

## **ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG BỘ KIT NANOQUANT REAL-TIME HBV TRONG VIỆC ĐỊNH LƯỢNG VIRUS VIÊM GAN B BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR**

**NGUYỄN HOÀNG CHƯƠNG**

*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại Học Quốc Gia Tp HCM*

**PHẠM HÙNG VÂN**

*Trường Đại học Y dược Tp HCM*

### **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Virus viêm gan B hay HBV là một virus nhỏ, có bộ gen là DNA khoảng 3.200 nucleotide<sup>[1]</sup>. HBV xâm nhiễm gan và gây ra bệnh viêm gan siêu vi. Người bệnh nhiễm HBV, đặc biệt dạng mạn tính có nguy cơ cao bị xơ gan và ung thư gan nguyên phát. Trên thế giới hiện có 2 tỷ người nhiễm HBV và khoảng 350 triệu người nhiễm HBV mạn tính. Ước tính có khoảng 1 triệu người chết mỗi năm do nhiễm HBV và các bệnh liên quan đến HBV<sup>[2,3]</sup>. Việc định lượng HBV rất cần thiết cho việc điều trị bệnh nhiễm HBV vì thông tin về lượng virus trong máu được sử dụng để đánh giá tình trạng nhiễm của người bệnh trước khi bắt đầu điều trị, giúp cho việc quyết định điều trị và theo dõi điều trị. Hiện tại chỉ có hai bộ kit nước ngoài từ công ty Roche Diagnostics (Cobas Ampliprep/Cobas Taqman HBV) và công ty Abbott (Abbott real-time HBV) định lượng HBV dựa trên kỹ thuật real-time PCR là được công nhận IVD quốc tế tuy nhiên chi phí xét nghiệm được

thực hiện với hai bộ kit này rất cao, làm tăng gánh nặng cho người bệnh. Để có được một bộ kit định lượng HBV dựa trên kỹ thuật real-time PCR phát triển trong nước thì phải có một qui trình đánh giá chất lượng một cách khoa học. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng một quy trình đánh giá chất lượng của bộ kit NanoQuant real-time HBV định lượng HBV, là sản phẩm hợp tác giữa công ty TNHH TM và DV Nam Khoa và công ty CNSH Dược Nanogen..

### **VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Các vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:** (1) Chuẩn HBV (The 3<sup>rd</sup> World Health Organization International Standard for HBV, code 10/264) được mua từ National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC). (2) Các mẫu huyết thanh chứa các plasmid genotype HBV (A, B, C, D, E, F, I) với nồng độ 10<sup>7</sup> IU/mL được cung cấp bởi tiến sĩ

Kenji Abe (Viện Quốc gia về bệnh nhiễm Tokyo, Nhật Bản) và công ty Nam Khoa. (3) Các mẫu huyết thanh lâm sàng thu nhận từ công ty Nam Khoa và trữ ở nhiệt độ -70°C cho đến khi sử dụng. (4) Các mẫu huyết thanh dương tính HBV nồng độ cao đông khô được cung cấp bởi công ty Nam Khoa. (5) Bộ kit NanoQuant real-time được cung cấp bởi công ty Nanogen.

**Phương pháp nghiên cứu bao gồm:** (1) Xác lập khoảng định lượng (Quantitation range) của bộ kit bằng cách dùng mẫu huyết thanh đông khô chứa nồng độ cao HBV hòa với nước cất và pha loãng với huyết thanh âm tính HBV để tạo ra một dãy huyết thanh với nồng độ HBV từ  $10^2$  đến  $10^9$  IU/mL, ở mỗi nồng độ, tiến hành định lượng HBV 3 lần lặp lại bằng bộ kit NanoQuant real-time HBV, sau đó so sánh các nồng độ định lượng với nồng độ thực tế bằng phương pháp phân tích hồi quy tuyến tính (Excel). Sự tuyến tính giữa các nồng độ trong dãy được kiểm tra bằng phương pháp phân tích hồi quy đa thức (polynomial regression analysis) sử dụng phần mềm R (The R Foundation for statistical computing). (2) Xác định giới hạn phát hiện (Limit of detection – LOD) của bộ kit bằng cách dùng mẫu chuẩn HBV đồng khô của NIBSC hòa với nước cất và pha loãng với huyết thanh âm tính HBV để tạo ra các nồng độ HBV là 60, 50, 40, 20, 10 IU/mL, ở mỗi nồng độ, tiến hành phát hiện DNA của HBV lặp lại 10 lần bằng bộ kit NanoQuant real-time HBV; kết quả phát hiện DNA HBV tại mỗi nồng độ được xử lý bằng phần mềm Probit (Environmental Protection Agency) tính toán giới hạn phát hiện của bộ kit. (3) Để xác định tính đặc hiệu trong việc định lượng HBV của bộ kit NanoQuant real-time HBV, chúng tôi thử nghiệm khả năng nhân bản chọn lọc trên nhiều loại vật liệu di truyền từ nhiều tác nhân khác nhau bao gồm virus, vi khuẩn, nấm bệnh và từ người (Bảng 2). (4) Để khảo sát khả năng định lượng HBV của bộ kit NanoQuant real-time HBV trong trường hợp có chất ức chế hiện diện trong máu, chúng tôi bổ sung các chất ức chế với nồng độ như trong Bảng 3 vào các mẫu huyết thanh dương tính HBV có nồng độ  $5 \times 10^4$  IU/mL. Nhóm đối chứng là cùng các mẫu huyết thanh nhưng không có chất ức chế. Sau đó, chúng tôi thực hiện định lượng HBV ở cả hai nhóm. Kết quả định lượng trong trường hợp có và không có chất cản trở được so sánh bằng thống kê paired t test (Excel). (5) Để phân tích độ chính xác (Precision) của bộ kit, ở mỗi mẫu huyết thanh có nồng độ HBV là  $5 \times 10^3$  và  $5 \times 10^7$  IU/mL, chúng tôi tiến hành định lượng lặp lại 2 lần, hai lần trong ngày trong 20 ngày theo hướng dẫn của văn bản EP5-A2 của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) với bộ kit NanoQuant real-time HBV [4]. Sau đó, các số liệu định lượng của mỗi mẫu được xử lý với phần mềm StataPro (CLSI) để tính ra hệ số biến thiên trong định lượng HBV của bộ kit NanoQuant real-time HBV.

#### **Nghiên cứu sự khác biệt trong định lượng các genotype HBV**

Chúng tôi tiến hành định lượng HBV với bộ kit NanoQuant real-time HBV trên các mẫu huyết thanh chứa các plasmid genotype HBV A, B, C, D, E, F, I với nồng độ  $10^7$  IU/mL, lặp lại 3 lần cho một mẫu. Nồng độ

thực tế và nồng độ đo lường của các mẫu huyết thanh này được so sánh với nhau để xem xét sự khác biệt trong định lượng các genotype HBV.

#### **So sánh định lượng với bộ kit Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV [2]**

Chúng tôi định lượng HBV trên 97 mẫu huyết thanh dương tính HBV bằng cả hai bộ kit NanoQuant real-time HBV và Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV. Hai kết quả định lượng được phân tích bằng phương pháp hồi quy tuyến tính so sánh để tìm sự tương quan. Cuối cùng, kiểm tra sự tương quan trong định lượng giữa hai bộ kit bằng phương pháp phân tích Bland-Altman (XISat)

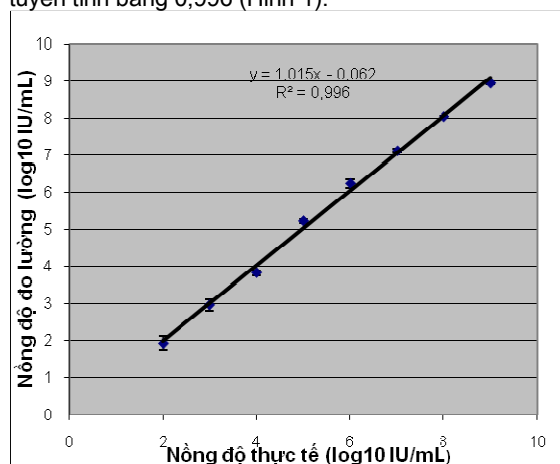
### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **1. Thiết kế quy trình đánh giá chất lượng bộ kit NanoQuant real-time HBV**

Quy trình đánh giá chất lượng bộ kit HBV được xây dựng dựa trên các hướng dẫn đánh giá chất lượng bộ kit hiện hành [5,6]. Quy trình bao gồm việc đánh giá chất chỉ tiêu chất lượng như sau: (i) khoảng định lượng, (ii) giới hạn phát hiện, (iii) độ chính xác, (iv) độ đặc hiệu, (v) độ bao phủ các genotype và (vi) so sánh định lượng với bộ kit ngoại nhập. Trên thực tế, các chỉ tiêu chất lượng này cũng được sử dụng để đánh giá chất lượng của các bộ kit định lượng HBV có trên thị trường [7,8].

#### **2. Khoảng định lượng**

Khoảng định lượng là dãy nồng độ mà trong đó sự định lượng HBV là chính xác và tin cậy. Nồng độ ngưỡng dưới và ngưỡng trên của dãy xác định giới hạn định lượng của bộ kit. Các nồng độ trong dãy có sự tuyến tính với nhau hình thành nên khoảng định lượng. Khoảng định lượng của bộ kit NanoQuant real-time HBV được khảo sát đi từ nồng độ  $10^2$  đến  $10^9$  IU/mL. Kết quả khảo sát cho thấy, các nồng độ trong khoảng này có độ tuyến tính cao được thể hiện qua hệ số tuyến tính bằng 0,996 (Hình 1).



Chúng tôi kiểm tra hệ số tuyến tính này bằng phương pháp phân tích hồi quy đa thức (polynomial regression analysis) vì phương pháp phân tích 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 này. Kết quả phân tích thống kê t (t-test) trên các hệ số không tuyến tính (nonlinear coefficient) cho thấy các hệ số này không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ). Như vậy, độ tuyến tính giữa các nồng độ từ  $10^2$  đến  $10^9$  IU/mL được khẳng định. Khoảng định lượng của bộ kit NanoQuant real-time HBV là tương đương với khoảng định lượng của các bộ kit định lượng HBV khác có trên thị trường [7,8].

### 3. Giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện cũng chính là độ nhạy của bộ kit. Kết quả phát hiện DNA HBV trên dãy nồng độ từ 60 đến 10 IU/mL được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện (LOD) của bộ kit NanoQuant real-time HBV

Nồng độ IU/mL	Số mẫu thử	Số mẫu phát hiện	Phần trăm phát hiện
60	10	10	100%
50	10	10	100%
40	10	10	100%
30	10	10	100%
20	10	8	80%
10	10	6	60%

Kết quả phần trăm phát hiện DNA HBV được xử lý bằng phần mềm thống kê Probit để tính toán giá trị LOD của bộ kit. Kết quả phân tích bằng Probit cho thấy giới hạn phát hiện của bộ kit NanoQuant real-time HBV là 25,4 IU/mL. Giá trị LOD của bộ kit NanoQuant real-time HBV là tương đương với giá trị LOD của các bộ kit thương mại [7,8].

### 4. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu trong định lượng HBV bằng kỹ thuật real-time PCR được biểu hiện qua hai chỉ tiêu: khả năng nhân bản chọn lọc DNA HBV và khả năng định lượng chính xác HBV trong trường hợp có chất ức chế. Kết quả khảo sát khả năng nhân bản chọn lọc của bộ kit NanoQuant real-time trên các tác nhân virus, vi khuẩn, nấm bệnh và người được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khả năng nhân bản chọn lọc của bộ kit NanoQuant real-time HBV trên các tác nhân khác nhau

Tác nhân	Nhân bản HBV DNA	Nhân bản chứng nội
Hepatitis B Virus	+	+
Người	-	+
Cytomegalovirus	-	+
Human simplex virus	-	+
Hepatitis C virus	-	+
Human Immunodeficiency virus	-	+
Dengue virus	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	+

Kết quả cho thấy bộ kit NanoQuant real-time HBV chỉ nhân bản vật liệu di truyền của HBV mà không nhân bản vật liệu di truyền của các tác nhân khác. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các chất ức chế có nguồn gốc nội sinh (hemoglobin, bilirubin, triglycerid, protein) và ngoại sinh (thuốc kháng virus, vật liệu di truyền) được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính nhạy cảm của bộ kit NanoQuant real-time HBV đối với các chất ức chế

Nhóm chứa chất ức chế (IU/mL)	Nhóm đối chứng (IU/mL)	
Hemoglobin (2 g/L)	$7,92 \times 10^4$	$4,94 \times 10^4$
Bilirubin 37 mM	$6,56 \times 10^4$	$5,20 \times 10^4$
Triglycerid 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	$5,38 \times 10^4$	$5,41 \times 10^4$
Human DNA 1 $\mu$ g/mL	$7,48 \times 10^4$	$6,93 \times 10^4$
<i>E. coli</i> DNA 100,000 copies/mL	$7,31 \times 10^4$	$6,10 \times 10^4$

Kết quả định lượng giữa hai nhóm có và không có ức chế được xử lý bằng thống kê paired t test. Kết quả thống kê cho thấy giữa hai nhóm không có sự khác biệt trong kết quả định lượng giữa hai nhóm ( $P > 0,05$ ). Nói cách khác, bộ kit NanoQuant real-time HBV không bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của các chất ức chế trong máu.

### 5. Độ chính xác

Trong nhiều phương pháp đánh giá độ chính xác, chúng tôi chọn quy trình đánh giá theo quy trình EP5-A2 của CLSI [4]. Theo quy trình này, độ chính xác được thể hiện qua giá trị thống kê là hệ số biến thiên (coefficient of variation). Giá trị này càng nhỏ thì độ chính xác của bộ kit càng cao. Giá trị định lượng lặp lại trong 20 ngày của mẫu HBV nồng độ cao ( $5 \times 10^7$  IU/mL) và nồng độ thấp ( $5 \times 10^3$  IU/mL) được xử lý bằng phần mềm StasisPro. Kết quả cho thấy hệ số biến thiên là 1,24% cho mẫu huyết thanh nồng độ thấp ( $5 \times 10^3$  IU/mL) và 1,86% cho mẫu huyết thanh nồng độ cao ( $5 \times 10^7$  IU/mL). Các hệ số biến thiên này ở mức độ thấp, thể hiện được tính chính xác cao trong việc định lượng HBV của bộ kit NanoQuant real-time HBV.

### 6. Độ bao phủ các genotype

Kết quả khảo sát sự khác biệt trong việc định lượng HBV ở các genotype khác nhau của bộ kit NanoQuant real-time HBV được trình bày ở Bảng 4. Các genotype khảo sát bao gồm A, B, C, D, E, F, I.

Bảng 4. Kết quả khảo sát định lượng HBV trên các genotype khác nhau

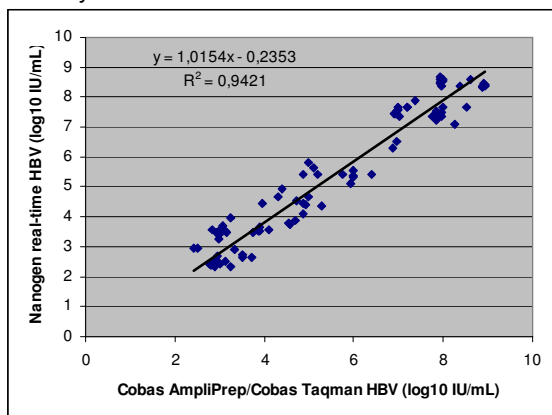
HBV genotype	Nồng độ thực tế ( $\log_{10}$ IU/mL)	Nồng độ đo lường ( $\log_{10}$ IU/mL)	Sự khác biệt ( $\log_{10}$ copy/mL)
A	7	6,75	-0,25
B	7	7,26	0,26
C	7	6,94	-0,06
D	7	7,22	0,22
E	7	7,24	0,24
F	7	6,76	-0,24
I	7	7,14	0,14

Sự khác biệt giữa nồng độ thực tế và nồng độ đo được giữa 7 genotype HBV không có ý nghĩa lâm sàng (khác biệt lớn nhất là 0,26  $\log_{10}$  IU/mL). Điều này được giải thích là do nhà sản xuất đã thiết kế hệ primer và Taqman probe ở vùng gen S của bộ gen HBV. Đây là vùng gen chứa những đoạn trình tự nucleotide có độ

bảo tồn cao giữa các genotype khác nhau của HBV. Trên thực tế, vùng gen S cũng là vùng gen để thiết kế hệ primer và Taqman probe của các bộ kit định lượng HBV [7,8].

### 7. So sánh kết quả định lượng giữa hai bộ kit NanoQuant real-time HBV và Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV.

Chúng tôi so sánh định lượng HBV trên 97 mẫu huyết thanh dương tính HBV giữa hai bộ kit NanoQuant real-time HBV và Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV. Kết quả định lượng giữa hai bộ kit được so sánh bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Sự tương quan trong định lượng HBV giữa NanoQuant real-time HBV và Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV trên 97 mẫu huyết thanh dương tính HBV

Hệ số tuyến tính là 0,94 cho thấy có sự tương quan cao trong định lượng HBV giữa hai bộ kit. Hệ số độ dốc (slope) của phương trình hồi quy tuyến tính là 1,0154 rất gần với giá trị 1 cho thấy không có độ sai lệch tỷ lệ (proportional bias) nào trong khi hệ số chặn (intercept) là -0,2353 hơi xa với giá trị 0 chỉ ra một số sai lệch hệ thống bất biến (constant systemic bias). Tuy nhiên khi phân tích bằng phương pháp Bland-Altman, độ sai lệch này không có ý nghĩa thống kê vì khoảng tin cậy 95% (95% CI) từ -1,22 đến 0,91 chứa giá trị 0 [5]. Hơn nữa, độ lệch trung bình (mean bias) giữa hai bộ kit là -0,155 log<sub>10</sub> IU/mL cho thấy sự tương quan cao trong định lượng HBV. Kết quả so sánh giữa hai bộ kit cho thấy bộ kit NanoQuant real-time HBV có thể được sử dụng để thay thế bộ kit Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV trong định lượng HBV mà không bị mất đi tính hiệu quả và chính xác.

### KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng một quy trình đánh giá các chỉ tiêu chất lượng bộ kit NanoQuant real-time HBV trong định lượng HBV. Bộ kit NanoQuant real-time HBV đạt được những chỉ tiêu sau: (1) Khoảng định lượng: từ 10<sup>2</sup> đến 10<sup>9</sup> IU/mL. (2) Giới hạn phát hiện: 25,4 IU/mL. (3) Độ đặc hiệu: chỉ nhân bản chọn lọc vật liệu di truyền của HBV và việc định lượng HBV không bị ảnh hưởng của các chất ức chế hiện diện trong máu.

(4) Độ chính xác: hệ số biến thiên thấp (1,24% và 1,86%) cho thấy độ chính xác cao. (5) Độ bao phủ genotype: không có sự khác biệt trong định lượng các genotype HBV. (6) So sánh với bộ kit ngoại nhập: có độ tương quan cao trong định lượng HBV với bộ kit Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV.

### SUMMARY

Hepatitis B virus (HBV) DNA quantitation is essential for the treatment of patients with chronic HBV infection. In this study, the performance of a dosmetic molecular assay, NanoQuant real-time HBV, was evaluated to prove its utility in clinical practice. To do this, we performed a plan of experiments that are suggested from guidelines for validation of quantitative test methods. We found that NanoQuant real-time HBV can quantify HBV in a linear range from 10<sup>2</sup> to 10<sup>9</sup> IU/mL with the detection limit of 25.4 IU/mL. Only DNA HBV was selectively amplified by the assay. No interference on the performance of the assay was observed in the presence of endogenous and exogenous substances. Coefficient of variation precisions varied from 1.24% to 1.86%. DNA HBV quantitation over seven HBV genotypes demonstrated equal measurements. HBV quantitation results by NanoQuant real-time HBV showed a good correlation with those determined with the Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman HBV assay (R<sup>2</sup> = 0.94). In conclusion, the evaluation results indicated that NanoQuant real-time HBV is reliable and robust for highly sensitive detection and quantitation of HBV DNA level in the treatment of patients with chronic HBV infection.

**Từ khóa:** HBV, real-time PCR, NanoQuant real-time HBV, đánh giá chất lượng

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lok AS, McMahon BJ. 2001. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 34(6):1225-1241.
2. Hou J, Liu Z, Gu F. 2005. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci*. 2(1):50-57.
3. World Health Organization. 2008. Hepatitis B: World Health Organization Fact Sheet 204. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
4. CLSI/NCCLS. 2003. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. Approved guideline. 2nd ed. CSLI document EP5-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. Burd EM. 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 23(3):550-576.
6. Jennings L, Van Deerlin VM, Guley ML. 2009. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med*. 133(5):743-755.
7. AJ Roboscreen GmbH. 2010. Robogene HBV DNA quantification kit. Instruction manual.
8. Abbott Molecular Inc. 2010. Abbott RealTime HBV. User manual.