

## ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG BỘ KIT NANOQUANT REAL-TIME HCV TRONG ĐỊNH LƯỢNG RNA VIRUS VIÊM GAN C BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME RT-PCR

Nguyễn Hoàng Chương<sup>1\*</sup>, Đoàn Chính Chung<sup>1</sup>, Đỗ Minh Sĩ<sup>1</sup>, Phạm Hùng Vân<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Tp Hồ Chí Minh, \*nhchuong@hcmus.edu.vn

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Dược Tp HCM

**TÓM TẮT:** Định lượng chính xác nồng độ RNA của virus viêm gan C (HCV) trong máu ở những bệnh nhân nhiễm HCV mãn tính đang điều trị bằng thuốc kháng virus hết sức cần thiết. Ở Việt Nam, việc định lượng HCV được tiến hành chủ yếu với hai bộ kit nhập ngoại là Cobas Tamen HCV (Roche) và Abbott real-time HCV (Abbott), hai bộ kit này định lượng RNA HCV bằng kỹ thuật real-time RT-PCR. Gần đây, một bộ kit định lượng RNA HCV cũng dựa trên kỹ thuật real-time RT-PCR được phát triển trong nước (NanoQuant real-time HCV) sắp được đưa vào sử dụng trong thực tế lâm sàng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá chất lượng bộ kit NanoQuant real-time HCV bằng những phương pháp chuẩn, được sử dụng trong việc đánh giá chất lượng của những bộ kit chẩn đoán phân tử về bệnh truyền nhiễm. Kết quả đánh giá chất lượng cho thấy, khoảng định lượng HCV của bộ kit NanoQuant real-time HCV là từ  $10^2$  đến  $10^8$  IU/mL với giới hạn phát hiện là 28,2 IU/mL. Bộ kit chỉ nhận bản chọn lọc vật liệu di truyền của HCV và việc định lượng HCV không bị ảnh hưởng bởi các chất ức chế có nguồn gốc nội sinh hoặc ngoại sinh có trong mẫu bệnh phẩm. Bộ kit cho kết quả âm tính trên các mẫu huyết thanh âm tính HCV, hệ số biến thiên nội phản ứng và liên phản ứng lần lượt là 4,82% và 9,18%. Bộ kit phát hiện được tất cả các genotype HCV hiện đang lưu hành tại Việt Nam như 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 6a, 6e, 6f. So sánh kết quả định lượng HCV giữa hai bộ kit NanoQuant real-time HCV và Cobas Taqman HCV cho thấy có độ tương đồng cao (hệ số tuyến tính  $R^2=0,94$ ). Kết quả đánh giá chất lượng xác nhận NanoQuant real-time HCV cho kết quả đáng tin cậy trong việc định lượng RNA HCV trong máu ở những bệnh nhân nhiễm HCV đang điều trị với thuốc kháng virus.

*Từ khóa:* Chẩn đoán phân tử, định lượng RNA, NanoQuant real-time HCV, real-time RT-PCR, virus viêm gan C.

### MỞ ĐẦU

Virus viêm gan C (Hepatitis C Virus-HCV) là virus có bộ gen là sợi đơn RNA mạch dương với kích thước khoảng 9,6 kb [3]. HCV thuộc họ Flaviviridae và bao gồm 6 genotype chính được đánh số từ 1 đến 6 [7]. Trên thế giới có khoảng 180 triệu người nhiễm HCV và đa phần người nhiễm sẽ chuyển sang dạng mãn tính. Mặc dù bệnh nhiễm HCV thường không có triệu chứng rõ ràng, tuy nhiên, đây là nguyên nhân chính gây các bệnh về gan như xơ gan và ung thư gan [9]. Phương thức điều trị hiện nay với peginterferon kết hợp ribavirin cần có sự định lượng HCV vì nó cần thiết để tiên đoán đáp ứng trước điều trị, theo dõi trong điều trị và đánh giá hiệu quả sau điều trị.

Việt Nam là quốc gia có tỷ lệ nhiễm HCV cao, với khoảng 5% dân số nhiễm HCV (Phạm Hùng Vân, thông tin cá nhân). Hiện nay, việc đánh giá hàm lượng HCV ở bệnh nhân người

Việt Nam đang điều trị được thực hiện chủ yếu với hai bộ kit ngoại nhập là Cobas Taqman HCV (Roche) và Abbott real-time HCV (Abbott). Những bộ kit này đo lượng virus thông qua bộ gen RNA của chúng bằng kỹ thuật real-time RT-PCR. Kết quả định lượng HCV từ hai bộ kit ngoại nhập này là chính xác và có độ tin cậy cao, tuy nhiên, chi phí chẩn đoán với hai bộ kit này cao và làm tăng gánh nặng cho bệnh nhân. Gần đây, một bộ kit định lượng HCV được phát triển trong nước có tên là NanoQuant real-time HCV sắp được đưa vào sử dụng trong thực tế lâm sàng, bộ kit này định lượng HCV cũng bằng kỹ thuật real-time RT-PCR thông qua bộ gen RNA HCV. Theo công bố của nhà sản xuất, bộ kit này định lượng chính xác và ổn định hàm lượng HCV trong máu người nhiễm. Hơn nữa, giá thành dự kiến thấp hơn so với kit nhập ngoại sẽ là ưu điểm không những làm giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân mà còn tăng

cơ hội điều trị cho các bệnh nhân có nguồn thu nhập thấp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của bộ kit NanoQuant real-time HCV trong định lượng HCV. Các chỉ tiêu đánh giá là khoảng định lượng virus, giới hạn phát hiện, độ đặc hiệu, độ chính xác, tính bao phủ các genotype HCV. Ngoài ra, chúng tôi cũng so sánh kết quả định lượng HCV giữa hai bộ kit là NanoQuant real-time HCV và Cobas Taqman HCV.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Chuẩn HCV của Tổ chức y tế Thế giới, các mẫu huyết thanh lâm sàng và các bộ kit chẩn đoán

Chuẩn HCV của WHO (mã số 06/102) được mua từ Viện Quốc gia về các chuẩn và chứng Sinh học (NIBSC-Anh). Các mẫu huyết thanh lâm sàng HCV được thu nhận từ công ty Nam Khoa và lưu giữ ở  $-70^{\circ}\text{C}$ . Các mẫu huyết thanh dương tính với HCV đã đo nồng độ bằng bộ kit Cobas Taqman HCV được thu nhận, đông khô và sử dụng như các mẫu chứng dương cho các khảo sát và các mẫu huyết thanh chứa các genotype HCV như 1a, 1b, 2s, 2b, 3a, 6, 6e, 6f được cung cấp từ công ty Nam Khoa. Vật liệu di truyền của các tác nhân khác nhau cũng như các chất ức chế được cung cấp bởi công ty Nam Khoa. Bộ kit NanoQuant real-time HCV được cung cấp từ công ty Nanogen. Bộ kit Cobas Taqman HCV được mua từ công ty Roche.

### Phương pháp phát hiện và định lượng HCV

Phương pháp phát hiện và định lượng HCV trong các mẫu huyết thanh được thực hiện theo đúng hướng dẫn sử dụng của bộ kit NanoQuant real-time HCV và của bộ kit Cobas Taqman HCV.

### Xác định khoảng định lượng virus

Các mẫu huyết thanh dương tính HCV đông khô đã biết nồng độ được hoàn nguyên với nước cất và pha loãng với huyết thanh âm tính HCV để tạo ra dãy nồng độ HCV từ  $10^2$  đến  $10^8$  IU/mL. Mỗi nồng độ được định lượng 3 lần lặp lại bằng bộ kit NanoQuant real-time HCV. Sau đó, xây dựng đồ thị với trục tung là trị số định lượng trung bình của 3 lần lặp lại ở mỗi nồng độ và trục hoành là nồng độ quy ước ban đầu. Đường tuyến

tính và hệ số tuyến tính được xây dựng dựa trên đồ thị. Cuối cùng, chúng tôi kiểm tra độ trung thực của hệ số tuyến tính bằng phương pháp hồi quy đa thức sử dụng phần mềm R (The R Foundation for Statistical Computing).

### Xác định giới hạn phát hiện (LOD)

Mẫu chuẩn HCV đông khô có nồng độ virus là 260.000 IU/mL được hoàn nguyên với nước cất và pha loãng với huyết thanh âm tính HCV để tạo ra một dãy gồm các nồng độ virus 60, 50, 40, 30, 20, 10 IU/mL. Ở mỗi nồng độ chúng tôi thử nghiệm 10 lần lặp lại khả năng phát hiện HCV của bộ kit NanoQuant real-time HCV. Kết quả phát hiện HCV được xử lý bằng thống kê Probit (US Environmental Protection Agency) để tính ra giới hạn phát hiện của bộ kit.

### Khảo sát độ đặc hiệu

Khả năng nhân bản chọn lọc vật liệu di truyền HCV của bộ kit NanoQuant real-time HCV được khảo sát bằng cách thử nghiệm sự nhân bản vật liệu di truyền của các tác nhân virus, vi khuẩn, nấm bệnh và từ người của bộ kit. Khả năng định lượng HCV chính xác trong trường hợp có mặt chất ức chế có nguồn gốc nội sinh và ngoại sinh cũng được khảo sát bằng cách định lượng HCV trong các mẫu huyết thanh dương tính HCV có và không có sự hiện diện của các chất ức chế. Sau đó, kết quả định lượng giữa hai kiểu mẫu này được so sánh bằng thống kê Paired t-test (Excel). Mặt khác, chúng tôi cũng thử nghiệm khả năng phát hiện HCV trên các mẫu huyết thanh âm tính HCV để khảo sát độ đặc hiệu lâm sàng của bộ kit NanoQuant real-time HCV.

### Phân tích độ chính xác

Để khảo sát hệ số biến thiên nội phản ứng (Intra-assay coefficient of variation), chúng tôi tiến hành định lượng 20 mẫu huyết thanh dương tính HCV, mỗi mẫu tiến hành định lượng lặp lại hai lần, tính trị số định lượng trung bình của hai lần và sau đó tính trị số trung bình và độ lệch chuẩn của 20 trị số trung bình này. Hệ số biến thiên nội phản ứng là tỷ số giữa độ lệch chuẩn trên trị số trung bình của trung bình nhân với 100. Để khảo sát hệ số biến thiên liên phản ứng (Inter-assay coefficient of variation), chúng tôi tiến hành định lượng HCV ở một mẫu huyết thanh HCV nồng độ cao ( $10^7$  IU/mL) và một

mẫu nồng độ thấp ( $10^3$  IU/mL). Mỗi mẫu huyết thanh được định lượng 4 lần lặp lại trong 1 ngày trải qua 5 ngày khác nhau. Sau đó, tính trị số trung bình của từng ngày và tiếp theo tính trị số trung bình cũng như độ lệch chuẩn của 5 trị số trung bình này của mỗi mẫu. Từ trị số trung bình và độ lệch chuẩn tính ra hệ số biến thiên của từng mẫu. Hệ số biến thiên liên phản ứng là giá trị trung bình của hai hệ số biến thiên của hai mẫu.

**Khảo sát khả năng phát hiện các genotype của HCV**

Các mẫu huyết thanh dương tính HCV chứa các genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 6a, 6e, 6f được nhân bản với bộ kit NanoQuant real-time HCV để thử nghiệm độ bao phủ genotype HCV của bộ kit này.

**So sánh kết quả định lượng với bộ kit chuẩn**

Chúng tôi định lượng HCV trên 58 mẫu huyết thanh dương tính HCV bằng hai bộ kit NanoQuant real-time HCV và Cobas Taqman HCV. Sau đó, kết quả định lượng của hai bộ kit được so sánh bằng phương pháp hồi quy tuyến tính và kiểm tra bằng thống kê Bland-Altman sử dụng phần mềm XLStat (Addinsoft).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Thiết kế quy trình đánh giá chất lượng bộ kit NanoQuant real-time HCV**

*Bảng 1.* Kết quả phân tích hồi quy đa thức ( $b_2$  của phương trình bậc 2 và  $b_2, b_3$  của phương trình bậc 3 là các hệ số không tuyến tính)

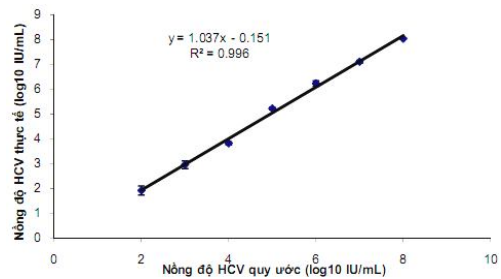
Phương trình hồi quy đa thức	Hệ số không tuyến tính	Kết quả thống kê t-test
Phương trình bậc 2: $y = 5 + 5,46x - 0,14x^2$	$b_2 = -0,14$	$P = 0,4$
Phương trình bậc 3: $y = 5 + 5,46x - 0,14x^2 - 0,16x^3$	$b_2 = -0,14$ $b_3 = -0,16$	$P = 0,4$ $P = 0,34$

Hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ thực tế và nồng độ quy ước là  $R^2=0,996$  cho thấy có tương quan chặt giữa hai dãy nồng độ này. Kết quả tuyến tính được kiểm tra bằng phương pháp phân tích hồi quy đa thức vì phương pháp này mặc định các dữ liệu là không tuyến tính và sử dụng các phương pháp thống kê để kiểm tra độ không tuyến tính [2]. Kết quả phân tích cho thấy, các hệ số không tuyến tính không có ý nghĩa thống kê ở mức  $P>0,05$  (bảng 1).

Chúng tôi thiết kế quy trình đánh giá chất lượng bộ kit định lượng theo các hướng dẫn được đề nghị trong các công bố quốc tế [2,6] bao gồm các chỉ tiêu: khoảng định lượng, giới hạn phát hiện, độ đặc hiệu, độ chính xác, độ bao phủ genotype và so sánh kết quả định lượng với bộ kit chuẩn. Thực tế là các chỉ tiêu chất lượng này cũng được sử dụng để đánh giá chất lượng các bộ kit IVD định lượng HCV thương mại [1, 8].

**Khoảng định lượng virus**

Chúng tôi thực hiện khảo sát khoảng định lượng bao gồm 7 nồng độ đi từ  $10^2$  đến  $10^8$  IU/mL. Kết quả so sánh giữa nồng độ HCV đo được thực tế và nồng độ quy ước ban đầu được trình bày trong hình 1.



*Hình 1.* Kết quả phân tích độ tuyến tính giữa nồng độ quy ước và nồng độ thực tế trong khoảng định lượng HCV của bộ kit NanoQuant real-time HCV

Kết quả hồi quy đa thức khẳng định độ tuyến tính của dãy nồng độ từ  $10^2$  đến  $10^8$  IU/mL. Như vậy, khoảng định lượng của bộ kit NanoQuant real-time HCV là từ  $10^2$  đến  $10^8$  IU/mL virus HCV trong máu.

**Giới hạn phát hiện**

Kết quả phát hiện RNA của HCV trên dãy nồng độ từ 10 đến 60 IU/mL pha loãng từ chuẩn HCV được trình bày trong bảng 2.

Tỷ lệ phần trăm phát hiện tại mỗi nồng độ được xử lý bằng thống kê Probit. Kết quả phân tích thống kê probit cho thấy, giới hạn phát hiện của bộ kit NanoQuant real-time HCV là 28,2 IU/mL.

**Độ đặc hiệu**

Kết quả khảo sát khả năng nhân bản chọn lọc của bộ kit NanoQuant real-time HCV trên nhiều loại vật liệu di truyền khác nhau được trình bày trong bảng 3.

**Bảng 2.** Kết quả phát hiện RNA HCV ở dãy nồng độ từ 10 đến 60 IU/mL

Nồng độ (IU/mL)	Số mẫu thử nghiệm	Số mẫu phát hiện HCV	Phần trăm phát hiện
60	10	10	100
50	10	10	100
40	10	10	100
30	10	10	100
20	10	7	70
10	10	3	30

**Bảng 3.** Kết quả khảo sát khả năng nhân bản chọn lọc của bộ kit NanoQuant real-time HCV

Tác nhân	Nhân bản với cặp primer đặc hiệu HCV	Nhân bản với cặp primer cho chứng nội
Hepatitis C Virus	+	+
Người	-	+
Cytomegalovirus	-	+
Human simplex virus	-	+
Hepatitis B virus	-	+
Human Immunodeficiency virus	-	+
Dengue virus	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	+

Kết quả khảo sát khả năng định lượng chính xác HCV của bộ kit NanoQuant real-time HCV trong trường hợp có sự hiện diện của các chất ức chế có nguồn gốc nội sinh (Hemoglobin,

bilirubin, triglyceride, protein, DNA người) và ngoại sinh (thuốc Interferon, Tenofovir, Lamivudine, Abarcavir, DNA *E. coli*) được trình bày trong bảng 4.

**Bảng 4.** Kết quả khảo sát khả năng định lượng trong trường hợp có chất ức chế

Nhóm thử nghiệm có chất ức chế (IU/mL)	Nhóm đối chứng không có chất ức chế (IU/mL)
Hemoglobin (2 g/L) $7,92 \times 10^4$	$4,94 \times 10^4$
Bilirubin 37 mM $6,56 \times 10^4$	$5,20 \times 10^4$
Triglycerides 342 $\mu$ M $5,90 \times 10^4$	$5,27 \times 10^4$
Protein 120 g/L $7,31 \times 10^4$	$8,42 \times 10^4$
Interferon 5 $\mu$ g/mL $4,74 \times 10^4$	$6,57 \times 10^4$
Tenofovir 5 $\mu$ g/mL $6,62 \times 10^4$	$6,84 \times 10^4$
Lamivudine 5 $\mu$ g/mL $5,92 \times 10^4$	$6,51 \times 10^4$
Abarcavir 5 $\mu$ g/mL $5,38 \times 10^4$	$5,41 \times 10^4$
DNA người 1 $\mu$ g/mL $7,48 \times 10^4$	$6,93 \times 10^4$
DNA <i>E. coli</i> 100,000 copies/mL $7,31 \times 10^4$	$6,10 \times 10^4$

Kết quả định lượng giữa hai nhóm được so sánh bằng thống kê paired t-test, kết quả xử lý thống kê cho thấy, không có sự khác biệt giữa hai nhóm ( $P > 0,05$ ). Ngoài ra, khi khảo sát trên 48 mẫu huyết thanh HCV âm tính, bộ kit NanoQuant real-time HCV đều cho kết quả âm tính trên cả 48 mẫu này.

#### Độ chính xác

Hệ số biến thiên nội phản ứng của bộ kit NanoQuant là 4,82% và hệ số liên phản ứng là 9,18%.

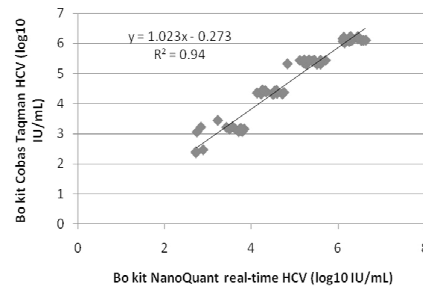
#### Độ bao phủ genotype

Bộ kit NanoQuant real-time HCV cho kết quả phát hiện dương tính trên các mẫu huyết thanh chứa các genotype của HCV như 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 6a, 6e và 6f.

#### So sánh với bộ kit chuẩn

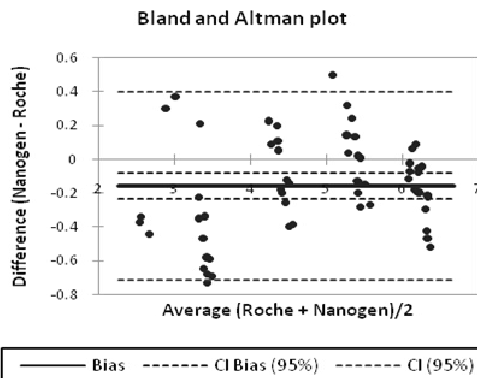
Chúng tôi sử dụng bộ kit Cobas Taqman HCV như là bộ kit chuẩn để so sánh kết quả định lượng HCV của bộ kit NanoQuant real-time HCV vì đây là bộ kit chẩn đoán phân tử IVD thương mại đã được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) của Hoa Kỳ

chấp thuận cho sử dụng trong việc định lượng HCV từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Số mẫu huyết thanh dương tính HCV được sử dụng để so sánh giữa hai bộ kit là 58 mẫu. Kết quả so sánh được trình bày bằng phương pháp hồi quy tuyến tính ở hình 2.



Hình 2. Kết quả so sánh định lượng HCV giữa hai bộ kit bằng phương pháp hồi quy tuyến tính

Hệ số tương quan giữa hai phương pháp là  $R^2 = 0,94$ , tiếp theo, chúng tôi sử dụng thống kê Bland-Altman để xem xét sự tương đồng trong định lượng giữa hai bộ kit. Kết quả phân tích được trình bày trong hình 3.



Hình 3. Kết quả thống kê Bland-Altman để phân tích độ tương đồng trong định lượng HCV giữa hai bộ kit

#### Bland-Altman analysis:

Bias: -0.158

Standard error: 0.284

Confidence interval: [-0.716, 0.399]

Theo phân tích bằng Bland-Altman độ sai lệch trung bình trong định lượng HCV giữa hai bộ kit là  $-0,158 \log_{10} \text{ IU/mL}$  với giới hạn đồng thuận (limit of agreement) đi từ  $-0,716$  đến  $0,399 \log_{10} \text{ IU/mL}$ .

#### THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát và đưa ra kết quả đánh giá chất lượng của bộ kit NanoQuant real-time HCV trong định lượng

HCV phục vụ điều trị bệnh nhiễm virus này. Những chỉ tiêu chất lượng được đánh giá rất quan trọng cho một bộ kit chẩn đoán định lượng HCV trong thực tế lâm sàng.

Khoảng định lượng của một bộ kit là dãy nồng độ mà trong đó sự định lượng HCV là chính xác và tin cậy. Nồng độ ngưỡng dưới và ngưỡng trên xác định giới hạn định lượng của bộ kit. Khoảng định lượng từ  $10^2$  đến  $10^8 \text{ IU/mL}$  HCV trong máu của bộ kit NanoQuant real-time

HCV bao phủ một dãy rộng các nồng độ HCV thực tế trong máu người bệnh. Khoảng định lượng này cũng tương đương với khoảng định lượng của các bộ kit IVD khác [1, 8]. Hệ số tương quan tuyến tính giữa 7 nồng độ trong dãy là 0,996. Hệ số tương quan cao này được kiểm tra bằng phương pháp hồi quy đa thức [2]. Phương trình tuyến tính bậc 1:  $y = -0,151 + 1,037x$ , trong khi phương trình bậc 2:  $y = 5 + 5,46x - 0,14x^2$  và bậc 3:  $y = 5 + 5,46x - 0,14x^2 - 0,16x^3$ , trong đó, giá trị  $-0,14$  của phương trình bậc 2 và  $-0,14$  và  $-0,16$  của phương trình bậc 3 là những hệ số không tuyến tính [2]. Kết quả kiểm tra bằng thống kê Student trên những hệ số này cho thấy chúng không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ). Vì vậy, khoảng định lượng đi từ  $10^2$  đến  $10^8$  IU/mL HCV của bộ kit NanoQuant real-time HCV được khẳng định.

Chúng tôi xác định giới hạn phát hiện (LOD) của bộ kit bằng phương pháp thực nghiệm bằng cách khảo sát khả năng phát hiện HCV trên một dãy nồng độ HCV pha loãng từ mẫu chuẩn HCV của WHO. Sau đó, kết quả phát hiện được xử lý bằng thống kê probit theo các hướng dẫn đánh giá chất lượng [2]. Giới hạn phát hiện của bộ kit NanoQuant real-time HCV được dự đoán nhỏ hơn 50 IU/mL nên chúng tôi tạo dãy nồng độ khảo sát là 60, 50, 40, 30, 20, 10 IU/mL bao quanh giá trị LOD dự kiến. Các bộ kit IVD thương mại cũng sử dụng phương pháp xác định LOD này và giá trị LOD của bộ kit NanoQuant real-time HCV là tương đương với các bộ kit thương mại [1, 8].

Độ đặc hiệu kỹ thuật (Analytical specificity) của một phương pháp định lượng bằng real-time PCR được định nghĩa là khả năng nhận bản chọn lọc vật liệu di truyền của tác nhân đích và khả năng định lượng chính xác trong trường hợp có chất ức chế hiện diện trong mẫu [2, 6]. Bộ kit NanoQuant real-time HCV có độ đặc hiệu kỹ thuật cao khi chỉ nhận bản RNA của HCV và định lượng chính xác HCV trong trường hợp có sự hiện diện của các chất ức chế nội sinh và ngoại sinh có trong mẫu bệnh phẩm. Ngoài ra, bộ kit này còn có độ đặc hiệu lâm sàng (Diagnostic specificity) cao khi cho kết quả phát hiện HCV âm tính trên cả 48 mẫu huyết thanh âm tính HCV.

Độ chính xác được thể hiện qua hệ số biến thiên nội phản ứng và hệ số biến thiên liên phản ứng. Hai hệ số này phản ánh các sai lệch ngẫu nhiên trong tiến trình định lượng. Các sai lệch có thể là từ người thao tác, từ các hóa chất thí nghiệm, từ dụng cụ thiết bị, do khác biệt phòng thí nghiệm hoặc do thời gian thay đổi. Đối với phương pháp định lượng thì hệ số biến thiên nội phản ứng nên nhỏ hơn 10% và hệ số biến thiên liên phản ứng nên nhỏ hơn 15% [11]. Đối chiếu với yêu cầu thì bộ kit NanoQuant real-time HCV có độ chính xác đạt yêu cầu.

Bộ kit NanoQuant real-time HCV phát hiện tất cả các genotype hiện đang lưu hành tại Việt Nam như 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 6a, 6e, 6f. Đặc tính này được giải thích là do cặp primer và Taqman probe sử dụng trong phản ứng real-time PCR được thiết kế trong vùng 5' không mã hóa thuộc bộ gen HCV. Đây là vùng trình tự nucleotide có độ bảo tồn cao giữa các genotype của HCV và thực tế là vùng này cũng được sử dụng để thiết kế các oligonucleotide nhằm phát hiện định lượng HCV trong các nghiên cứu khác [4, 10].

Kết quả so sánh định lượng HCV giữa hai bộ kit NanoQuant real-time HCV và Cobas Taqman HCV (Roche) có độ tương đồng cao thể hiện qua hệ số tương quan tuyến tính là 0,94. Trong phương trình tuyến tính, độ dốc (slope) là 1,023, rất gần với giá trị 1, điều này cho thấy, không có độ thiên vị tỷ lệ (proportional bias) trong khi hệ số chặn (intercept) là  $-0,273$ , cách xa giá trị 0 chỉ ra độ thiên vị hệ thống bất biến (constant systemic bias) [2]. Tuy nhiên, khi phân tích bằng thống kê Bland-Altman, độ thiên vị này không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% (95% CI) từ  $-0,716$  đến  $0,399$  chứa giá trị 0 [2]. Ngoài ra, độ lệch định lượng trung bình là  $-0,158 \log_{10}$  IU/mL cho thấy tương quan tốt trong định lượng giữa hai bộ kit [5]. Kết quả so sánh cho thấy hai bộ kit này có thể sử dụng thay đổi trong định lượng HCV mà không sợ mất đi tính chính xác.

## KẾT LUẬN

Bộ kit NanoQuant real-time HCV có khoảng định lượng rộng, phát hiện và định lượng HCV với độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chính xác và độ tin cậy cao trên tất cả các genotype lưu hành tại Việt Nam. Bộ kit này có thể được

sử dụng trong định lượng HCV thường quy trong lâm sàng.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi cảm ơn công ty CNSH Dược Nanogen đã cung cấp bộ kit NanoQuant real-time HCV và công ty CNSH Nam Khoa đã cung cấp các mẫu huyết thanh âm tính và dương tính HCV cũng như các vật liệu và hóa chất khác. Các khảo sát được thực hiện tại công ty Nam Khoa và phân kết quả so sánh định lượng giữa hai bộ kit NanoQuant real-time HCV và Cobas Taqman HCV được thực hiện tại công ty cổ phần y khoa Nguyễn Hoàng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott Molecular Inc., 2011. Abbott real-time HCV package insert.
- Burd E., 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.*, 23: 550-576.
- Clarke B., 1997. Molecular virology of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.*, 78: 2397-2410.
- Daniel H. D., Grant P. R., Garson J. A. et al., 2008. Quantitation of hepatitis C virus using an in-house real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in plasma samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 61: 415-420.
- Ismail A. M., Sivakumar J., Anantharam R. et al., 2011. Performance characteristics and comparison of Abbott and Artus real-time systems for hepatitis B virus DNA quantification. *J. Clin. Microbiol.*, 49(9): 3215-3221.
- Jennings L., Van Deerlin V. M., Gulley M. L., 2009. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med.*, 133(5): 743-755.
- Nelson K., Williams C., Graham N., 2007. *Infectious disease epidemiology: Theory and practice.*
- Roche Molecular System Inc. 2008. COBAS AmpliPrep/COBAS taqman HCV test package insert.
- Sy T., Jamal M. M., 2006. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.*, 3: 41-46.
- Yang J. H., Lai J. P., Douglas S. D. et al., 2002. Real-time RT-PCR for quantitation of Hepatitis C Virus RNA. *J. Virol. Methods.*, 102: 119-128.
- <http://www.salimetrics.com/documents/spitips/publications/Inter%20and%20Intra%20Assay%20Coefficients%20of%20Variability.pdf>.

### PERFORMANCE EVALUATION OF THE NANOQUANT REAL-TIME HCV ASSAY FOR QUANTITATION OF HEPATITIS C VIRUS RNA BY REAL-TIME RT-PCR

Nguyen Hoang Chuong<sup>1</sup>, Doan Chinh Chung<sup>1</sup>, Do Minh Si<sup>1</sup>, Pham Hung Van<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Science, National University Ho Chi Minh city

<sup>2</sup>University of Medicine and Pharmacy Ho Chi Minh city

#### SUMMARY

Accurate quantitation of Hepatitis C virus (HCV) RNA level is essential for measurement of active viremia in chronic HCV-infected patients undergoing antiviral therapy. In Vietnam, two molecular assays based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique are widely used to quantify HCV RNA level: Cobas Taqman HCV (Roche) and Abbott RealTime HCV (Abbott). Recently, a third assay has been introduced for HCV RNA quantitation: NanoQuant real-time HCV. In this study, performance characteristics of this assay were evaluated using methods for validation of newly developed

molecular assays for infectious diseases. Evaluating results showed that NanoQuant real-time HCV was able to quantify HCV in a linear range from  $10^2$  to  $10^8$  IU/mL with the detection limit of 28.2 IU/mL. None of the other viruses, bacteria, fungi and human genetic materials showed cross-reactivity with HCV. The assay gave no positive result with HCV-negative sera. No interference in the performance of the assay was observed in the presence of inhibitory endogenous and exogenous substances. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 4.18% and 9.18%, respectively. All of HCV genotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 6a, 6e, 6f) which are prevalent in Vietnam were detected by the assay. HCV quantitation results showed a good correlation with those determined with Cobas Taqman HCV ( $R^2=0.94$ ). These results indicate that NanoQuant real-time HCV is reliable for monitoring HCV RNA level in the treatment of patients with chronic HCV infection.

*Keywords:* HCV, molecular assay, NanoQuant real-time HCV, real-time RT-PCR, RNA quantitation.

*Ngày nhận bài:* 15-7-2013