

Tối ưu hoá phản ứng real-time PCR phát hiện virus đậu mùa khỉ gây bệnh ở người

Optimize real-time PCR reaction to detect *monkeypox virus* in human

Lê Thị Lan, Trần Thị Liễu, Nguyễn Hoàng Trung,
Nguyễn Dương Phương Anh, Trần Kim Thoa,
Đào Thanh Quyên, Phan Quốc Hoàn

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Tối ưu phản ứng real-time PCR phát hiện virus đậu mùa khỉ (Monkeypox virus) với độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật cao. **Đối tượng và phương pháp:** Mẫu chứng dương DNA plasmid tổng hợp có chứa trình tự virus đậu mùa khỉ được sử dụng trong nghiên cứu này. Ngưỡng phát hiện, độ nhạy kỹ thuật real-time PCR được thực hiện trên mẫu DNA chứng dương pha loãng giảm dần nồng độ từ 10^5 ÷ 10^0 copies/ μ L. Môi và probe sử dụng trình tự tham chiếu theo khuyến cáo của CDC. Độ đặc hiệu của kỹ thuật được đánh giá dựa trên khả năng không bắt chéo với các virus khác. Một phản ứng khuếch đại nội chuẩn để đánh giá hiệu quả tách chiết và kiểm soát chất ức chế của phản ứng real-time PCR. **Kết quả:** Ngưỡng phát hiện Monkeypox virus DNA là 250 copies/mL. Độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật tương ứng 95%, 100%. **Kết luận:** Đã thiết lập thành công quy trình real-time PCR phát hiện Monkeypox virus với độ nhạy, độ đặc hiệu kỹ thuật cao trên mẫu chứng dương DNA-plasmid tương đương với quy trình của CDC.

Từ khóa: Real-time PCR, monkeypox virus.

Summary

Objective: The study aims to the optimization of a highly sensitive and specific real-time PCR reaction for the detection of the monkeypox virus. **Subject and method:** This real-time PCR-based method was employed for the amplification of target genes, utilizing relevant negative controls, and a monkeypox virus plasmid control sourced from the CDC. Detection limits and sensitivity were determined through a range of spiking assays covering a concentration range from 10^5 ÷ 10^0 copies/ μ L. **Result:** Our data demonstrated that the Limit of Detection (LOD) of our method for detecting monkeypox virus DNA is 250 copies per milliliter (mL). The assay showed a high level of specificity at 100% and a sensitivity of 95%. **Conclusion:** In conclusion, we have successfully established a highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of monkeypox virus using a positive standard DNA plasmid template equivalent to the CDC protocol.

Keywords: Real-time PCR, monkeypox virus.

Ngày nhận bài: 18/01/2024, ngày chấp nhận đăng: 14/3/2024

Người phản hồi: Lê Thị Lan, Email: lanlt91@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

1. Đặt vấn đề

Virus đậu mùa khỉ (*Monkeypox virus-MPXV*) có vật liệu di truyền là DNA sợi đôi. Virus có thể gây bệnh cho người và nhiều loài động vật khác nhau. Các con đường lây nhiễm của MPXV từ động vật sang người, người sang người. Virus này được xác nhận có 2 biến chủng chính gồm MPXV-I có nguồn gốc từ Trung Phi, và MPXV-II có nguồn gốc từ Tây Phi, chủng MPXV-II có diễn biến nhẹ hơn, tỷ lệ tử vong và khả năng lây truyền thấp hơn [6], [7]. Virus lần đầu tiên được phân lập năm 1958 từ nốt ban của khỉ ở Viện huyết thanh Statens, Copenhagen, Đan Mạch. Ca bệnh đậu mùa khỉ đầu tiên được ghi nhận trên người vào năm 1970 tại Cộng hoà Dân chủ Congo (DRC). Năm 2003, MPXV được phát hiện tại Hoa Kỳ, đánh dấu lần đầu tiên virus này xuất hiện bên ngoài châu Phi và tiếp tục lan rộng ra khắp các châu lục [7]. Ngày 23/7/2022, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã công bố dịch bệnh đậu mùa khỉ là tình trạng khẩn cấp về sức khỏe trên toàn cầu. Đến hết năm 2022, hơn 82.000 trường hợp mắc bệnh đậu mùa khỉ đã được ghi nhận tại 110 quốc gia. Ngày 24/9/2023, Việt Nam đã ghi nhận ca nhiễm MPXV thứ tư (trong đó 2 trường hợp phát hiện năm 2022).

Trước những diễn biến phức tạp và khả năng có thể bùng phát thành dịch bệnh, yêu cầu đặt ra là phải chẩn đoán sớm (ngay từ thời kỳ ủ bệnh) để hạn chế nguy cơ lây lan. Phương pháp real-time PCR đã được Trung tâm Kiểm soát bệnh tật (CDC) khuyến cáo và đưa ra hướng dẫn, là phương pháp cho kết quả nhanh và chính xác nhất. Tuy nhiên, việc xác định MPXV và nội chuẩn được thực hiện bằng các phản ứng đơn lẻ, như vậy sẽ tốn kém về chi phí và quá trình thực hiện phức tạp. Do đó, để khắc phục nhược điểm trên chúng tôi tiến hành thử nghiệm đánh giá đa môi (multiplex real-time PCR) phát hiện đồng thời gene đích và nội chuẩn và xác định hiệu suất chẩn đoán so với phương pháp đơn gene (singleplex real-time PCR).

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Chứng dương: Sử dụng DNA plasmid chứa vùng gene đích MPX-pUC19 tổng hợp theo trình tự tham chiếu của CDC.

Chứng âm: Nhằm kiểm tra độ đặc hiệu của các bộ mồi thiết kế, để tài sử dụng các mẫu DNA được tách chiết từ virus có quan hệ di truyền gần gũi như virus varicella-zoster (VZV).

2.2. Nguyên vật liệu và thiết bị sử dụng

Vật liệu acid nucleic được tách chiết trên hệ thống tự động Samag (Sacace Biotechnologies, Italy).

Mastermix QuantiTect Probe PCR Kits (Qiagen, USA) và các trang thiết bị thường quy của xét nghiệm sinh học phân tử: Tủ an toàn sinh học cấp 2, máy ly tâm (Eppendorf, Germany), máy phân tích real-time PCR-Cycler (Applied Biosystems/CFX96-Biorad).

Chúng tôi sử dụng trình tự theo khuyến cáo của CDC như sau: Cặp mồi xuôi và mồi ngược phát hiện virus MPXV lần lượt là G2R_G forward primer: 5'-GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG-3', G2R_G reverse primer: 5'-GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA-3', mẫu dò G2R_G probe: 5'FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-3'BHQ1 [6]. Một bộ mồi nội chuẩn Rnase P được sử dụng kiểm soát quá trình tách chiết và hoạt động của enzyme khuếch đại với trình tự mỗi xuôi: 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'; mồi ngược: 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'; mẫu dò: 5'HEX - TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3'BHQ1) [9].

2.3. Khảo sát điều kiện phản ứng và đánh giá độ nhạy, độ tái lập, độ đúng và độ đặc hiệu kỹ thuật real-time PCR

Mẫu DNA tách chiết được đo nồng độ và độ sạch ở bước sóng A260, tỷ lệ độ sạch A260/A280 trong khoảng 1,9-2,1. Các điều kiện phản ứng được khảo sát như nồng độ, nhiệt độ gắn mồi/mẫu dò. Nồng độ mồi của MPXV và nội chuẩn (IC) được khảo sát trong khoảng 50-600nmol/phản ứng, nồng độ Probe được tối ưu sao cho giá trị dRn đạt mức cao. Trái với mục tiêu khuếch đại gene đích của virus trên, việc tối ưu nồng độ mồi/probe của nội chuẩn được hướng tới việc nồng độ tối thiểu cần sử dụng để đạt mục tiêu khuếch đại được gene nội chuẩn tốt mà không ảnh hưởng tới tín hiệu của gene đích.

Quy trình tách chiết DNA sử dụng bộ kit Samag viral nucleic acids extraction (Sacace Biotechnologies, Italy). Thể tích tách chiết 400µL mẫu, thời gian trong 100µL Tris EDTA 1x pH 8.0. Để xác

định được ngưỡng phát hiện (LOD) kỹ thuật, sử dụng plasmid. Cách tính số bản sao được tính theo công thức tính:

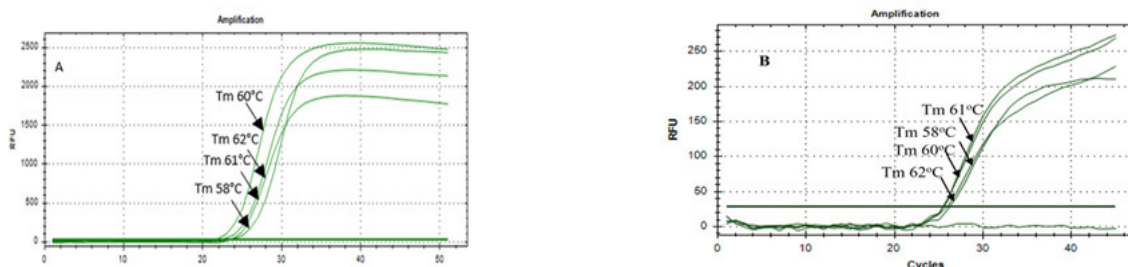
$$\text{Số bản sao mẫu chứng} = (\text{nồng độ} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{chiều dài} * 1 \times 10^9 * 650)$$

Độ nhạy kỹ thuật được đánh giá trên dải pha loãng từ $10^5 \div 10^0$ copies, trong đó từ 10^1 copies/µL được pha loãng thành 5 copies và 1 copy/µL. Giới

hạn phát hiện là nồng độ pha loãng thấp nhất cho kết quả dương tính trên 95% mẫu chạy.

3. Kết quả

3.1. Kết quả tối ưu nhiệt độ phản ứng real-time PCR đích và môi nội chuẩn



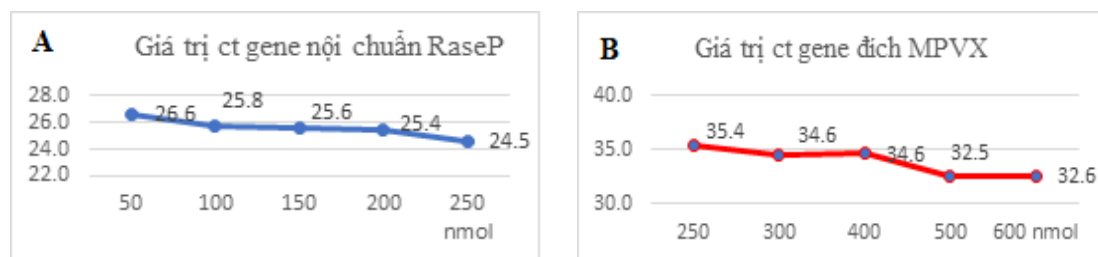
Hình 1. Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn mỗi của phản ứng real-time PCR phát hiện MPXV (hình 1A) và nội chuẩn (hình 1B)

Việc khảo sát nhiệt độ gắn mỗi dựa trên dải nhiệt độ tính toán lý thuyết là $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Kết quả cho thấy tín hiệu khuếch đại cho gene đích ở các dải nhiệt độ khảo sát đều lên tốt và đạt giá trị Ct tốt nhất ở nhiệt độ 60°C , gene nội chuẩn lên tốt ở hai nhiệt độ là 60 và 61°C . Để tiến hành đồng thời phát hiện đích MPXV và nội chuẩn trong cùng một phản ứng, nghiên cứu lựa chọn điều kiện 60°C đảm bảo hiệu suất tốt nhất.

dải nồng độ từ 50-600 nM [1], [4]. Nồng độ mỗi được lựa chọn đảm bảo hai yêu cầu: Nồng độ không được quá cao dẫn tới dư thừa nguyên liệu là tạo primer dimer và đảm bảo giá trị Ct đạt được thấp nhất. Trái lại, việc tối ưu khuếch đại chứng nội IC, nhóm nghiên cứu sẽ thực hiện nồng độ mỗi/probe sử dụng phải nhỏ nhất để đảm bảo tín hiệu nội chuẩn được khuếch đại mà không cạnh tranh nguyên liệu với đích MPXV. Kết quả cụ thể như sau:

3.2. Kết quả khảo sát nồng độ mỗi, probe sử dụng

Để xác định nồng độ mỗi tối ưu sử dụng cho phản ứng realtime PCR, tiến hành đánh giá trên

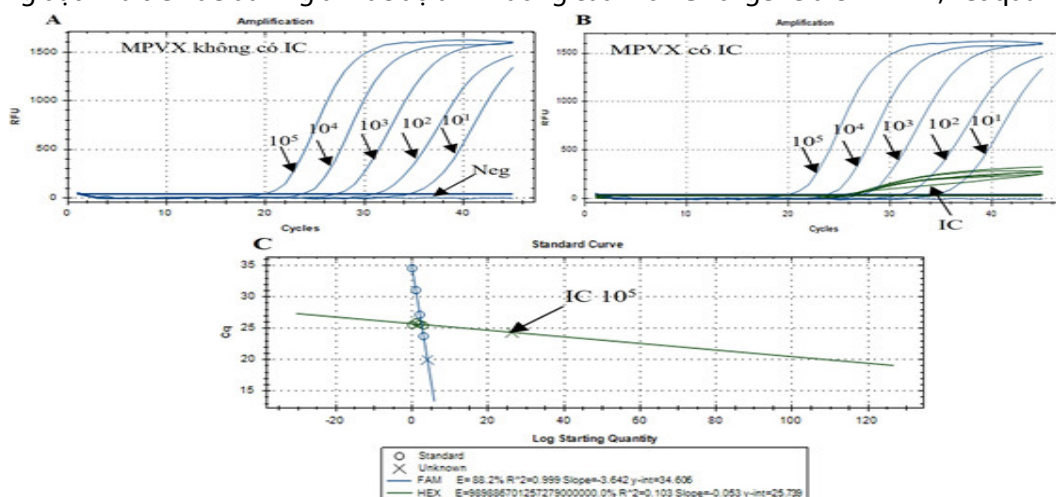


Hình 2. Kết quả lựa chọn nồng độ mỗi real-time PCR phát hiện đơn gene đích của mỗi nội chuẩn (hình 2A) và MPXV (hình 2B)

Nhận xét: Biểu đồ trên cho thấy, ở nồng độ 500nmol giá trị Ct lên thấp nhất ở gene đích MPXV và có xu thế ổn định giá trị ct ở nồng độ 600nmol. Đối với nội chuẩn, nồng độ 100nmol là giá trị thích hợp đảm bảo cho tín hiệu nội chuẩn được khuếch đại tốt mà đảm bảo nồng độ tối thiểu giảm thiểu cạnh tranh với gene đích.

Tiếp theo, nhóm nghiên cứu tiến hành tối ưu nồng độ probe sao cho dRn đạt giá trị cao nhất, kết quả cho thấy, ở nồng độ 250nmol là điều kiện tối ưu cho MPXV, nồng độ probe cho IC là 100nmol.

Sau khi tìm được nồng độ môi/probe thích hợp, thực hiện trộn các môi và probe đích và nội chuẩn để nồng độ cuối cùng đạt như trên để đánh giá mức độ ảnh hưởng của mỗi IC với gene đích MPXV, kết quả như sau:

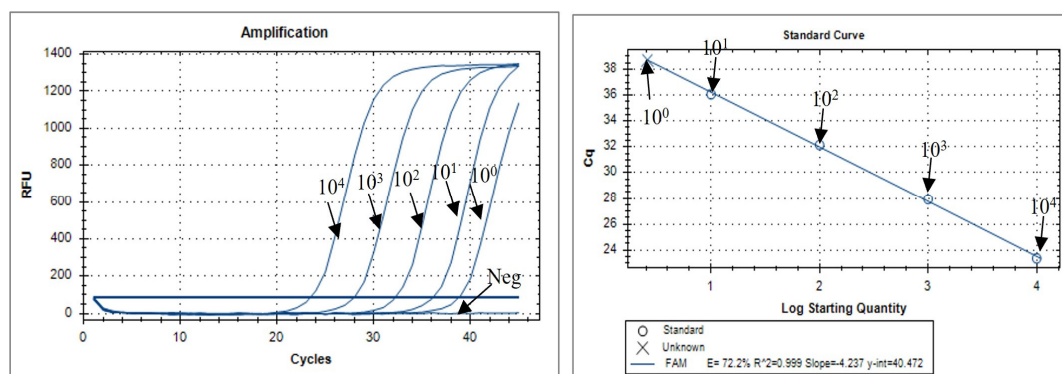


Hình 3. Kết quả real-time PCR của hỗn hợp môi/probe của MPXV (hình 3A) và MPXV kết hợp với nội chuẩn (hình 3B)

Qua kết quả hình 3B cho thấy, trong điều kiện tối ưu phản ứng multiplex real-time PCR phát hiện MPXV và nội chuẩn không có sự khác biệt với phản ứng đơn gene (hình 3A). Qua hình 3C phản ánh rõ việc tối ưu nguyên liệu cho phản ứng ưu tiên gene đích, nồng độ MPXV càng cao thì tín hiệu gene nội chuẩn càng thấp.

Như vậy, điều kiện tối ưu khuếch đại phản ứng multiplex real-time PCR trong nghiên cứu này là: Sử dụng 20-50ng/ μ L DNA/phản ứng; Điều kiện nhiệt độ 95 $^{\circ}$ C, 15 phút; (95 $^{\circ}$ C-15 giây; 60 $^{\circ}$ C-60 giây) \times 45 chu kỳ. Nồng độ môi, probe cho MPXV tương ứng 500nmol, 250nmol. Phản ứng kết hợp nội chuẩn không ảnh hưởng tới hiệu suất phản ứng khuếch đại virus nhưng vẫn đảm bảo tín hiệu nội chuẩn.

3.3. Kết quả xác định ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu kỹ thuật



Hình 4. Kết quả real-time PCR phát hiện MPXV trên các dải pha loãng 10⁴-10⁰ copies

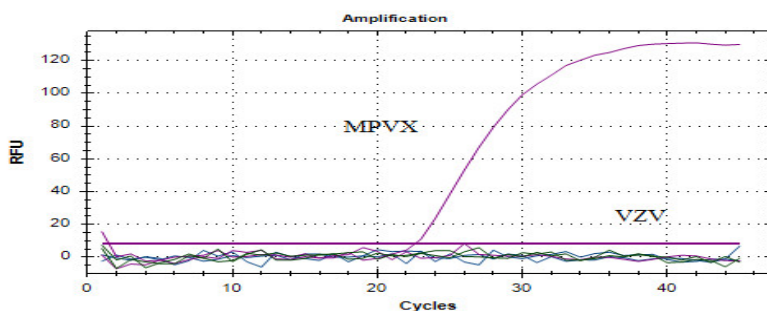
Nhận xét: Kết quả cho thấy, ở ngưỡng 10⁰ copies DNA/ μ L MPXV kỹ thuật có thể phát hiện được. LOD được ước tính bằng khả năng phát hiện nồng độ tối thiểu mà kỹ thuật có thể phát hiện được với độ tin cậy 95%

bằng cách lặp lại 20 lần với một dải nồng độ quanh ngưỡng phát hiện. Theo công thức: $LOD = \text{mean} + 3SD$ [3] cho thấy: LOD MPXV đạt 1 copy DNA/ μL (95%, $1 \div 10$). Cách tính số bản sao/mL được tính theo công thức sau:

$$\text{Kết quả (copy/ml)} = \frac{\text{Kết quả (copy/\mu l)} \times \text{Thể tích rửa giải (\mu l)}}{\text{Thể tích mẫu (ml)}}$$

Như vậy, kỹ thuật có thể phát hiện được MPXV ở ngưỡng 1 copy/ μL tương đương 250 copies/mL.

Độ đặc hiệu kỹ thuật được đánh giá dựa trên khả năng bắt chéo không đặc hiệu với DNA virus VZV. Kết quả cho thấy, các mẫu DNA virus khác đều không có tín hiệu khuếch đại với độ đặc hiệu đạt 100%, các bộ mỗi chúng tôi thiết kế có độ đặc hiệu cao, không nhầm lẫn với các mầm bệnh khác cũng như DNA của bộ gene người. Hình ảnh minh họa dưới đây:



Hình 5. Kết quả real-time PCR mỗi MPXV trên virus VZV

Nhận xét: Qua kết quả cho thấy không có kết quả dương tính giả nào được ghi nhận trên các bệnh phẩm thử nghiệm.

4. Bàn luận

Để thiết lập được quy trình real-time PCR trước hết chúng tôi phải tối ưu các điều kiện như nồng độ mỗi, nhiệt độ. Kết quả cho thấy khi thử nghiệm real-time PCR các tín hiệu huỳnh quang đẹp, rõ nét, dRn cao. Việc đánh giá độ nhạy, ngưỡng phát hiện được tiến hành trên các dải DNA pha loãng được tách chiết từ chủng. Kết quả cho thấy kỹ thuật có độ nhạy cao, xây dựng đường chuẩn cho hiệu suất phản ứng cao MPXV ($R^2 = 0,999$). Giá trị LOD của MPXV là 1 copy/ μL tương ứng 250 copies/mL. Kết quả của nghiên cứu tương đương với nghiên cứu của Margaret G. mills và cộng sự (2023) với LOD đạt 330 copies/mL và giá trị $R^2 = 0,09972$ [8]. Kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của Alberto Paniz-Mondolfi và cộng sự (2023) [1]. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu đạt 100%, không có sự bắt chéo không đặc hiệu nào giữa mỗi phát hiện MPXV với các virus khác như VZV, nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả của nhóm tác giả Katharine Uhteg (2023) [5].

Việc bổ sung nội chuẩn được chú trọng, nhằm kiểm soát chất lượng DNA tách chiết. Dựa trên trình tự gene RaseP do CDC khuyến cáo, nhóm nghiên cứu đã thiết lập phản ứng đa mỗi kết hợp mỗi đích và nội chuẩn, giá trị Ct nội chuẩn mẫu trong khoảng $24 \leq Ct_{ic} \leq 35$ là khoảng chấp nhận được.

5. Kết luận

Phương pháp real-time PCR phát hiện MPXV đã được thiết lập thành công với ngưỡng phát hiện là 1 copy/ μL tương đương với 250 copies/mL. Độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật đạt tương ứng là 95% và 100%.

Kiến nghị

Nhằm xây dựng, hoàn thiện quy trình phát hiện virus đậu mùa khỉ, chúng tôi đề xuất kiến nghị sau đây:

Thu thập mẫu bệnh phẩm từ người nhiễm virus đậu mùa khỉ: Dịch phết tổn thương trên da, dịch đường hô hấp, máu toàn phần được chống đông bằng ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Tiến hành tách chiết DNA và đánh giá hiệu quả tách chiết DNA từ các phương pháp tách chiết khác nhau: Chất lượng DNA được đánh giá dựa trên nồng độ DNA thu được (được xác định bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260nm), độ tinh sạch được đánh giá bằng tỉ lệ giữa độ hấp thụ ánh sáng ở hai bước sóng 260nm và 280nm, và khả năng khuếch đại gen đích thành công thông qua phản ứng PCR.

Tài liệu tham khảo

1. Alberto Paniz-Mondolfi (2023) *Evaluation and validation of an RT-PCR assay for specific detection of monkeypox virus (MPXV)*. J Med Virol 95(1): e28247.
2. Bustin SA (2009) *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem 55(4): 611-622.
3. Forootan A (2017) *Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)*. Biomol Detect Quantif 12: 1-6.
4. Johnson G (2013) *Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE*. Methods Mol Biol 943: 1-16.
5. Katharine Uhteg (2023) *Validation and implementation of an orthopoxvirus qualitative real-time PCR for the diagnosis of monkeypox in the clinical laboratory*. J Clin Virol 158:105327.
6. Li Y (2010) *Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA*. J Virol Methods 169(1): 223-227.
7. Luna N (2023) *Monkeypox virus (MPXV) genomics: A mutational and phylogenomic analyses of B.1 lineages*. Travel Med Infect Dis 52: 102551.
8. Margaret G Mills (2023) *Evaluation and clinical validation of monkeypox (mpox) virus real-time PCR assays*. J Clin Virol 159:105373
9. Vogels CBF (2020) *Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets*. Nat Microbiol 5(10): 1299-1305.