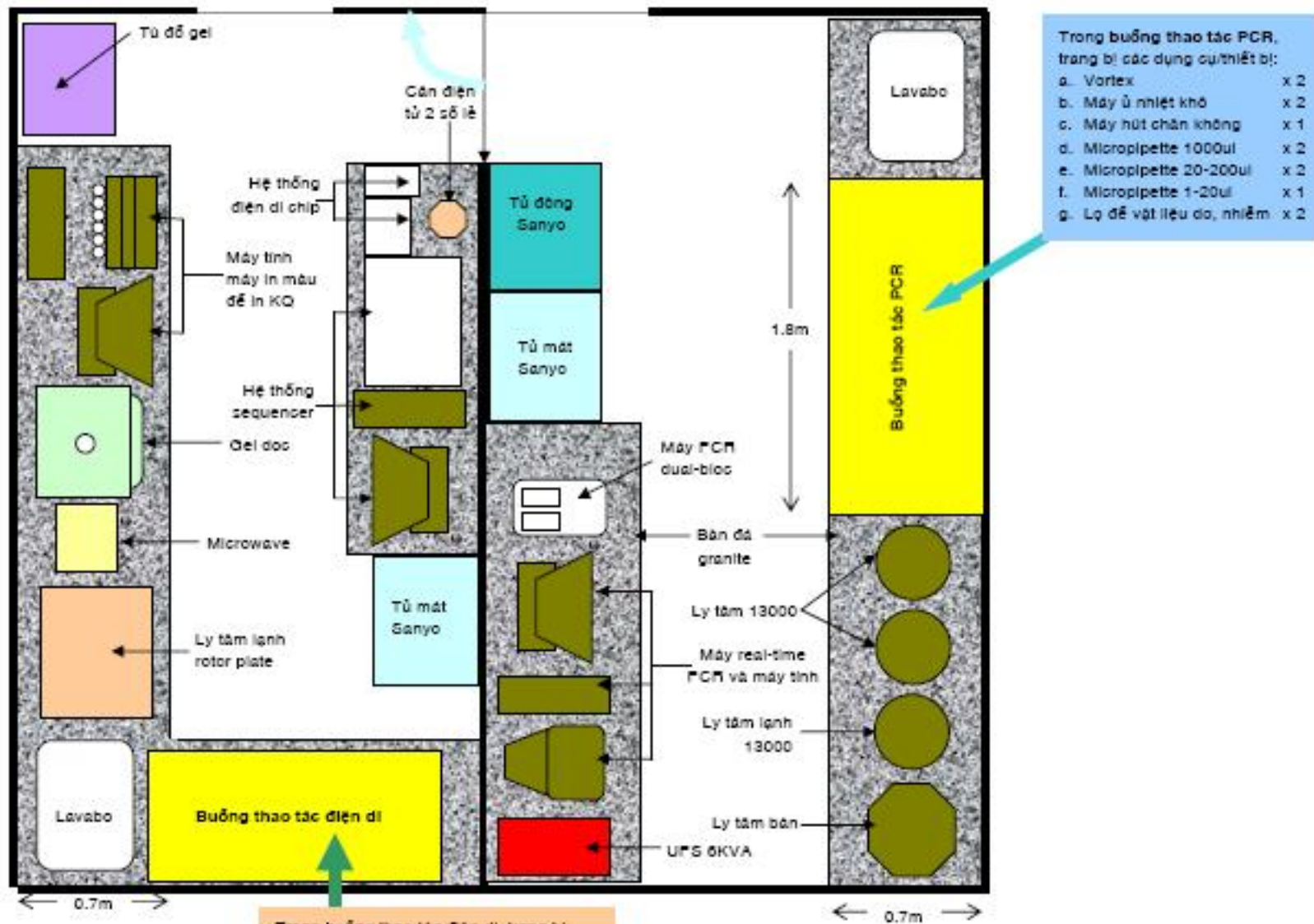
Dưới đây minh họa một phòng thí nghiệm sinh học phân tử chẩn đoán lớn bao gồm cả PCR/real-time PCR và giải trình tự (**hình 66, 67**) dành cho một bệnh viện lớn của thành phố Hồ Chí Minh mà chúng tôi đã gửi thiết kế. Ngoài ra chúng tôi cũng đưa ra thiết kế phòng thí nghiệm PCR/real-time PCR cho các phòng thí nghiệm trung bình (**hình 68**)



Hình 65: Mô hình một tủ thao tác PCR tự động



Hình 66: Sơ đồ phòng pha chế các thuốc thử sinh học phân tử



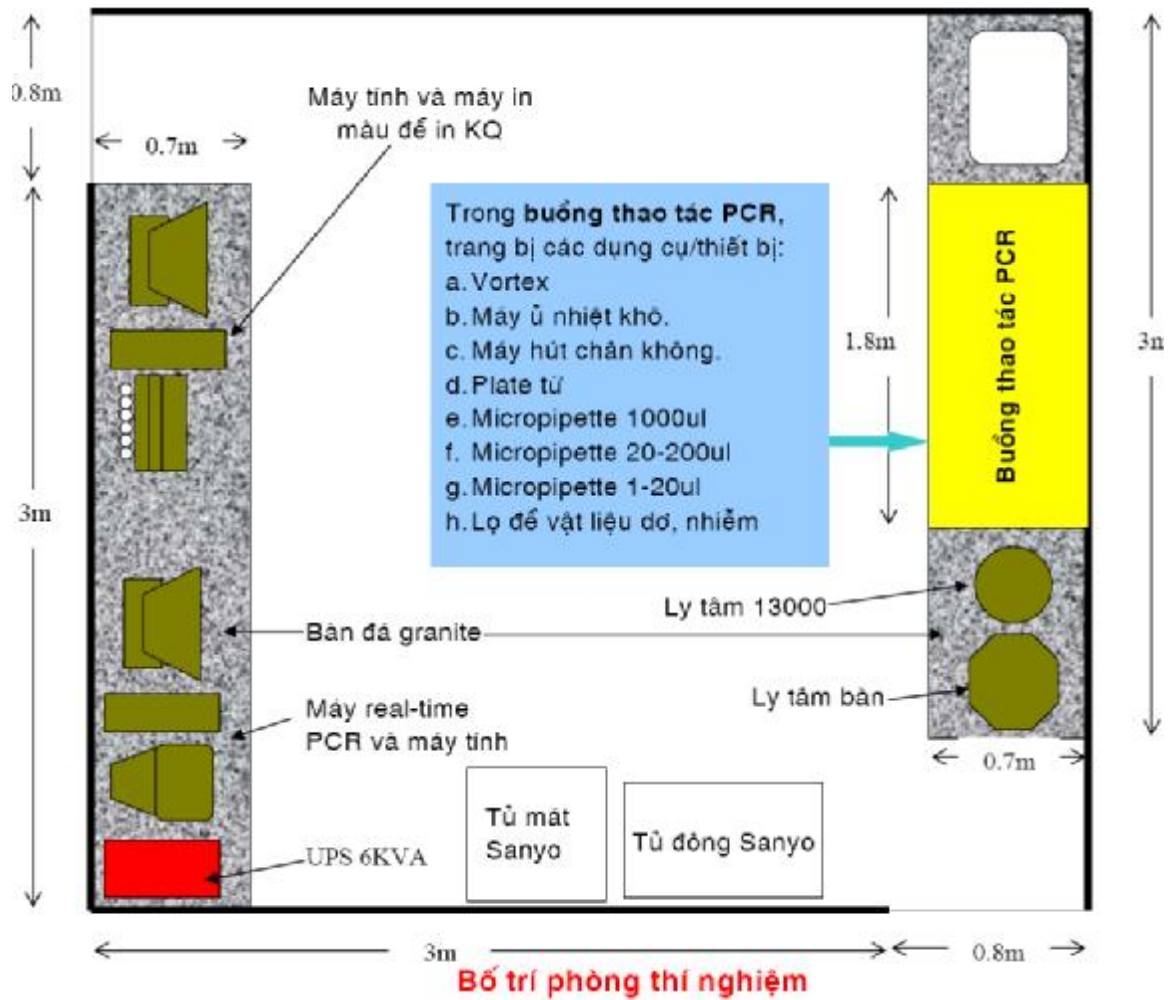
- Trong buồng thao tác PCR, trang bị các dụng cụ/thiết bị:
- a. Vortex x 2
 - b. Máy ủ nhiệt khô x 2
 - c. Máy hút chân không x 1
 - d. Micropipette 1000ul x 2
 - e. Micropipette 20-200ul x 2
 - f. Micropipette 1-20ul x 1
 - g. Lọ để vật liệu do, nhiễm x 2

Phòng phân tích kết quả và giải trình tự

- Trong buồng thao tác điện di, trang bị:
- a. Vortex x 1
 - b. Bộ điện di agarose loại minigel x 2
 - c. Máy ly tâm compact x 1
 - d. Micropipette 1-20ul x 1
 - e. Hộp nhựa đựng gel đã dùng xong x 1
 - f. Hộp nhựa đựng gel chưa/dùng dùng x 1
 - g. Hộp nhựa đựng gel do x 1

Phòng tách chiết nucleic acid và chạy PCR

Hình 67: Sơ đồ phòng tách chiết nucleic acid và phòng điện di kết hợp phòng giải trình tự



Hình 68: Sơ đồ một phòng thí nghiệm PCR và real-time PCR dành cho phòng thí nghiệm lâm sàng tại các bệnh viện tuyến thành phố hay tỉnh