

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO CÁC BỘ MẪU CHUẨN RNA TỔNG HỢP IN VITRO DÙNG KIỂM ĐỊNH XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN SARS-COV-2 GÂY DỊCH COVID-19

Vũ Thị Nga^{1,2}, Lương Thị Hoài Thương^{1,2}, Nguyễn Thùy Linh^{1,2}, Hồ Sỹ Trí¹,
Hoàng Xuân Sứ¹, Phan Quốc Việt³, Hồ Anh Sơn¹, Đinh Thị Thu Hằng¹

¹ Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, Bộ Quốc phòng

² Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³ Công ty cổ phần Công nghệ Việt Á

TÓM TẮT

Dịch bệnh COVID-19 gây ra bởi một loại virus Corona mới (SARS-CoV-2) bắt đầu được báo cáo từ tháng 12/2019 tại Vũ Hán (Trung Quốc) và lây lan nhanh chóng, trở thành đại dịch toàn cầu. Chẩn đoán xét nghiệm đóng vai trò quan trọng trong phát hiện, cách ly hiệu quả, kiểm soát dịch bệnh và điều trị kịp thời. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu chế tạo các bộ mẫu chuẩn RNA tổng hợp *in vitro* và đánh giá bằng kit real-time RT-PCR phát hiện SARS-CoV-2, giúp chủ động trong phòng chống dịch COVID-19. Trình tự toàn bộ gen đích *RdRp* (RNA-dependent RNA polymerase), N (Nucleoprotein) và gen E (Envelope) sau khi tạo dòng thành công được sử dụng làm nguyên liệu cho tổng hợp RNA *in vitro* thiết lập các bộ mẫu chuẩn trong phát hiện cũng như định lượng RNA SARS-CoV-2. Bộ mẫu chuẩn được thiết lập bằng cách pha loãng theo cấp số 10 dài nồng độ $10^8 - 10^0$ copy/ μ L từ dung dịch RNA *in vitro* gốc có nồng độ từ $500 \div 1.000$ ng/ μ L (tương đương 10^{12} copy/ μ L) với độ tinh sạch A260/280 đạt $1,8 \div 2,1$. Bộ mẫu chuẩn cho kết quả phù hợp khi đánh giá với 2 bộ kit real-time RT-PCR phát hiện SARS-CoV-2 là kit HVQY-VA055 và kit của Marseille (Pháp), sử dụng ba hệ thống máy real-time PCR là Rotor GeneQ, LightCycler 480 và CFX 96. Đánh giá trên 22 mẫu lâm sàng trong đó có 12 mẫu từ bệnh nhân COVID-19 đã định lượng được nồng độ RNA SARS-CoV-2 trong khoảng từ $1,48 \times 10^3 \div 4,65 \times 10^6$ (copy/ μ L). Như vậy, bước đầu đã thiết lập thành công các bộ mẫu chuẩn RNA tổng hợp *in vitro*, góp phần phát hiện cũng như định lượng nồng độ RNA SARS-CoV-2 chính xác và định hướng điều trị cho bệnh nhân.

Từ khóa: COVID-19, chứng dương, SARS-CoV-2, RNA *in vitro*, real-time RT-PCR.

MỞ ĐẦU

Dịch bệnh do chủng virus corona mới SARS-CoV-2 (tên gọi trước đây là 2019-nCoV) gây ra từ cuối tháng 12 năm 2019, hiện vẫn đang diễn biến phức tạp và nhanh chóng lan ra trên 214 quốc gia và vùng lãnh thổ. Tính đến ngày 10/5/2020, COVID-19 là dịch bệnh có số trường hợp nhiễm được khẳng định cao nhất từ trước đến nay trên toàn cầu với hơn 4 triệu ca nhiễm và 280.454 ca tử vong, vượt qua cả dịch bệnh do SARS-CoV gây ra năm 2002-2003 (với hơn 8.000 ca nhiễm bệnh và 774 ca tử vong trên 37 quốc gia) (Lu *et al.*, 2020). Tâm dịch bắt đầu từ thành phố Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc -Trung Quốc ở các bệnh nhân có biểu hiện viêm phổi cấp không rõ nguyên nhân và từ 31/12/2019 đến 03/01/2020 có tổng cộng 44 ca đã được báo cáo tới Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) bởi các nhà chức trách Trung Quốc. Ngày 07/01/2020, các nhà khoa học Trung Quốc đã xác định được căn nguyên gây bệnh viêm phổi cấp là một chủng coronavirus hoàn toàn mới, khác biệt về mặt bệnh học cũng như đặc điểm di truyền so với các chủng coronavirus gây bệnh được biết từ trước cho đến nay (nên được tạm đặt tên là: novel coronavirus 2019, ký hiệu: 2019-nCoV) (Chen *et al.*, 2020). Một tuần sau đó các nhà khoa học Trung Quốc đã giải mã được toàn bộ hệ gen của 2019-nCoV và công bố trên Ngân hàng Gen thế giới (ký hiệu MN908947) (Fan Wu, 2020) giúp các nhà khoa học hiểu rõ hơn về chủng virus này cũng như có căn cứ để thực hiện các nghiên cứu sản xuất chế tạo kit chẩn đoán, vắc xin phòng bệnh do 2019-nCoV cũng như các phương án điều trị, phòng dịch. Cũng trong thời gian này, Thái Lan là quốc gia đầu tiên phát hiện ca nhiễm 2019-nCoV ở ngoài lãnh thổ Trung Quốc (WHO, 2020). Tiếp theo, lần lượt các nước Nhật Bản, Hàn Quốc, Hoa Kỳ, Việt Nam,... cũng công bố trường hợp nhiễm 2019-nCoV (Zhu *et al.*, 2020). Tính đến 13h00 ngày 10/5/2020, số liệu của trang web corona.kompa.ai (cập nhật từ WHO, CDC, NHC, DXY và Bộ Y Tế Việt Nam) báo cáo có tổng số ca nhiễm được khẳng định đã tăng lên 4.101.992, trong đó, dẫn đầu là Hoa Kỳ có đến 1.347.318 ca bệnh, 80.040 ca tử vong. Tiếp theo sau, 10 quốc gia ghi nhận số ca bệnh được khẳng định cao nhất lần lượt là Tây Ban Nha, Italia, Anh, Nga, Pháp, Đức, Brazil, Thổ Nhĩ Kỳ, Iran và Trung Quốc. Trong khi đó, Việt Nam mới chỉ ghi nhận 288 trường hợp nhiễm SARS-CoV-2, chủ yếu có nguồn lây từ nước ngoài xâm nhập vào Việt Nam.

Các quốc gia cũng đưa ra hành động dứt khoát, áp đặt lệnh cách ly và cấm đi lại với những người bị nhiễm SARS-CoV-2 hoặc từng đi qua vùng dịch trong vòng 14 ngày. Tuy nhiên, nguy cơ lây truyền từ người nhiễm

SARS-CoV-2 không triệu chứng trong suốt thời gian ủ bệnh từ 02-14 ngày, thậm chí kéo dài 24 ngày là một thách thức lớn đối với ngành y tế các nước. Do đó, để kiểm soát được dịch bệnh, điều quan trọng là chẩn đoán sớm và khẳng định được ca bệnh. Hiện nay xét nghiệm chẩn đoán SARS-CoV-2 chủ yếu sử dụng kỹ thuật RT-PCR và real-time RT-PCR với nhiều ưu điểm như độ nhạy và độ đặc hiệu cao, đã được công nhận là công cụ hữu hiệu trong quản lý bệnh nhân, đánh giá kết quả điều trị và kiểm soát dịch bệnh, cũng như là một tiêu chuẩn quan trọng để bệnh nhân được ra viện, hoàn thành cách ly, trở lại cộng đồng. Để đáp ứng yêu cầu về phòng chống dịch bệnh, việc phát triển kit chẩn đoán phân tử để phát hiện nhanh, chính xác SARS-CoV-2 trên cơ sở mẫu chuẩn dương là cần thiết. Hiện nay, có nhiều lựa chọn loại chứng dương sử dụng trong các kỹ thuật xét nghiệm dựa trên acid nucleic và sử dụng RNA *in vitro* là sự lựa chọn khả thi. Hướng nghiên cứu này cho phép chủ động về nguồn mẫu chuẩn chứng dương- cơ sở trong thiết kế, đánh giá kỹ thuật cũng như khắc phục được những đòi hỏi khắt khe về an toàn sinh học khi thao tác trực tiếp với mẫu bệnh phẩm. Do đó nhóm nghiên cứu đã thực hiện công trình này để thiết lập các bộ mẫu chuẩn RNA tổng hợp *in vitro* dùng để kiểm định xét nghiệm acid nucleic phát hiện SARS-CoV-2.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu: Mẫu RNA dịch nước nổi của SARS-CoV-2 được cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương, bảo quản ở nhiệt độ -80°C tại Học viện Quân y. 22 mẫu RNA tách từ mẫu bệnh phẩm dịch tỵ hầu xét nghiệm SARS-CoV-2 được lưu trữ tại Bệnh viện bệnh Nhiệt đới Trung Ương (cơ sở 2).

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu được thiết kế theo phương pháp thực nghiệm mô tả và phân tích trong phòng thí nghiệm sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử và xử lý số liệu bằng thống kê sinh học.

Tổng hợp plasmid tái tổ hợp: Các đoạn gen đích được khuếch đại, nối ghép vào vector tách dòng pGEM-T easy (Promega, Mỹ) và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt (42°C trong 90 giây). Các plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng enzyme giới hạn *EcoRI* với thành phần, điều kiện phản ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific, Mỹ) và giải trình tự, so sánh với các trình tự tham chiếu của SARS-CoV-2 trên NCBI sử dụng chương trình Blast.

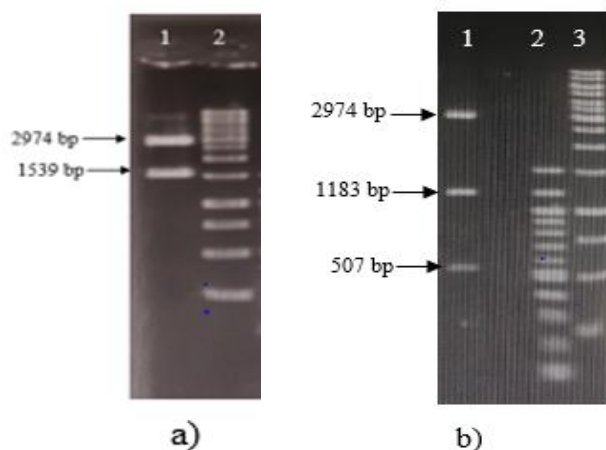
Tổng hợp RNA *in vitro*: Nồng độ, độ tinh sạch của các plasmid được xác định bằng hệ thống Quickdrop (Molecular Devices, Mỹ). Plasmid được cắt mở vòng ở một vị trí duy nhất sử dụng enzyme cắt giới hạn *NdeI*. Đầu phiên mã của sản phẩm đích là trình tự chức năng phiên mã T7, đầu còn lại tự do là trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn. Sản phẩm plasmid mạch thẳng được tinh sạch, đủ nồng độ được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình tổng hợp RNA *in vitro* bằng TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific, Mỹ). Thành phần phản ứng phiên mã gồm: 1X TranscriptAid Reaction Buffer, 10mM dNTPs mix; ~0,8 ÷ 1 μ g plasmid; TranscriptAid Enzyme Mix; DEPC- treated water vừa đủ 20 μ L, ủ hỗn hợp ở 37°C/2 giờ. Loại bỏ tồn dư DNA bằng 2 μ L DNaseI, và tiếp tục ủ 37°C/30 phút. RNA được tinh sạch và điện di trên gel agarose 1,5% trong điều kiện 75V/60 phút. Lưu ý, toàn bộ trang thiết bị, đồ tiêu hao, hóa chất sử dụng phải đảm bảo không có RNase.

Thiết lập và đánh giá các bộ mẫu chuẩn bằng real-time RT-PCR: Bộ mẫu chuẩn được thiết lập bằng cách pha loãng dải nồng độ theo cấp số 10 trong nước khử ion. RNA *in vitro* được đánh giá độ tồn dư DNA bằng kỹ thuật real-time RT-PCR tối ưu với cặp mồi và probe thiết kế theo khuyến cáo của CDC, Hoa Kỳ và WHO đã được nhóm nghiên cứu phát triển kit HVQY-VA-055 (Nalla *et al.*, 2020) và kit đối chứng real-time RT-PCR Marseille (Pháp). Thành phần phản ứng real-time RT-PCR theo kit nghiên cứu HVQY-VA-055 với tổng thể tích 25 μ L và tối ưu theo trình nhiệt: (50°C x 20 phút) (95°C x 15 phút) (94°C x 15 giây; 58°C x 60 giây) x 45 chu kỳ. Đồng thời đánh giá độ chính xác, xác định khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn và độ tương quan của 2 bộ kit khi sử dụng bộ mẫu chuẩn để định lượng trên ba hệ thống máy real-time PCR là Rotor GeneQ, LightCycler 480 và CFX 96.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu tạo dòng toàn bộ trình tự gen đích

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng gen *E* (Envelope) đầu tiên để sàng lọc các vi rút thuộc chủng coronavirus, tiếp theo là kiểm tra xác nhận chính xác bằng gen *RdRp* và *N* (Nucleoprotein). Điều này tương tự với nghiên cứu của Corman và cs. (Corman *et al.*, 2020) và cho kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu đạt 100% với SARS-CoV-2. Đoạn trình tự gen đích được chèn vào vector tách dòng pGEM-t easy có chứa trình tự khởi đầu phiên mã T7 promoter và được tạo dòng trong tế bào *E. coli*. Mẫu plasmid thu được từ quá trình tạo dòng đều được tinh sạch và kiểm tra bằng enzyme giới hạn. Kết quả, 3 mẫu plasmid chứa 3 gen đích đều được tạo dòng thành công, cho sản phẩm có kích thước đúng như thiết kế. Đồng thời, kết quả giải trình tự nucleotide các plasmid tái tổ hợp đã khẳng định chính xác kết quả tạo dòng (minh họa ở Hình 1 và Hình 2).



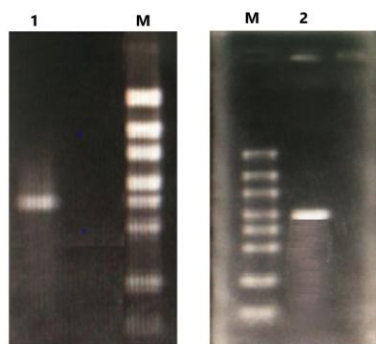
Hình 1. Kiểm tra sản phẩm cắt của plasmid tái tổ hợp chứa gen E và gen N của SARS-CoV-2
 a) 1: Sản phẩm cắt gen E bằng enzyme EcoRI, 2: Marker 1kb (Thermo Scientific, Mỹ)
 b) 1: Sản phẩm cắt gen N bằng enzyme EcoRI, 2: Marker 100bp, 3: Marker 1kb (Thermo Scientific, Mỹ)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/IND/GBRC101/2020_complete genome	1171	1171	100%	0.0	100.00%	MT509511.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/IND/GBRC102/2020_complete genome	1171	1171	100%	0.0	100.00%	MT509506.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/MD/HP00104/2020_complete genome	1171	1171	100%	0.0	100.00%	MT509486.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/MD/HP00087/2020_ORF1ab_polyprotein_(ORF1ab)_ORF1	1171	1171	100%	0.0	100.00%	MT509481.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/MD/HP00076/2020_complete genome	1171	1171	100%	0.0	100.00%	MT509475.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/MD/HP00030/2020_complete genome	1171	1171	100%	0.0	100.00%	MT509456.1
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/PA-CDC-0398/2020_complete genome	1171	1171	100%	0.0	100.00%	MT507282.1

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự đoạn chèn với trình tự trên Ngân hàng gen Quốc tế bằng phần mềm Blast

Tổng hợp RNA *in vitro*

Sau khi cắt bằng enzyme giới hạn để mở vòng plasmid, đầu phiên mã của sản phẩm đích là trình tự chức năng phiên mã promoter T7 RNA polymerase, cách trình tự đích một khoảng tối ưu, đầu còn lại là vị trí cắt enzyme giới hạn. Sản phẩm RNA *in vitro* của cả 3 gen đạt nồng độ từ 500÷1000 ng/μL (tương đương 10¹² copy/μL) với độ tinh sạch A260/280 từ 1,8÷2,1. Điện di sản phẩm RNA tinh sạch cho bằng sáng đặc hiệu, có kích thước đúng như tính toán lý thuyết (Hình 3). Như vậy, bước đầu quá trình tổng hợp RNA *in vitro* của SARS-CoV-2 đã thành công.



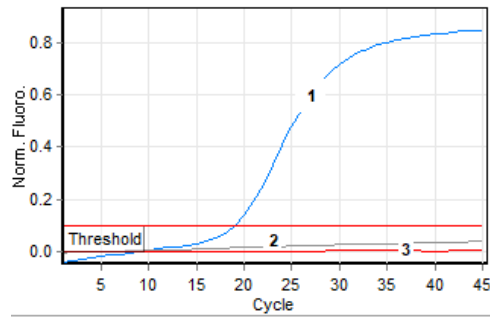
Hình 3. Kiểm tra sản phẩm RNA tổng hợp *in vitro* của gen E và N

Chú thích: 1: Sản phẩm RNA *in vitro* của gen E, M: RiboRuler RNA ladder (Thermo Scientific, Mỹ)
 2: Sản phẩm RNA *in vitro* của gen N.

Đánh giá bộ mẫu chuẩn bằng real-time RT-PCR

Từ mẫu RNA gốc chúng tôi tiến hành pha loãng theo cấp số 10 để tạo bộ panel độ nhạy gồm các dải nồng độ từ 10⁰ đến 10⁸ copy/μL. RNA tổng hợp *in vitro* được đánh giá tồn dư DNA bằng real-time RT-PCR với bước có RT enzyme và không RT enzyme. Kết quả cho thấy, mẫu chứng dương RNA *in vitro* có nồng độ 10⁶ copy/μL khi được kiểm tra bằng kỹ thuật real-time RT-PCR cho tín hiệu huỳnh quang, trong khi đó các mẫu không bổ sung

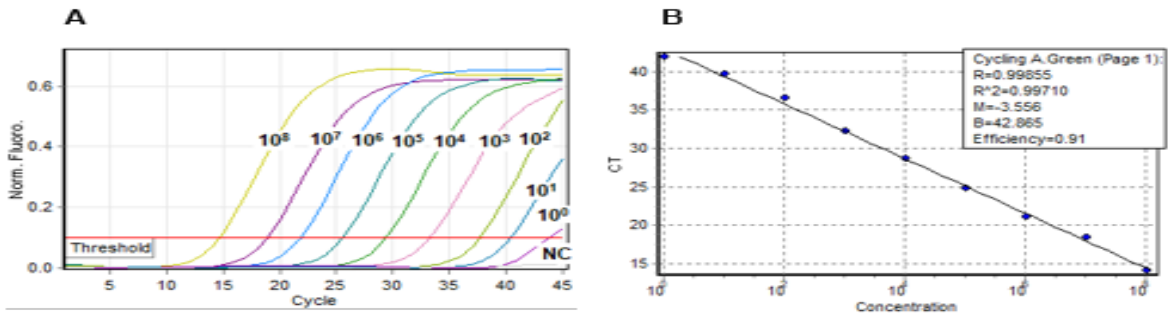
RT enzyme và đối chứng âm không xuất hiện tín hiệu huỳnh quang (Hình 4). Như vậy chúng tôi đã tổng hợp thành công chứng dương RNA *in vitro* của SARS-CoV-2 phục vụ cho việc tạo bộ mẫu chuẩn.



Hình 4. Kết quả kiểm tra RNA *in vitro* bằng kỹ thuật real-time RT-PCR

Chú thích: 1: RNA *in vitro* nồng độ 10^6 có RT enzyme, 2: RNA *in vitro* nồng độ 10^6 không có RT-enzyme, 3: Chứng âm (thay RNA bằng nước khử ion)

Trước tiên, nồng độ ngưỡng dưới và ngưỡng trên của bộ mẫu chuẩn được khảo sát để xác định giới hạn định lượng của bộ mẫu chuẩn. Khoảng định lượng là dải nồng độ mà ở đó sự định lượng RNA SARS-CoV-2 là chính xác và đáng tin cậy. Các nồng độ trong dải có sự tuyến tính với nhau hình thành nên khoảng định lượng. Trong nghiên cứu này, khoảng định lượng được khảo sát từ 10^0 - 10^8 copy/ μ L. Kết quả xác định khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn cho thấy, khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn có độ tuyến tính cao, thể hiện qua hệ số biến thiên $R^2=0,99$. Hiệu suất phản ứng real-time RT-PCR là 91% cho thấy quy trình tối ưu phản ứng real-time PCR cũng như các thao tác kỹ thuật tốt. Do đó, khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn rộng từ 10^0 - 10^8 copy/ μ L là chính xác và đáng tin cậy (Hình 5). Từ kết quả panel bộ mẫu chuẩn, ba mẫu chuẩn có nồng độ 10^3 - 10^5 copy/ μ L được lựa chọn làm đường chuẩn trong xét nghiệm lâm sàng. Độ chính xác của bộ mẫu chuẩn được thể hiện qua hệ số biến thiên CV (coefficient of variation). Độ biến thiên nội phản ứng và liên phản ứng của các bộ mẫu chuẩn đều nhỏ hơn 2% cho thấy các bộ mẫu chuẩn có chính xác cao (Bảng 1). Ngoài ra, bộ mẫu chuẩn được đánh giá trên 3 hệ thống máy real-time PCR, cho thấy có sự phù hợp với các hệ thống Rotor GeneQ, LightCycler 480 và CFX 96 khi cho hệ số biến thiên lần lượt là 2,10%; 0,24%; 2,22%, đều nhỏ hơn 5% (Bảng 2).



Hình 5. Xác định khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn

A, Biểu đồ đường cong khuếch đại tín hiệu huỳnh quang
B, Đường chuẩn xây dựng từ dải nồng độ 10^0 - 10^8 (copy/ μ L)

Bảng 1. Đánh giá độ chính xác qua nội phản ứng và liên phản ứng của bộ mẫu chuẩn gen E

Mẫu (copy/ μ L)	Mean (Ct)	SD	CV (%)
10^5	23,2	0,02	0,09
10^4	27,17	0,06	0,21
10^3	31,91	0,62	1,92

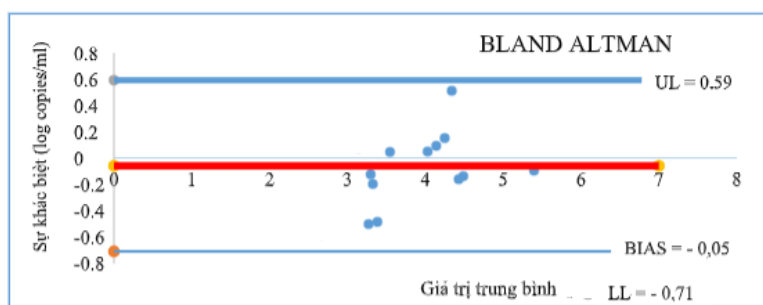
Mẫu (copy/ μ L)	Mean (Ct)	SD	CV (%)
10^5	24,19	0,26	1,08
10^4	28,06	0,29	1,04
10^3	32,40	0,35	1,09

Với 22 mẫu lâm sàng xét nghiệm SARS-CoV-2 được định lượng bằng 2 bộ kit HVQY-VA-055 và kit Marseille (Pháp), kết quả có 10 mẫu đồng âm và 12 mẫu đồng dương giữa 2 bộ kit. Để phân tích chi tiết hơn về giá trị định lượng, nồng độ 12 mẫu đồng dương có nồng độ từ $1,48 \times 10^3$ đến $4,65 \times 10^6$ copy/ μ L được phân tích bằng biểu đồ Bland Altman cho thấy có sự tương đồng giữa hai bộ kit khi sử dụng bộ mẫu chuẩn để định lượng RNA-

SARS-CoV-2, khi tất cả các giá trị đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$ (Hình 6). Như vậy, bước đầu đã định lượng thành công trên 22 mẫu lâm sàng sử dụng bộ mẫu chuẩn RNA tổng hợp *in vitro*.

Bảng 2. Đánh giá bộ mẫu chuẩn trên 3 hệ thống máy real-time PCR

Mẫu (copy/ μ L)	Rotor GeneQ	Lighcycler 480	CFX 96	Mean (Ct)	SD	CV (%)
10^5	23,20	22,80	23,77	23,26	0,49	2,10
10^4	27,17	27,30	27,21	27,23	0,07	0,24
10^3	31,91	30,8	30,64	31,12	0,69	2,22



Hình 6. Kết quả đánh giá tương quan giữa kit HVQY-VA-055 và kit Marseille (Pháp)

Hiện nay, việc lựa chọn chứng dương trong các xét nghiệm acid nucleic đóng vai trò quan trọng. Tuy nhiên, plasmid - chứng dương được sử dụng phổ biến trong các xét nghiệm phân tử không được tối ưu với RT-PCR và real-time RT-PCR vì plasmid có bản chất là DNA nên không thể kiểm soát được chất lượng của bước phiên mã ngược và một bản sao DNA không tương ứng với một bản sao RNA. Nên đối với các xét nghiệm định tính hay định lượng với mầm bệnh có hệ gen là RNA, chứng dương RNA tổng hợp *in vitro* là lựa chọn khả thi (Corman *et al.*, 2020). Đồng thời, RNA *in vitro* khắc phục được các hạn chế của việc sử dụng RNA tách chiết trực tiếp từ bệnh phẩm từ bệnh nhân dương tính hay chủng virus nuôi cấy, và RNA *in vitro* đã được chứng minh có độ ổn định cao, đồng nhất, không bị nhiễm RNA/DNA từ vật chủ hay các tác nhân khác nên cho phép định lượng chính xác nồng độ RNA SARS-CoV-2.

Để phát triển kỹ thuật real-time RT-PCR có độ nhạy, độ đặc hiệu cao trong xác định chính xác SARS-CoV-2, ngoài việc tối ưu quy trình thực hiện, các thành phần, chu trình phản ứng real-time PCR, chiến lược thiết kế mỗi probe đóng vai trò rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn trình tự đầy đủ của 3 gen đích là *E*, *RdRp* và *N* phù hợp với nhiều bộ kit phát hiện SARS-CoV-2 đã được công bố (Chu *et al.*, 2020; Corman *et al.*, 2020). Bên cạnh đó, chúng tôi tiến hành khảo sát bộ mẫu chuẩn trên 3 hệ thống máy real-time là Rotor GeneQ, Lighcycler 480, CFX 96, đây là những hệ thống máy real-time PCR phổ biến được trang bị ở các cơ sở y tế trong nước, kết quả đều thu được giá trị CV < 5%. Với kết quả này, bộ mẫu chuẩn có tiềm năng ứng dụng để phát hiện, định lượng nồng độ RNA SARS-CoV-2 trên nhiều hệ thống máy khác nhau với các bộ kit khác nhau. Bước đầu, sử dụng bộ mẫu chuẩn để định lượng nồng độ của 22 mẫu lâm sàng trên 2 bộ kit cho thấy có 10 mẫu đồng âm và 12 mẫu đồng dương. Phân tích về giá trị định lượng, nồng độ 12 mẫu đồng dương có độ tương đồng cao giữa 2 bộ kit, khi tất cả các giá trị đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$. Như vậy, khi sử dụng 2 bộ kit khác nhau để đánh giá bộ mẫu chuẩn đều cho giá trị tương đương nhau.

Kết quả nghiên cứu này giúp phát hiện sớm chính xác những trường hợp nhiễm SARS-CoV-2 góp phần kiểm soát dịch bệnh, định lượng chính xác nồng độ RNA SARS-CoV-2 giúp theo dõi quá trình điều trị và định hướng phác đồ điều trị phù hợp với từng bệnh nhân. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là bộ mẫu chuẩn đầu tiên tại Việt Nam được công bố cho phép định lượng nồng độ RNA SARS-CoV-2. Tuy nhiên, do hạn chế về thời gian nên chúng tôi chưa thực hiện đánh giá độ ổn định của bộ mẫu chuẩn.

KẾT LUẬN

Đã thiết lập thành công các bộ mẫu chuẩn RNA tổng hợp *in vitro* dùng để kiểm định xét nghiệm acid nucleic phát hiện SARS-CoV-2 gây dịch COVID-19 của 3 gen *RdRp*, *E*, *N* với khoảng định lượng từ 10^0 - 10^8 copy/ μ L. Bộ mẫu chuẩn có độ tuyến tính và độ chính xác cao, phù hợp với hai bộ kit HVQY-VA-055 và Marseille (Pháp), ổn định trên ba hệ thống máy real-time PCR là Rotor GeneQ, Lighcycler 480, CFX 96 và bước đầu sử dụng bộ mẫu chuẩn RNA tổng hợp *in vitro* để định lượng thành công trên 22 mẫu lâm sàng.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của đề tài: “Nghiên cứu chế tạo bộ sinh phẩm RT-PCR và Real-time RT-PCR phát hiện chủng vi rút corona mới 2019 (2019-nCoV)”, mã số ĐTĐL.CN.29/20 do Học viện Quân y chủ trì phối hợp với Công ty cổ phần Công nghệ Việt Á. Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự hỗ trợ mẫu vật liệu nghiên cứu từ Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Bệnh viện Nhiệt đới Trung ương (cơ sở 2).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

<https://corona.kompa.ai>.

Chen Y, Liu Q, Guo D (2020) Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 92(4): 418-423.

Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, Ng DYM, Wan CKC, Yang P, Wang Q, Peiris M, Poon LLM (2020) Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem* 66(4): 549-555.

Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt MLJE (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25(3): 2000045.

Wu SZ, Bin Yu, Yan-Mei Chen, Wen Wang, Yi Hu, Zhi-Gang Song, Zhao-Wu Tao, Jun-Hua Tian, Yuan-Yuan Pei, Ming-Li Yuan, Yu-Ling Zhang, Fa-Hui Dai, Yi Liu, Qi-Min Wang, Jiao-Jiao Zheng, Lin Xu, Edward C. Holmes, Yong-Zhen Zhang (2020) Complete genome characterisation of a novel coronavirus associated with severe human respiratory disease in Wuhan, China. bioRxiv. DOI: 10.1101/2020.01.24.919183.

Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395(10224): 565-574.

Nalla AK, Casto AM, Huang M-LW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, Wei Y, Zhu H, Jerome KR, Greninger ALJJocm (2020) Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. *J Clin Microbiol* 58 (6) e00557-20.

WHO (2020) Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation reports [Internet]. [cited 2020 Feb 3]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.

Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu RJNEJoM (2020) A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382:727-733.

ESTABLISHMENT OF RNA *IN VITRO* PANELS FOR EVALUATION OF NUCLEIC ACID TESTING ASSAYS FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF SARS-COV-2 RNA

Vu Thi Nga^{1,2}, Luong Thi Hoai Thuong^{1,2}, Nguyen Thuy Linh^{1,2}, Ho Sy Tri¹, Hoang Xuan Su¹, Phan Quoc Viet³, Ho Anh Son¹, Dinh Thi Thu Hang¹

¹ Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University, Ministry of Defence

² Faculty of Biology, Hanoi University of Science, Vietnam National University, Hanoi

³ Viet A Technology Corporation

SUMMARY

COVID-19 is caused by a novel Corona virus (SARS-CoV-2), first reported in December 2019 in Wuhan (China) and began to spread rapidly and became a global pandemic. This study aims to establish the RNA *in vitro* SARS-CoV-2 panels and evaluate the panels by real-time RT-PCR kits for detection of SARS-CoV-2. The full-length of *RdRp*, *N* and *E* genes of SARS-CoV-2 were successfully amplified, cloned into pGEM-T vector, were used as materials for *in vitro* RNA transcription to establish RNA *in vitro* panels. Each set of RNA *in vitro* panel was established by exponential dilution of 10 concentration ranges $10^0 - 10^8$ copies/ μ L from the original *in vitro* RNA with a concentration of $500 \div 1000$ ng/ μ L, purity of A260/280 from $1.8 \div 2.1$ (equivalent of 10^{12} copies/ μ L). The RNA panels were assessed and optimized based on two SARS-CoV-2 real-time RT-PCR kits including HVQY-VA055 kit and Realtime RT-PCR SARS-CoV-2 kit (Marseille, France) using three different Real-time PCR systems. Evaluation of 22 COVID-19 specimens with 12 specimens from COVID-19 positive patients identified with concentrations ranging from 1.48×10^3 to 4.65×10^6 (copies/ μ L). We conclude that our RNA *in vitro* panels were successfully established, these standard panels, thus, were useful for SARS-CoV-2 diagnosing and treatment options.

Keywords: COVID-19, positive control, SARS-CoV-2, RNA *in vitro*, real-time RT-PCR.

* Author for correspondence: Tel: 84-904194391; Email: hangdinhbio@gmail.com