

Multiplex real-time PCR phát hiện đồng thời SARS-CoV-2 và các biến thể lây truyền nhanh hiện đang lưu hành

Van H. Pham^{*1}, Thanh V. Nguyen², Ngọc V. Tran², Sy N. Dinh³, Nhung V. Nguyen², Chien D. Vo⁴, Ha M. Nguyen^{4,5}, Binh T. Pham⁶, Sa H. Le¹, Duy K. Trần¹, Quoc V. Nguyen¹, Viet Q. Tran¹, Huong T. Pham⁵, Son T. Pham⁷, Nam H. D. Nguyen⁸

¹Nam Khoa Biotech, ²Hoi Phoi Vietnam, ³Hoi Y Hoc Vietnam, ⁴Nguyen Tri Phuong Hospital, ⁵Pham Ngoc Thach Medical University, ⁶University of Medicine and Pharmacy in HCMC, ⁷Sydney University, ⁸Phan Chau Trinh University

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Hiện nay trên thế giới có nhiều biến thể của SARS-CoV-2, trong số đó có 4 biến thể là Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), biến thể Gamma (P.1), và biến thể Delta (B.1.617.2) có tốc độ lây lan nhanh hơn chủng ban đầu theo thứ tự là 82%, 161%, 50% và 198%. Để phát hiện được các biến thể SARS-CoV-2 đang lưu hành tại một vùng dịch tễ nào đó thì phương pháp mà các nhà nghiên cứu hiện đang sử dụng là giải mã toàn bộ gen của các virus phát hiện được trong các mẫu thử. Phương pháp này có một lợi thế là phát hiện được toàn bộ các đột biến trong bộ gen của virus. Ngoài ra phương pháp này còn có thể phát hiện được các đột biến mới và như vậy là có thể phát hiện được các biến thể mới của virus. Tuy nhiên phương pháp giải trình tự có hạn chế là không thể áp dụng được tại các phòng xét nghiệm chống dịch mà chỉ có thể áp dụng được tại các trung tâm có phương tiện giải trình tự mà thôi.

Mục tiêu nghiên cứu: Thiết kế một bộ xét nghiệm sử dụng phương pháp multiplex real-time PCR thực hiện được tại các phòng thí nghiệm chẩn đoán để phát hiện 4 biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta cùng hai đột biến giúp virus lây lan nhanh (D614G) và có thể trốn thoát hoạt động của kháng thể đặc hiệu (E484K).

Phương pháp nghiên cứu: Các primer và probe để phát hiện các biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta được thiết kế dựa trên sự phát hiện các đột biến chuyên biệt của các biến thể này. Các biến thể Alpha, Beta và Delta được phát hiện dựa ARMS Taqman real-time PCR (ARMS: Amplification Refractory Mutation System) với nguyên tắc là nếu có đột biến thì Taqman probe sẽ không bị thủy giải và sẽ không có tín hiệu khuếch đại và ngược lại nếu không có đột biến thì Taqman probe sẽ bị thủy giải và sẽ có tín hiệu khuếch đại. Biến thể Gamma và các đột biến D614G cũng như đột biến E484K được phát hiện dựa trên SNP Taqman real-time PCR với nguyên tắc là mỗi đột biến sẽ được phát hiện bằng hai Taqman probe có reporter khác nhau là FAM và HEX hay TexasRED và CY5 và tùy thuộc vào sự phát huỳnh quang sớm hay trễ của hai Taqman probe này mà kết luận được là có hay không có đột biến. Bộ xét nghiệm được thiết kế gồm ba RT multiplex real-time PCR với multiplex A (MPL-A) phát hiện SARS-CoV-2 dựa trên gene E với mỗi Taqman probe (FAM) theo thiết kế của WHO, biến thể Alpha (HEX) và chúng nội là gene RNaseP (CY5); MPL-B phát hiện biến thể Delta (FAM), biến thể Beta (HEX), và biến thể Gamma (TexasRED/CY5); MPL-C phát hiện D614G (FAM/HEX) và E484K (TexasRED/CY5). Các multiplex được pha từ AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (ThermoFisher, Mỹ). Để kiểm tra các thiết kế mỗi Taqman probe dành cho các đột biến có hoạt động hiệu quả không và độ nhạy in-vitro, các trình tự DNA tương ứng cho các đột biến cũng được thiết kế để làm vai trò chứng [+]. Bộ xét nghiệm sau đó được thử trên các mẫu thật là các tách chiết RNA đã có kết quả [+] SARS-CoV-2 được cung cấp từ phòng thí nghiệm có chức năng xét nghiệm.

Kết quả: Thử nghiệm trên các chứng [+] cho kết quả giới hạn phát hiện của gene E và biến thể Alpha là 10^{-6} fm/μl, biến thể Delta là 10^{-5} fm/μl, biến thể Beta và biến thể Gamma là 10^{-7} fm/μl, các đột biến D614G và E484K là 10^{-5} . Không có hiện tượng phát hiện chéo các đột biến hay các biến thể. Thử nghiệm trên các tách chiết RNA đã xác định [+] SARS-CoV-2. Với các mẫu lấy từ TP. HCM, kết quả cho thấy tháng 4/2020 (1 mẫu) là chủng nguyên thủy chưa có đột biến D614G và E484K, trong khi tháng 6 năm 2021 thì các mẫu thử (12) là biến thể Delta có thêm đột biến D614G nhưng không có đột biến E484K. Với các mẫu lấy từ Quảng Nam, kết quả cho thấy vào tháng 6/2020 vừa có chủng có đột biến D614G (3) vừa có chủng nguyên thủy (2), trong khi tháng 6/2021 thì tất cả các chủng là biến thể Alpha (4) và có đột biến D614G. Mẫu có chủng nguyên thủy, mẫu có biến thể Delta, mẫu có biến thể Alpha và mẫu chỉ có đột biến D614G đều được giải trình tự gen S và kết quả hoàn toàn phù hợp với kết quả real-time PCR.

Kết luận: Theo qui luật tiến hóa thì một biến thể có tốc độ lây lan nhanh sẽ dần dần thay thế chủng hoang dại ban đầu và một khi địa phương đạt miễn dịch cộng đồng đối với một biến thể này thì lại có thể nhạy cảm với một biến thể khác do vậy mà có thể bị thay thế bởi một biến thể khác. Chính vì vậy việc triển khai xét nghiệm multiplex real-time PCR để phát hiện 4 biến thể lây lan nhanh tại các phòng xét nghiệm chẩn đoán là rất cần thiết. Với một số kết quả thử trên các mẫu tách chiết RNA, có thể kết luận rằng tại TP. Hồ Chí Minh lúc mới bắt đầu dịch thì SARS-CoV-2 vẫn là chủng hoang dại ban đầu, nhưng hiện nay thì đã hoàn toàn bị thay thế bởi biến thể Delta. Tại Quảng Nam thì khởi đầu dịch là chủng hoang dại nhưng cũng đã lưu hành chủng có đột biến D614G, hiện nay thì biến thể Alpha đang lưu hành và có đột biến D614G. Riêng đột biến E484K thì cho đến hiện nay vẫn chưa xuất hiện và đây là một dấu chỉ cho thấy SARS-CoV-2 chưa kháng được các kháng thể đặc hiệu vùng nhận diện thụ thể trên protein gai của virus.

Từ khóa: SARS-CoV-2 variants, RT Multiplex real-time PCR

Real-time PCR detects 4 rapid transmission variants of SARS-CoV-2

Background: Currently in the world there are many variants of SARS-CoV-2, among which there are 4 variants: Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma variant (P.1), and Delta variant (B.1.617.2) has a faster transmission rate than the original strain by 82%, 161%, 50% and 198%, respectively. To detect the SARS-CoV-2 variants circulating in a certain

endemic area, the method that the researchers are currently using is to sequence the entire genome of the viruses detected in the samples. However, the sequencing method has the limitation that it cannot be applied in clinical laboratories.

Aim of the study: Design a test kit using multiplex real-time PCR that can be performed in diagnostic laboratories to detect 4 variants Alpha, Beta, Gamma and Delta and two mutations that help the virus to spread rapidly (D614G) and can escape the action of specific antibodies (E484K).

Material and method: Primers and probes to detect Alpha, Beta, Gamma and Delta variants are designed based on the detection of specific mutations of these variants. The Alpha, Beta and Delta variants were detected based on ARMS Taqman real-time PCR (ARMS: Amplification Refractory Mutation System) with the principle that if a mutation is present, the Taqman probe will not be hydrolyzed and will not have an amplified signal, if there is no mutation the Taqman probe will be hydrolyzed and will have an amplified signal. The Gamma variant and the D614G mutations as well as the E484K mutations were detected based on the SNP Taqman real-time PCR with the principle that each mutation would be detected by two Taqman probes with different reporters, FAM and HEX or TexasRED and CY5 and depending on the early or late of the fluorescent signal of these two Taqman probes, it can be concluded whether or not there is a mutation. The test kit is designed with three RT multiplex real-time PCR with multiplex A (MPL-A) to detect SARS-CoV-2 based on E gene using primers and Taqman probe (FAM) according to WHO design, variant Alpha (HEX) and the internal control is the RNaseP gene (CY5); MPL-B detects Delta variant (FAM), Beta variant (HEX), and Gamma variant (TexasRED/CY5); MPL-C detects D614G (FAM/HEX) and E484K (TexasRED/CY5). The multiplex was prepared from AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (ThermoFisher, USA). To check the primers and probes, the corresponding DNA sequences for the mutants were also designed as controls [+]. The test kit is then tested on samples that are the RNA extracts positive with SARS-CoV-2.

Results: Testing on [+] controls showed that the detection limit for the E gene and the Alpha variant was 10^{-6} fm/μl, the Delta variant was 10^{-5} fm/μl, and the Beta and Gamma variant was 10^{-7} fm/μl, the D614G and E484G mutations were 10^{-5} fm/μl. There was no cross-detection of mutations or variants. Tested on RNA extracts that were positive with SARS-CoV-2, the results said that: In HCMC, the strain (1) taken in April 2020 is the wild type, while all strains (12) taken in June 2021 are Delta variants with additional mutations D614G and no mutations E484K; In Quang Nam, the samples taken in June 2020 are both wild type (2) and have mutation D614G (3), while in June 2021 all strains were variants Alpha (4) and has the D614G mutation. The sample with the wild type, with the Delta variant, with the Alpha variant and the sample with only the D614G mutation were sequenced the whole S gene and the results were completely consistent with the real-time PCR results.

Conclusion: According to the laws of evolution, a rapidly spreading variant will gradually replace the original wild strain, and once community immunity to a variant is achieved, it may be susceptible to another variant and it can therefore replace the old one. Therefore, it is necessary to develop and set-up the multiplex real-time PCR test to detect 4 rapid transmission variants in diagnostic laboratories. With the collected results on the stock samples, we can conclude that at the beginning of the epidemic in Ho Chi Minh City, SARS-CoV-2 was still the original wild strain, but now it has been completely replaced by the Delta variant. In Quang Nam, the beginning of the epidemic was a wild strain but also circulating a strain with a D614G mutation, however the Alpha variant is currently circulating and has a D614G mutation. Particularly, the E484K mutation has not appeared so far and this is an indication that SARS-CoV-2 has not yet been resistant to specific antibodies that recognize the receptor on the spike protein of the virus.

Key words: SARS-CoV-2 variants, RT Multiplex real-time PCR

Đặt vấn đề

Trong quá trình lây truyền trên người, SARS-CoV-2 đã hình thành nên các đột biến để virus ngày càng lây truyền dễ dàng hơn và theo qui luật tiến hóa thì các virus lây truyền càng nhanh càng dễ thì sẽ dần dần thay thế các virus lây truyền chậm hơn trước đó. SARS-CoV-2 gây bệnh đầu tiên tại Vũ Hán là dòng nguyên thủy tuy nhiên sau khi lan qua Âu Châu thì virus đã có biến đổi đầu tiên trên gen S hình thành nên đột biến D614G, tại vị trí codon 614 của gen S thay vì là aspartic acid (D) lại bị thay thế bằng Glycine (G) làm cho vùng bám thụ thể (RBD) của protein gai mở rộng ra hơn nên giúp cho virus bám vào thụ thể ACE2 dễ hơn và chặt hơn^[1]. Chính vì vậy mà biến chủng này, gọi là chủng G, đã thay thế hoàn toàn chủng D trước đó. Thật ra thì đột biến D614G đã xuất hiện rải rác tại Vũ Hán nhưng khi lan qua Châu Âu thì tỷ lệ xuất hiện đã tăng lên đến 20% các chủng và đến tháng 6 đã chiếm 100% các chủng với hậu quả là tạo ra các làn sóng lây nhiễm không chỉ tại Mỹ, các nước Châu Âu mà rất nhiều nước trên thế giới^[1]. Tại Việt Nam, SARS-CoV-2 mang đột biến D614G đã xuất hiện rất sớm từ tháng 3 năm 2020 và nguồn gốc là từ các khách du lịch từ Âu Châu^[2,3] và vụ dịch xảy ra tại Đà Nẵng vào tháng 7 năm 2020 cũng là do SARS-CoV2 mang đột biến này gây ra.

Nhờ giải trình tự bộ gen của SARS-CoV-2 liên tục mà cho đến hiện nay các nhà khoa học đã phát hiện ra nhiều biến thể của virus đang lưu hành với xuất phát ban đầu có thể từ một số quốc gia^[3]. Đó

là biến thể Alpha (còn gọi là B.1.1.7) xuất phát từ Anh Quốc được báo cáo từ tháng 12 năm 2020^[4], lây lan nhanh hơn 82% so với virus ban đầu; Biến thể Beta (B.1.351) xuất phát từ Nam Phi báo cáo đầu tiên từ tháng 1/2021 có tốc độ lây lan nhanh hơn 50%^[5]; Biến thể Gamma (P.1) xuất phát từ Brazil từ tháng 1/2021^[6,7] có tốc độ lây lan nhanh hơn 161%; Biến thể Epsilon (B.1.429 và B.1.427) xuất phát từ Hoa Kỳ từ tháng 3/2020^[8] có tốc độ lây lan nhanh hơn 20%; Biến thể Delta (B.1.617.2) xuất phát từ Ấn Độ và được báo cáo vào tháng 5 năm 2021^[9] có tốc độ lây lan nhanh nhất, hơn 198% so với chủng ban đầu và biến thể này chính là biến thể không chỉ hoành hành tại Ấn Độ mà cả các quốc gia đông Nam Á hiện nay. Ngoài ra còn có các biến thể khác nữa như Kappa (B.1.617.1) xuất phát từ Ấn độ và Eta (B.1.525) xuất phát từ Nigeria hiện đang được điều tra thêm. Các biến thể này có một đặc điểm chung là đều mang đột biến D614G^[3] làm cho vùng bám thụ thể trên protein gai của virus mở rộng ra hơn, nhờ vậy mà virus dễ dàng lây nhiễm hơn. Ngoài đột biến D614G, các biến thể còn có thể thêm một số đột biến trên một số codon ảnh hưởng trực tiếp hay gián tiếp lên cấu trúc vùng bám thụ thể của protein gai của virus và chính các đột biến này đã làm tăng khả năng lây nhiễm (như đột biến N501Y, E484K...) hay đột biến có thể làm làm gia tăng nguy cơ virus trốn thoát miễn dịch bảo vệ của người do chúng ngừa hoặc kháng lại hiệu quả huyết thanh điều trị^[3] (đột biến E484K, K417N/T, L452R, ...).

Để phát hiện được các biến thể SARS-CoV-2 đang lưu hành tại một vùng dịch tễ nào đó thì phương pháp mà các nhà nghiên cứu hiện đang sử dụng là giải mã toàn bộ gen của các virus phát hiện được trong các mẫu thử^[10]. Phương pháp này có một lợi thế là phát hiện được toàn bộ các đột biến trong bộ gen của virus, không chỉ ở gen S mà còn trên các gen khác như gen N. Không chỉ vậy phương pháp này còn có thể phát hiện được các đột biến mới và như vậy là có thể phát hiện được các biến thể mới của virus. Tuy nhiên phương pháp giải trình tự có hạn chế là không thể áp dụng được tại các phòng xét nghiệm chống dịch mà chỉ có thể áp dụng được tại các trung tâm có phương tiện giải trình tự mà thôi. Để có thể đáp ứng được kịp thời khả năng chống dịch thì phải có giải pháp phát hiện và định lượng SARS-CoV-2 đồng thời phát hiện các biến thể có nguy cơ lây lan cao hiện diện trong mẫu thử lấy từ các trường hợp nhiễm bệnh cũng như có nguy cơ nhiễm bệnh và giải pháp này phải có thể thực hiện được tại các phòng thí nghiệm chống dịch hiện nay, tức là các phòng thí nghiệm có trang bị phương tiện real-time PCR^[10].

Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu chính của đề tài này là nghiên cứu chế tạo bộ xét nghiệm real-time PCR vừa phát hiện và định lượng SARS-CoV-2; Đồng thời phát hiện các biến thể có khả năng lây lan nhanh bao gồm biến thể Anh Quốc (Alpha), biến thể Nam Phi (Beta), biến thể Brazil (Gamma) và biến thể Ấn Độ (Delta); Ngoài ra phát hiện thêm hai đột biến quan trọng liên quan nhiều đến khả năng lây lan (D614G) và nguy cơ giảm hiệu quả miễn dịch bảo vệ của vaccin (đột biến E484K).

Mục tiêu cụ thể của đề tài là: (1) Xác định độ nhạy in-vitro của bộ xét nghiệm tức là giới hạn phát hiện chính xác các mục tiêu đích trên các mẫu chứng dương được thiết kế. (2) Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu khi thử nghiệm trên các mẫu thử thật là các tách chiết RNA cũng như một số mẫu thật đã xác định [+] với SARS-CoV-2 đồng thời so sánh với kết quả giải trình tự để xác định độ đặc hiệu của bộ xét nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

1. Thiết kế và chế tạo bộ xét nghiệm real-time PCR

Sử dụng các mồi và probe phát hiện gen E của virus do WHO công bố để phát hiện và định lượng SARS-CoV-2,. Để phát hiện các biến thể, chúng tôi lựa chọn các đột biến đặc hiệu^[3] cho biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta rồi thiết kế các mồi và probe đặc hiệu các đột biến này. Cũng thiết

kế thêm các môi và probe đặc hiệu để phát hiện hai đột biến D614G và E484K. Các biến thể Alpha, Beta và Delta được phát hiện dựa vào ARMS Taqman real-time PCR (ARMS: Amplification Refractory Mutation System) hay chính xác hơn Taqman real-time PCR thất bại đích^[10] (Target Failure Taqman Real-time PCR) với nguyên tắc là nếu có đột biến thì Taqman probe sẽ không bị thủy giải và sẽ không có tín hiệu khuếch đại và ngược lại nếu không có đột biến thì Taqman probe sẽ bị thủy giải và sẽ có tín hiệu khuếch đại. Biến thể Gamma và các đột biến D614G cũng như đột biến E484K được phát hiện dựa trên SNP Taqman real-time PCR^[10] với nguyên tắc là mỗi đột biến sẽ được phát hiện bằng hai Taqman probe có reporter khác nhau là FAM và HEX hay TexasRED và CY5 và tùy thuộc vào sự phát huỳnh quang sớm hay trễ của hai Taqman probe này mà kết luận được là có hay không có đột biến. Ngoài ra môi và probe đặc hiệu gene RNaseP của tế bào người cũng được sử dụng để làm chứng nội. Các chứng dương (C[+]) là các trình tự có đột biến và trình tự không đột biến tương ứng, gồm các loại sau đây: 1 chứng dương cho gen E (E_Oligo); 2 chứng dương cho biến thể Alpha (UK_Oligo và notUK_Oligo); 2 chứng dương cho biến thể Beta (SAF_Oligo và notSAF_Oligo), 2 chứng dương cho biến thể Gamma (BrZ_Oligo và notBrZ_Oligo), 2 chứng dương cho biến thể Delta (InD_Oligo và notInD_Oligo), 2 chứng dương cho đột biến D614G (614D_Oligo và 614G_Oligo), 2 chứng dương cho đột biến E484K (484E_Oligo và 484K_Oligo). Mã số truy cập trên NCBI gene bank để từ đó thiết kế trình tự các môi, probe và chứng [+] được trình bày trong **bảng 1** trong phần phụ lục. Tất cả các môi, probe và chứng dương đều được đặt tổng hợp từ hãng Macrogen của Hàn Quốc. Bộ xét nghiệm real-time PCR được thiết kế thành 3 multiplex real-time PCR. Multiplex A để phát hiện và định lượng SARS-CoV-2, phát hiện biến thể Alpha và phát hiện chứng nội. Multiplex B để phát hiện biến thể Beta, biến thể Gamma và biến thể Delta. Multiplex C để phát hiện các đột biến D614G và E484K. Các Multiplex real-time PCR được pha từ AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (ThermoFisher, Mỹ), gồm 2X RT-PCR buffer, 25X RT-PCR enzyme, Nuclease free water. Công thức pha được trình bày trong **bảng 2** ở phần phụ lục.

2. *Khảo sát độ nhạy của bộ xét nghiệm khi thử trên các mẫu chứng dương*

Các mẫu chứng [+] ở dạng đông khô được pha trong TE 1X để có hàm lượng 100pm. Sau đó pha loãng tiếp cũng trong TE 1X theo hệ số pha loãng 10 để có các độ pha loãng từ 10^{-9} đến 10^{-15} tương ứng với hàm lượng 10^{-1} fm/μl đến 10^{-7} fm/μl. Chứng [-] được sử dụng là dung dịch TE 1X. Cho 5μl các độ pha loãng của chứng [+] và chứng [-] vào các MPL A, B và C tương ứng. Thể tích của các MPL A, B và C là 15μl, như vậy tổng thể tích của mỗi phản ứng là 20μl. **Bảng 3, 4 và 5** (phần phụ lục) trình bày cách cho các chứng [+] và chứng [-] vào các MPL A, B và C.

Sau khi cho các chứng [+] và chứng [-] vào các MPL A, B và C; ly tâm lắng rồi cho vào máy real-time PCR của Biorad (CFX96 touch screen, Mỹ). Chọn 4 kênh màu FAM, HEX, TexasRED và CY5. Chạy chương trình one-step RT real-time PCR gồm các bước sau: (i) Đầu tiên là chương trình phiên mã ngược ở 45°C trong 10 phút; (ii) Sau đó bắt hoạt enzyme phiên mã ngược và kích hoạt enzyme hot-start Taq polymerase ở 95°C trong 10 phút; (iii) Cuối cùng chạy chương trình real-time PCR trong 40 chu kỳ với 2 bước nhiệt độ 95°C trong 15 giây để biến tính và 60°C trong 01 phút để nhân bản và phát hiện trình tự đích

3. *Khảo sát khả năng phát hiện các biến thể SARS-CoV-2 trên các mẫu thật*

Các mẫu thật gồm các mẫu tách chiết RNA đã xác định SARS-CoV-2 dương tính và một số mẫu thật là các mẫu thử đã được làm xét nghiệm RT-PCR và xác định là [+] với SARS-CoV-2. Với các mẫu là các tách chiết RNA thì lấy trực tiếp dịch tách chiết này để thực hiện One-step RT real-time PCR. Với các mẫu thật thì tiến hành tách chiết RNA bằng bộ thuốc thử^{NK} DNARNAPrep MAGBEAD của công ty Nam Khoa thực hiện trên máy tách chiết tự động. Các tách chiết RNA

được cho vào MPL-A, MPL-B và MPL-C với thể tích 5µl cho mỗi mix chứa 15µl One-step RT real-time PCR mix. Ly tâm lắng các MPL rồi cho vào buồng ủ nhiệt của máy real-time PCR và chạy chương trình one-step RT real-time PCR như trình bày ở phần trên. Để khảo sát độ nhạy phát hiện các biến thể SARS-CoV-2 trên mẫu thật, tiến hành pha loãng các tách chiết RNA từ các mẫu thật được xác định [+] với SARS-CoV-2 rồi cho vào các MPL-A, MPL-B và MPL-C, chạy chương trình one-step RT real-time PCR rồi ghi nhận kết quả để tìm độ pha loãng cao nhất mà vẫn còn có thể phát hiện gen E, các biến thể, hai đột biến D614D và E484K. Với các mẫu đã có kết quả xác định được các biến thể của SARS-CoV-2, chọn những mẫu có kết quả real-time phát hiện sớm tức là có nồng độ vi rút cao rồi thực hiện giải trình tự toàn bộ gen S. So sánh kết quả giải trình tự với kết quả real-time trong xác định các biến thể SARS-CoV-2.

Kết quả nghiên cứu

1. *Độ nhạy của bộ xét nghiệm khi thử trên các mẫu chứng dương*

Độ nhạy trong phát hiện gen E: Bảng 6 (phần phụ lục) trình bày kết quả độ nhạy trong phát hiện gen E. Kết quả cho thấy độ nhạy trong phát hiện SARS-CoV-2 là 10^{-6} fm/µl (1-10 copies cho một thể tích dịch tách chiết RNA cho vào ống phản ứng)

Độ nhạy trong phát hiện biến thể Alpha (UK), Delta (InD), Beta (SAF) và Gamma (BrZ): Bảng 7 (phần phụ lục) trình bày kết quả độ nhạy trong phát hiện biến thể Alpha. Kết quả cho thấy cho đến ở hàm lượng chứng [+] là 10^{-6} fm/µl (1-10 copy cho một thể tích dịch tách chiết RNA cho vào ống phản ứng) vẫn có thể phân biệt được biến thể UK (không cho tín hiệu khuếch đại ở kênh HEX) với không phải biến thể UK (cho tín hiệu khuếch đại ở kênh HEX). **Bảng 8** (phần phụ lục) trình bày kết quả độ nhạy trong phát hiện biến thể Delta. Kết quả cho thấy cho đến ở hàm lượng chứng [+] là 10^{-5} fm/µl (10-100 copies cho một thể tích dịch tách chiết RNA cho vào ống phản ứng) vẫn có thể phân biệt được biến thể InD (không cho tín hiệu khuếch đại ở kênh FAM) với không phải biến thể InD (cho tín hiệu khuếch đại ở kênh FAM). **Bảng 9** (phần phụ lục) trình bày kết quả độ nhạy trong phát hiện biến thể Beta. Kết quả cho thấy cho đến ở hàm lượng chứng [+] là 10^{-6} fm/µl (1-10 copy cho một thể tích dịch tách chiết RNA cho vào ống phản ứng) vẫn có thể phân biệt được biến thể SAF (không cho tín hiệu khuếch đại ở kênh HEX) với không phải biến thể SAF (cho tín hiệu khuếch đại ở kênh HEX). **Bảng 10** (phần phụ lục) trình bày kết quả độ nhạy trong phát hiện biến thể Gamma. Kết quả cho thấy cho đến ở hàm lượng chứng [+] là 10^{-6} fm/µl (1 copy cho một thể tích dịch tách chiết RNA cho vào ống phản ứng), vẫn có thể phân biệt được biến thể BrZ (Ct của CY5 sớm hơn TexasRED) với không phải biến thể BrZ (Ct của CY5 không sớm hơn TexasRED)

Độ nhạy trong phát hiện các đột biến D614G và E484K: Bảng 11 (phần phụ lục) trình bày kết quả độ nhạy trong phát hiện đột biến D614G. Kết quả cho thấy cho đến ở hàm lượng chứng [+] là 10^{-5} fm/µl (10-100 copy cho một thể tích dịch tách chiết RNA cho vào ống phản ứng), vẫn có thể phân biệt được có đột biến D614G (Ct của FAM sớm hơn HEX) với không có đột biến D614G (Ct của FAM không sớm hơn HEX). **Bảng 12** (phần phụ lục) trình bày kết quả độ nhạy trong phát hiện đột biến E484K. Kết quả cho thấy cho đến ở hàm lượng chứng [+] là 10^{-5} fm/µl (10-100 copy cho một thể tích dịch tách chiết RNA cho vào ống phản ứng), vẫn có thể phân biệt được có đột biến E484K (Ct của CY5 sớm hơn TexasRED) với không có đột biến E484K (Ct của CY5 không sớm hơn TexasRED)

2. *Kết quả thử nghiệm trên các mẫu thật*

Đọc kết quả trên MPL A để (a1) Phát hiện và định lượng gen E dựa vào tín hiệu khuếch đại của kênh FAM; (a2) Phát hiện biến thể Alpha dựa vào sự thất bại của tín hiệu khuếch đại kênh HEX; (a3) Phát hiện chứng nội dựa vào tín hiệu khuếch đại kênh CY5. Đọc kết quả trên MPL B để: (b1)

Phát hiện biến thể Delta dựa vào sự thất bại của tín hiệu khuếch đại kênh FAM; (b2) Phát hiện biến thể Beta dựa vào sự thất bại của tín hiệu khuếch đại kênh HEX; (b3) Phát hiện biến thể Gamma dựa vào sự xuất hiện của tín hiệu khuếch đại kênh CY5 sớm hơn so với tín hiệu khuếch đại kênh TexasRED. **Bảng 13** trình bày cách đọc kết quả để phát hiện các biến thể trên MPL A và MPL B, các kết quả ngoài kết quả trình bày trong **bảng 13** không cho phép xác định biến thể. Đọc kết quả trên MPL C để: (c1) Phát hiện có đột biến D614G dựa vào sự xuất hiện của tín hiệu khuếch đại kênh FAM sớm hơn tín hiệu khuếch đại kênh HEX; (c2) Phát hiện có đột biến E484K dựa vào sự xuất hiện của tín hiệu kênh CY5 sớm hơn tín hiệu khuếch đại kênh TexasRED.

Kết quả trên các mẫu lưu lấy từ TP. HCM: Có 8 mẫu lưu RNA lấy vào tháng 4 năm 2020, kết quả có 5 mẫu âm nghiệm có lẽ do hàm lượng RNA thấp và đã bị hủy trong quá trình lưu trữ, 3 mẫu cho kết quả không phải các biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta, không có đột biến D614G và đột biến E484K. Đặc điểm của các mẫu này là có 1 mẫu cho chu kỳ ngưỡng sớm là 22.93, 2 mẫu còn lại cho chu kỳ ngưỡng trễ là 30.90 và 33.54. Có 23 mẫu lưu RNA lấy vào tháng 6 năm 2020, kết quả tất cả đều là biến thể Delta, có đột biến D614G và không có đột biến E484K. Đặc điểm của các mẫu này là có chu kỳ ngưỡng gen E sớm, sớm nhất là 14.2 còn trễ nhất là 31.4 với đa số là dưới 25. Kết quả được trình bày trong **bảng 14** (phần phụ lục).

Kết quả trên các mẫu lưu lấy từ Quảng Nam: Có 8 mẫu lưu RNA lấy vào tháng 7 năm 2020, kết quả có 5 mẫu âm nghiệm có lẽ do hàm lượng RNA thấp và đã bị hủy trong quá trình lưu trữ, 3 mẫu cho kết quả không phải các biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta, có đột biến D614G nhưng không có đột biến E484K. Đặc điểm các mẫu này là có 1 mẫu Ct 31.84, 1 mẫu Ct 25.54 và 1 mẫu Ct 27.68. Có 12 mẫu lưu RNA lấy vào tháng 6 năm 2021, kết quả cho thấy có 7 mẫu âm nghiệm do hàm lượng RNA thấp, 4 mẫu là biến thể Alpha có đột biến D614G và không đột biến E484K, 1 mẫu không phải các biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta, có đột biến D614G và nhưng không có đột biến E484K. Kết quả được trình bày trong **bảng 15** (phần phụ lục).

Qua các kết quả thử nghiệm trên các mẫu thật dù số lượng không nhiều nhưng cũng có thể có một số nhận định sau: (i) Ngay từ đầu dịch thì TP. HCM chỉ có chủng nguyên thủy, chưa đột biến D614G cũng như E484K, nhưng hiện nay tại TP. HCM đang lưu hành biến thể Delta có đột biến D614G nhưng vẫn chưa có đột biến E484K và tải lượng virus phát hiện được là khá cao. (ii) Tại Quảng Nam thì vụ dịch vào tháng 7 năm 2020 là do chủng đột biến D614G, nhưng hiện nay với các mẫu của tháng 6 năm 2021 thì các chủng phát hiện được là biến thể Alpha có đột biến D614G và chưa có đột biến E484K và đặc điểm chung là tải lượng virus không cao lắm. Các **biểu đồ 1 đến 4** (phần phụ lục) minh họa các kết quả phát hiện các biến thể và các đột biến

Sơ sánh với kết quả giải trình tự: Dựa trên kết quả MPL real-time PCR, chọn một mẫu biến thể Alpha (PCT-03), một mẫu biến thể Delta (P7), một mẫu không đột biến (P29) và 1 mẫu chỉ có đột biến D614G (C11) là những mẫu có Ct của gen E sớm nhất để thực hiện giải trình tự trực tiếp. Kết quả các đột biến phát hiện được qua giải trình tự được trình bày trong **hình 1** và **bảng 16**.

Độ nhạy của xét nghiệm phát hiện các biến thể và các đột biến D614G và E484K: Phân tích chu kỳ ngưỡng của các đường biểu diễn khuếch đại trên các MPL-A, MPL-B, MPL C được cho vào các độ pha loãng tách chiết RNA của các mẫu P7 (biến thể Delta) và PCT-03 (biến thể Alpha) để xác định độ nhạy trong phát hiện gen E, các biến thể Alpha và Delta, đột biến D614G và E484K. Độ nhạy trong phát hiện gen E là độ pha loãng cao nhất hay số copy thấp nhất của vi rút mà vẫn còn tín hiệu khuếch đại kênh FAM trên MPL-A. Độ nhạy trong phát hiện các biến thể là độ pha loãng cao nhất hay số copy thấp nhất của vi rút mà vẫn còn có thể phân biệt được biến thể khi đọc kết quả trên MPL-A và MPL-C. Ví dụ cụ thể trong **bảng 17** (phần phụ lục) độ nhạy phát hiện được biến thể Delta là 10 copy vì ở hàm lượng vi-rút này vẫn biết được mẫu không phải là biến thể Alpha (có tín hiệu khuếch đại trên kênh HEX ở MPL-A), không phải là biến thể Beta (có tín hiệu khuếch đại kênh HEX ở MPL-B) và cũng không phải là biến thể Gamma (Ct của TexasRED

sớm hơn CY5 ở MPL-B), còn ở hàm lượng thấp hơn thì dù vẫn biết được không phải là biến thể Alpha, không phải là biến thể Beta nhưng không thể phân biệt có phải là biến thể Delta hay biến thể Gamma vì kênh FAM không có tín hiệu khuếch đại và kênh TexasRED/CY5 cũng không có tín hiệu khuếch đại. Độ nhạy của phát hiện đột biến D614G là độ pha loãng cao nhất hay số copy thấp nhất của vi rút mà trên MPL-C vẫn phân biệt được là có đột biến D614G (Ct kênh FAM sớm hơn kênh HEX) hay không có đột biến D614G (Ct kênh HEX sớm hơn kênh FAM). Độ nhạy của phát hiện đột biến E8814K là độ pha loãng cao nhất hay số copy thấp nhất của vi rút mà trên MPL-C vẫn phân biệt được là có đột biến E484K (Ct kênh CY5 sớm hơn kênh TexasRED) hay không có đột biến D614G (Ct kênh TexasRED sớm hơn kênh CY5). Phân tích kết quả trên **bảng 17** cho thấy độ nhạy trong phát hiện Gen E là 1 copy, biến thể Delta là 10 copy, đột biến D614G là 10 copy và E484K cũng là 10 copy. Độ nhạy phát hiện gen E, phát hiện biến thể Alpha, đột biến D614G và E484K được trình bày trong **bảng 18** (phần phụ lục). Phân tích kết quả cho thấy độ nhạy trong phát hiện Gen E là 1 copy, biến thể Alpha là 100 copy, đột biến D614G là 10 copy và E484K cũng là 10 copy. Ngoài ra tách chiết RNA của mẫu P29 được ghi nhận không có đột biến cũng được pha loãng thành nhiều độ pha loãng và được cho vào các MPL-A, MPL-B và MPL-C để phân tích độ nhạy phát hiện gen E cũng như D614G và E484K. Kết quả được trình bày trong **bảng 19** (phần phụ lục). Phân tích kết quả trên **bảng 19** cho thấy độ nhạy trong phát hiện Gen E là 1 copy, phát hiện không phải Alpha, Beta, Gamma và Delta cũng là 1 copy. Độ nhạy trong phát hiện không có đột biến D614G và E484K là dưới 1 copy.

Bàn luận

WHO đã có những khuyến nghị về các kỹ thuật nên được sử dụng để phát hiện các biến thể của SARS-CoV-2, dĩ nhiên kỹ thuật giải trình tự toàn bộ genome bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing) hay bằng phương pháp Sanger, thậm chí chỉ cần giải trình tự toàn bộ gen S là cũng đủ để được xem là chuẩn vàng^[10]. Tuy nhiên để có thể theo dõi kịp thời sự thay đổi của các biến thể trong một vùng dịch tễ tại các phòng xét nghiệm chẩn đoán hay chống dịch thì kỹ thuật real-time PCR được xem là thích hợp nhất. Hiện nay cũng đã có một số nghiên cứu^[11-17] cũng như một số bộ kit thương mại^[18-21] áp dụng kỹ thuật real-time PCR phát hiện các đột biến và các biến thể khác nhau của SARS-CoV-2, tuy nhiên vẫn còn rất hiếm các nghiên cứu hay các kit thương mại dành để phát hiện biến thể Delta và cũng chưa có một nghiên cứu phát hiện một lúc 4 biến thể lây lan nhanh như công trình nghiên cứu này.

Các công trình hay các kit thương mại hiện nay thường nhắm mục tiêu là phát hiện các đột biến rồi dựa vào sự phát hiện các đột biến để phân biệt được các biến thể. Các kỹ thuật real-time được sử dụng rất đa dạng, có thể là phân tích đường cong chảy của các sản phẩm khuếch đại, có thể là Taqman real-time PCR phát hiện các phát hiện các đa hình đơn nucleotide (SNP), có thể là real-time PCR dựa trên kẹp phân tử (molecular-clamping based real-time PCR) là kỹ thuật sử dụng thêm trình tự có xenonucleic acid (XNA) để khóa trình tự không đột biến^[21]...

Trong nghiên cứu này, chúng tôi không cần phải phát hiện nhiều đột biến mà chỉ cần phát hiện các đột biến đặc trưng cho từng biến thể để dựa vào đó mà phát hiện các biến thể. Chính nhờ vậy mà chỉ cần có hai MPL real-time PCR A và B là đủ để phát hiện 4 biến thể lây lan nhanh nhất hiện nay, đó là biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta. Ngoài ra, có thêm MPL real-time PCR C để phát hiện hai đột biến D614G và E484K cũng có vai trò rất quan trọng. Đột biến D614G là đột biến xuất hiện ban đầu và hiện diện trong tất cả các biến thể của SARS-CoV-2 hiện nay, nếu không có đột biến này thì chắc chắn vi rút sẽ không có khả năng lây lan nhanh. Phát hiện đột biến này giống như một chứng nội cho sự phát hiện các biến thể vì nếu phát hiện được biến thể mà không có đột biến D614G thì có thể có một sai lầm hay một bất thường nào đó. Đột biến E484K là một trong các đột biến có vai trò giúp cho vi rút kháng được khả năng trung hòa của các kháng thể đặc hiệu dùng trong điều trị người

bị COVID-19 nặng và cũng có thể có nguy cơ giúp vi rút kháng được vắc xin. Đó chính là hai lý do để bộ kit phát hiện các biến thể Alpha, Beta, Gamma và Delta phải có thêm MPL C.

Tình hình dịch COVID-19 hiện nay trên thế giới là rất phức tạp, dịch bùng phát tại các quốc gia Nam Á và Đông Nam Á mà tác nhân là biến thể Delta xuất phát từ Ấn Độ. Tại các nước mà độ bao phủ vắc xin đã đủ rộng để tạo được miễn dịch cộng đồng thì dịch COVID-19 vẫn tái bùng phát vì biến thể Delta, mặc dù ở các quốc gia này số người bị COVID-19 nặng hay bị tử vong vì COVID-19 không còn cao như là trong giai đoạn không có vắc xin. Tại Việt Nam, cũng do biến thể Delta mà dịch COVID-19 hiện nay đang bùng phát mạnh tại TP. Hồ Chí Minh, rồi các tỉnh thành Nam Bộ; Nguy cơ biến thể Delta lan ra các tỉnh thành miền Trung, Hà Nội và các tỉnh khác là khó tránh khỏi. Dĩ nhiên giải pháp để thoát khỏi dịch COVID-19 là phải biến COVID-19 thành một bệnh cảm cúm thông thường bằng cách chích vắc xin càng nhiều người càng tốt để đạt được miễn dịch cộng đồng. Tuy nhiên với SARS-CoV-2, một tác nhân virus mà các đột biến giúp hình thành các biến thể lây lan nhanh hơn và gây bùng phát dịch không chỉ là thực tế mà còn là khả năng. Chính vì vậy việc nhanh chóng phát hiện các biến thể cũng như các bất thường trong phát hiện các biến thể là rất cần thiết để giúp truy vết nhanh nguy cơ xuất hiện các ổ dịch cũng như bùng phát dịch mới. Dĩ nhiên tại các trung tâm nghiên cứu quốc tế về SARS-CoV-2 thì việc giải trình tự các mẫu lấy từ bệnh nhân được phát hiện [+] với SARS-CoV-2 là một nghiên cứu được tiến hành liên tục. Tuy nhiên với các phòng thí nghiệm chẩn đoán hay chống dịch thì với phương tiện real-time vẫn có thể phát hiện được sự lưu hành của các biến thể hiện hành và cũng có thể báo trước được sự thay đổi biến thể nếu có trang bị thêm các thuốc thử phát hiện các biến thể. Bộ thuốc thử được phát triển trong công trình nghiên cứu này chính là để đáp ứng cho nhu cầu thực tế đó.

Kết luận

Công trình nghiên cứu này có thể được xem là một trong rất ít nghiên cứu sử dụng real-time PCR phát hiện được 4 biến thể lây lan nhanh nhất hiện nay. Do khả năng tiếp cận được các nguồn mẫu lưu còn hạn chế nên chúng tôi chỉ thử nghiệm trên một số ít mẫu lưu thôi. Tuy nhiên với các kết quả ghi nhận được chúng tôi cũng có thể có một nhận định về diễn tiến lưu hành các biến thể tại Việt Nam từ khi khởi phát dịch vào tháng 4 năm 2020 đến nay. Khi mới bắt đầu dịch COVID-19 thì Việt Nam lưu hành dòng SARS-CoV-2 nguyên thủy và có cũng có một số ít có đột biến D614G. Tuy nhiên đến tháng 7 năm 2020 thì chủng SARS-CoV-2 có đột biến D614G đã bắt đầu thay thế chủng nguyên thủy. Các đợt bùng phát dịch này vẫn còn lẻ tẻ vì hầu hết là từ các khách Âu Mỹ đến Việt Nam chưa lây lan ra cộng đồng. Tuy nhiên đến cuối năm 2020, dịch bùng phát tại Bắc Giang và chủng lưu hành theo các thông tin báo chí là biến thể Alpha. Từ lúc này Việt Nam đã bắt đầu khá vất vả để đối phó biến thể này. Hiện nay biến thể đang lưu hành tại TP. HCM là biến thể Delta và như chúng ta đã thấy việc đối phó với dịch COVID-19 gây ra do biến thể Delta gây ra là cực kỳ khó khăn; nguy cơ biến thể sau khi lây lan về các tỉnh thành Nam Bộ sẽ tiếp tục lây lan đến các tỉnh thành Trung và Bắc là rất có khả năng xảy ra. Nếu có điều kiện, chúng tôi sẽ thử nghiệm trên các mẫu lưu tại các tỉnh thành và như vậy là sẽ có một bản đồ lịch sử dịch tế chi tiết hơn về sự lưu hành của các biến thể SARS-CoV-2 tại Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Ewen Callaway. (2020). Making Sense of Coronavirus Mutations. Nature. 585:174-177
2. Thuong V. Nguyen et al. (2021). Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 strains circulating in Vietnam: Understanding the nature of the epidemic and role of the D614G mutation. J Med Virol. 2021;1-6.
3. Tam Thi Nguyen et al. (2020). Genetic diversity of SARS-CoV-2 and clinical, epidemiological characteristics of COVID-19 patients in Hanoi, Vietnam. PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242537> November 17, 2020
3. CDC. (2021). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Updated June 15, 2021.
4. Rambaut A, Loman N, Pybus O, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, et al. (18 December 2020). "Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations"

<https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>

5. Horby, Peter; Barclay, Wendy; Huntley, Catherine (13 January 2021). *NERVTAG paper: brief note on SARS-CoV-2 variants* (<https://www.gov.uk/government/publications/nervtag-brief-note-on-sars-cov-2-variant-s-13-january-2021>).
6. "Confirmed cases of COVID-19 variants identified in UK" (<https://www.gov.uk/government/news/confirmed-cases-of-covid-19-variants-identified-in-uk>)
7. Horby, Peter; Barclay, Wendy; Gupta, Ravi; Huntley, Catherine (27 January 2021). *NERVTAG paper: note on variant P.1* (<https://www.gov.uk/government/publications/nervtag-note-on-variant-p1-27-january-2021>)
8. Azad, Arman (17 March 2021). "Coronavirus strains first detected in California are officially 'variants of concern,' CDC says" (<https://edition.cnn.com/2021/03/17/health/california-variants-of-concern-cdc/index.html>).
9. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England, technical briefing 10 (https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/984274/Variants_of_Concern_VOC_Technical_Briefing_10_England.pdf)
10. ECDC and WHO. (2021). Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. March 2021
11. <https://www.thermofisher.com/vn/en/home/clinical/genomics/pathogen-detection-solutions/real-time-pcr-research-solutions-sars-cov-2/mutation-panel.html>
12. E. 'Alvarez-Argüelles et Al. (2021). A novel single nucleotide polymorphism assay for the detection of N501Y SARS-CoV-2 variants. *Journal of Virological Methods* 294 (2021) 114143
13. Octavio Patricio Garcí'a-González; José Francisco Muñoz-Valle et al. (2021). RT-qPCR Assays for Rapid Detection of the N501Y, 69-70del, K417N, and E484K SARS-CoV-2 Mutations: A Screening Strategy to Identify Variants With Clinical Impact. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Volume 11 | Article 672562
14. Ariel Kushmaro et al. (2021). Direct RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 variants of concern (Alpha, B.1.1.7 and Beta, B.1.351) detection and quantification in wastewater. *Environmental Research* 201 (2021) 111653
15. R. Fauver, Nathan D. Grubaugh et al. (2021). Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. *PLOS Biology* May 7, 2021
16. G La Rosa et al. (2021). Rapid screening for SARS-CoV-2 variants of concern in clinical and environmental samples using nested RT-PCR assays targeting key mutations of the spike protein. *Water Research* 197 (2021) 117104.
17. Maidar Jamba, Michael Y. Sha et al. (2021). A Rapid SARS-CoV-2 Variant Detection 1 by Molecular-Clamping Based RT-qPCR. *medRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.01.21254484>; this version posted April 5, 2021.
18. <https://en.vircell.com/products/sars-cov-2-variants-realtime-pcr-kit/> (Alpha, Beta, Gamma)
19. <https://www.certest.es/news/new-viasure-sars-cov-2-variant-i-variant-ii-rt-pcr-kits/>
20. <https://www.bio-rad.com/featured/en/sars-cov-2-variants-pcr-assays.html>
21. <https://pentabase.com/mutations/>

Phụ lục

Bảng 1: Số truy cập trên NCBI gene bank để từ đó thiết kế các trình tự mồi và đoạn dò

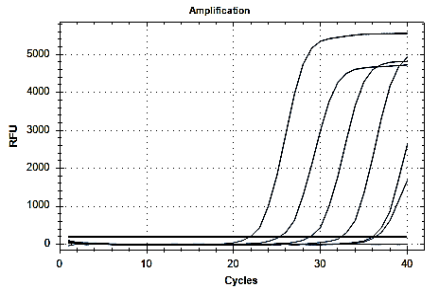
Name	Access number	Tm (°C)	Tinh sạch
E_Sarbeco_F1	MW134454.1	(56.5)	Desalted
E_Sarbeco_R2		(59.4)	Desalted
E_Sarbeco_P3 (FAM)		(69.9)	HPLC
UK_TqF	OU369514.1 and NC_045512.2	(60.5)	Desalted
UK_TqR		(60.7)	Desalted
UK_TqPR (HEX)		(69.9)	HPLC
InD_TqF	OU458307.1 and NC_045512.2	(61.4)	Desalted
InD_TqR		(60.3)	Desalted
InD_TqPR (FAM)			HPLC
SAF_TqF	MZ619702.1 and NC_045512.2	(60.3)	Desalted
SAF_TqR		(60)	Desalted
SAF_TqPR (HEX)		(70.9)	HPLC
BrZ_TqF	MZ306763.1 and NC_045512.2	(60.5)	Desalted
BrZ_TqR		(60.5)	Desalted
BrZ_TqPR1 (TexasRED)		(70.3)	HPLC
BrZ_TqPR2 (CY5)		(69.9)	HPLC
614_TqF	MZ702392.1 and NC_045512.2	(59.9)	Desalted
614_TqR		(61.1)	Desalted
614G_TqPR (FAM)		(70.3)	HPLC
614D_TqPR (HEX)		(69.9)	HPLC
484_TqF	MZ619702.1 and MZ306763.1 and NC_045512.2	(60.6)	Desalted
484_TqR		(60.6)	Desalted
484E_TqPR (TexasRED)		(70)	HPLC
484K-TqPR (CY5)		(70.2)	HPLC
RNAseP_TqF			Desalted

Bảng 5: Cho các độ pha loãng chứng [+] 614D_Oligo, 614G_Oligo, 484E_Oligo, 484K_Oligo vào các MPL C

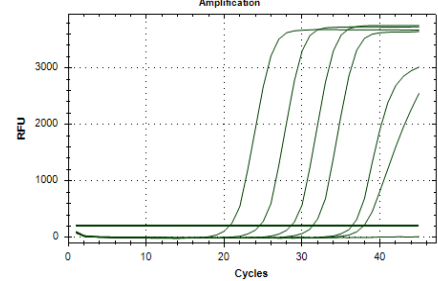
	Độ pha loãng theo hệ số pha loãng 10 của chứng [+] 614D_Oligo và 614G_Oligo														Chứng
	10 ⁻⁹		10 ⁻¹⁰		10 ⁻¹¹		10 ⁻¹²		10 ⁻¹³		10 ⁻¹⁴		10 ⁻¹⁵		[-]
MPL C	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl
614D_Oligo	5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		
614G_Oligo		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl	
TE 1X															5µl
	Độ pha loãng theo hệ số pha loãng 10 của chứng [+] SAF_Oligo và notSAF_Oligo														Chứng
	10 ⁻⁹		10 ⁻¹⁰		10 ⁻¹¹		10 ⁻¹²		10 ⁻¹³		10 ⁻¹⁴		10 ⁻¹⁵		[-]
MPL C	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl
484E_Oligo	5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		
484K_Oligo		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl		5µl	
TE 1X															5µl

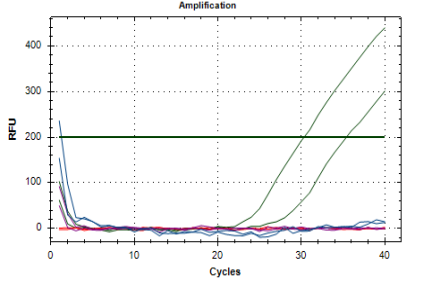
Bảng 6: Ct các tín hiệu khuếch đại kênh FAM (gen E) được ghi nhận từ biểu đồ của MPL-A (biểu đồ phải) khi cho các độ pha loãng của chứng [+] gen E.

MPL-A	Hàm lượng fm/µl	FAM (gen E) Ct
E-9	10 ⁻¹	21.91
E-10	10 ⁻²	25.27
E-11	10 ⁻³	28.77
E-12	10 ⁻⁴	32.38
E-13	10 ⁻⁵	36.02
E-14	10 ⁻⁶	36.31
E-15	10 ⁻⁷	NA

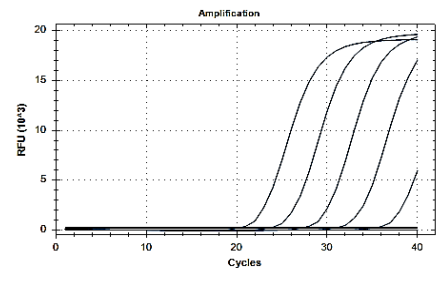


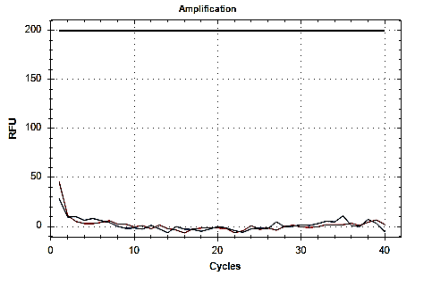
Bảng 7: Ct các tín hiệu khuếch đại kênh HEX được ghi nhận từ biểu đồ tín hiệu của MPL-A khi cho các độ pha loãng của chứng [+] không phải biến thể UK (biểu đồ trái) và chứng [+] là biến thể UK (biểu đồ phải).

HEX Ct		HEX Ct
20.61		NA
24.45		NA
28.50		NA
31.29		NA
36.34		NA
37.84		NA
NA		NA
NA		NA

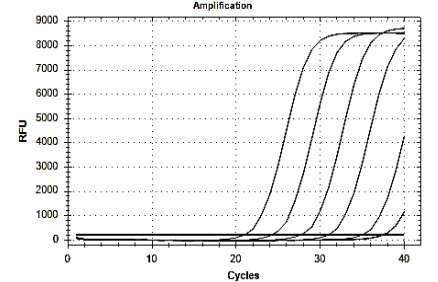


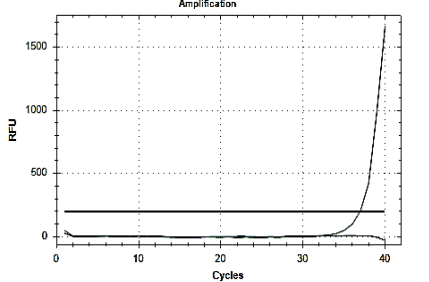
Bảng 8: Ct các tín hiệu khuếch đại kênh FAM được ghi nhận từ biểu đồ của MPL-B khi cho các độ pha loãng của chứng [+] không phải biến thể InD (biểu đồ trái) và chứng [+] là biến thể InD (biểu đồ phải).

FAM Ct		FAM Ct
20.19		NA
23.46		NA
27.16		NA
30.85		NA
35.17		NA
NA		NA
NA		NA
NA		NA

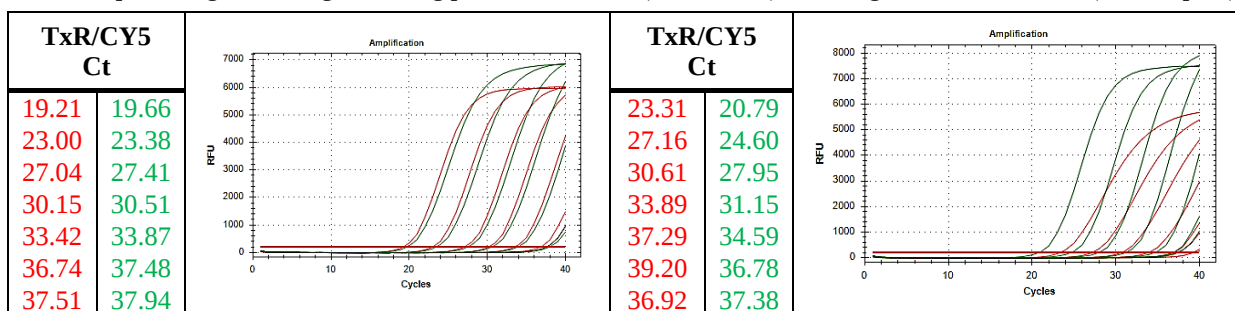


Bảng 9: Ct các tín hiệu khuếch đại kênh HEX được ghi nhận từ biểu đồ của MPL-B khi cho các độ pha loãng của chứng [+] không phải biến thể SAF (biểu đồ trái) và chứng [+] là biến thể SAF (biểu đồ phải).

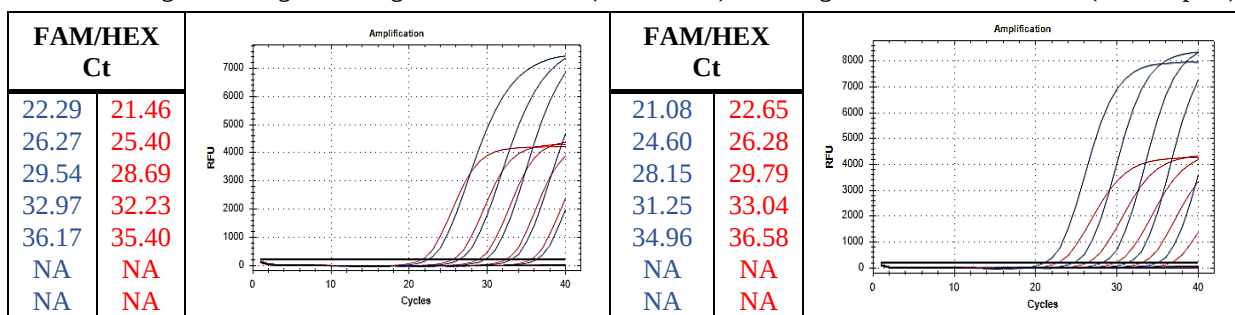
HEX Ct		HEX Ct
20.91		NA
24.16		NA
27.52		NA
30.87		NA
34.91		NA
37.31		NA
37.34		NA
37.34		NA



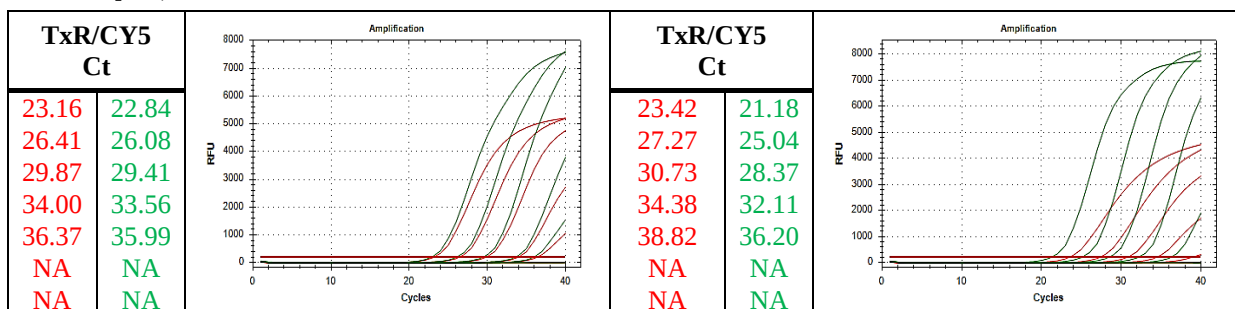
Bảng 10: Ct các tín hiệu khuếch đại kênh TexasRED và CY5 được ghi nhận từ biểu đồ của MPL-B khi cho các độ pha loãng của chứng [+] không phải biến thể BrZ (biểu đồ trái) và chứng [+] là biến thể BrZ (biểu đồ phải).



Bảng 11: Ct các tín hiệu khuếch đại kênh FAM và HEX được ghi nhận từ biểu đồ của MPL-C khi cho các độ pha loãng của chứng [+] không đột biến D614G (biểu đồ trái) và chứng [+] có đột biến D614G (biểu đồ phải).



Bảng 12: Ct các tín hiệu khuếch đại kênh TexasRED và CY5 được ghi nhận từ biểu đồ của MPL-C khi cho các độ pha loãng của chứng [+] không đột biến E484K (biểu đồ trái) và chứng [+] có đột biến E484K (biểu đồ phải).



Bảng 13: Cách đọc kết quả để xác định biến thể trên MPL A và MPL B. Các trường hợp khác ngoài khả năng này thì không thể đọc được kết quả phát hiện biến thể

MPL A			MPL B			Biến thể
FAM	HEX	CY5	FAM	HEX	TxRED vs CY5	
[+]	[+]	[+/-]	[-]	[+]	TxRED < CY5	Delta
[+]	[-]	[+/-]	[+]	[+]	TxRED < CY5	Alpha
[+]	[+]	[+/-]	[+]	[-]	TxRED < CY5	Beta
[+]	[+]	[+/-]	[+]	[+]	CY5 < TxRED	Gamma

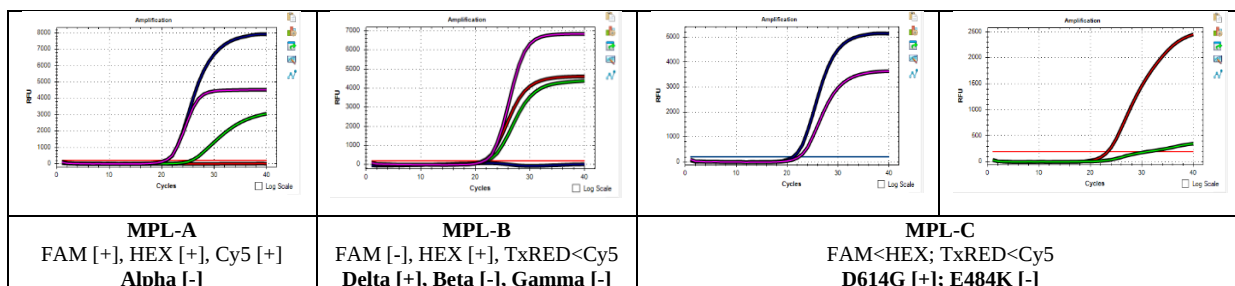
Bảng 14: Kết quả phát hiện các biến thể và các đột biến D614G và E484K của các mẫu lưu lấy từ TP. HCM

Mẫu lưu từ TP. HCM			Biến thể				Đột biến	
			Alpha	Beta	Gamma	Delta	D614G	E484K
Tháng 4/2020	Âm	(N=5)	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
	Dương	(N=3)	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
Tháng 6/2021	Âm	(N=0)	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
	Dương	(N=23)	[-]	[-]	[-]	[+]	[+]	[-]

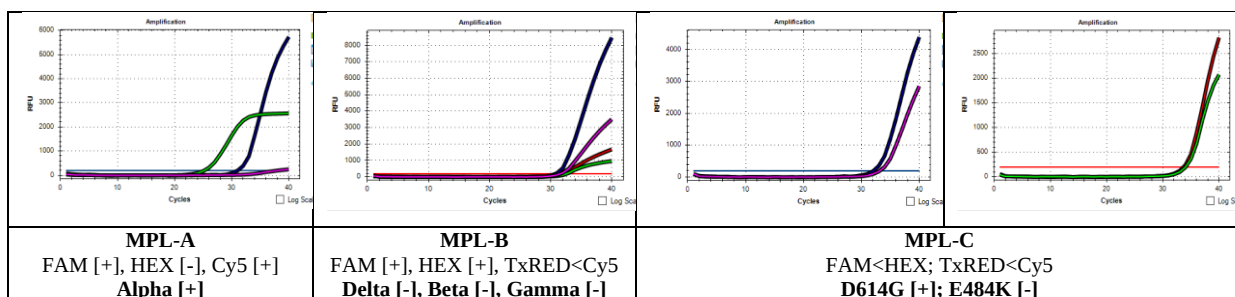
Bảng 15: Kết quả phát hiện các biến thể và các đột biến D614G và E484K của các mẫu lưu lấy từ Quảng Nam

Mẫu lưu từ Quảng Nam			Biến thể				Đột biến	
			Alpha	Beta	Gamma	Delta	D614G	E484K
Tháng 7/2020	Âm	(N=5)	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]

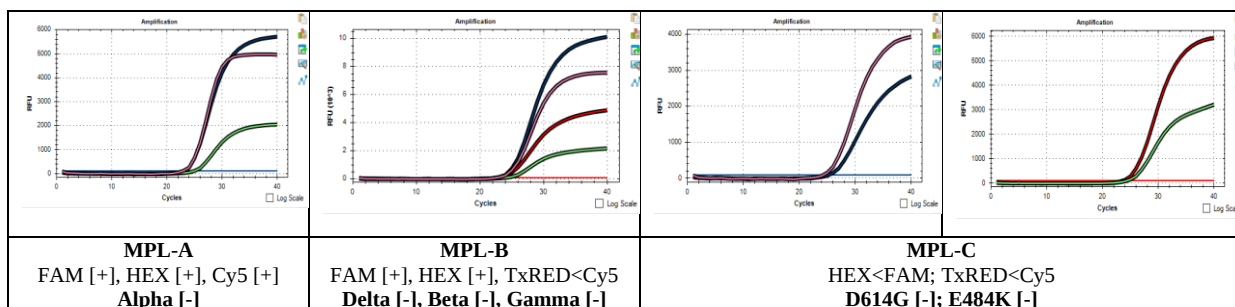
	Dương	(N=3)	[-]	[-]	[-]	[-]	[+]	[-]
Tháng 6/2021	Âm	(N=7)	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
	Dương	(N=4)	[+]	[-]	[-]	[-]	[+]	[-]
	Dương	(N=1)	[-]	[-]	[-]	[-]	[+]	[-]



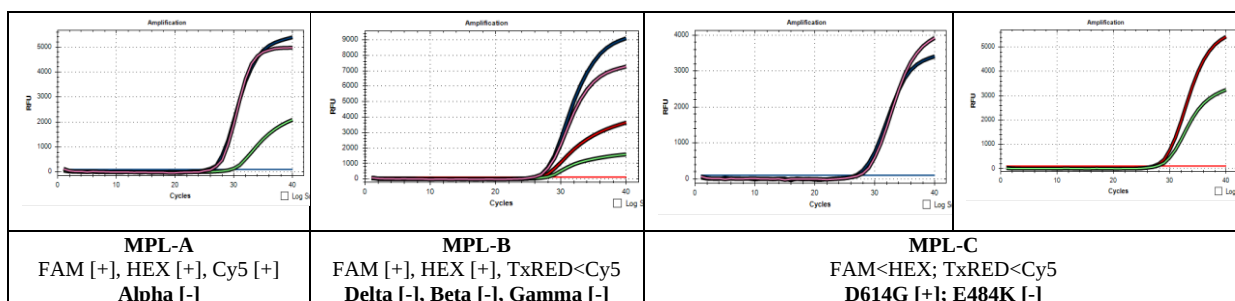
Biểu đồ 1: Kết quả xác định mẫu là biến thể Delta, có đột biến D614G, không đột biến E484K. (Các đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại với FAM (xanh đen), HEX (hồng), TexasRED (đỏ) và Cy5 (xanh lá))



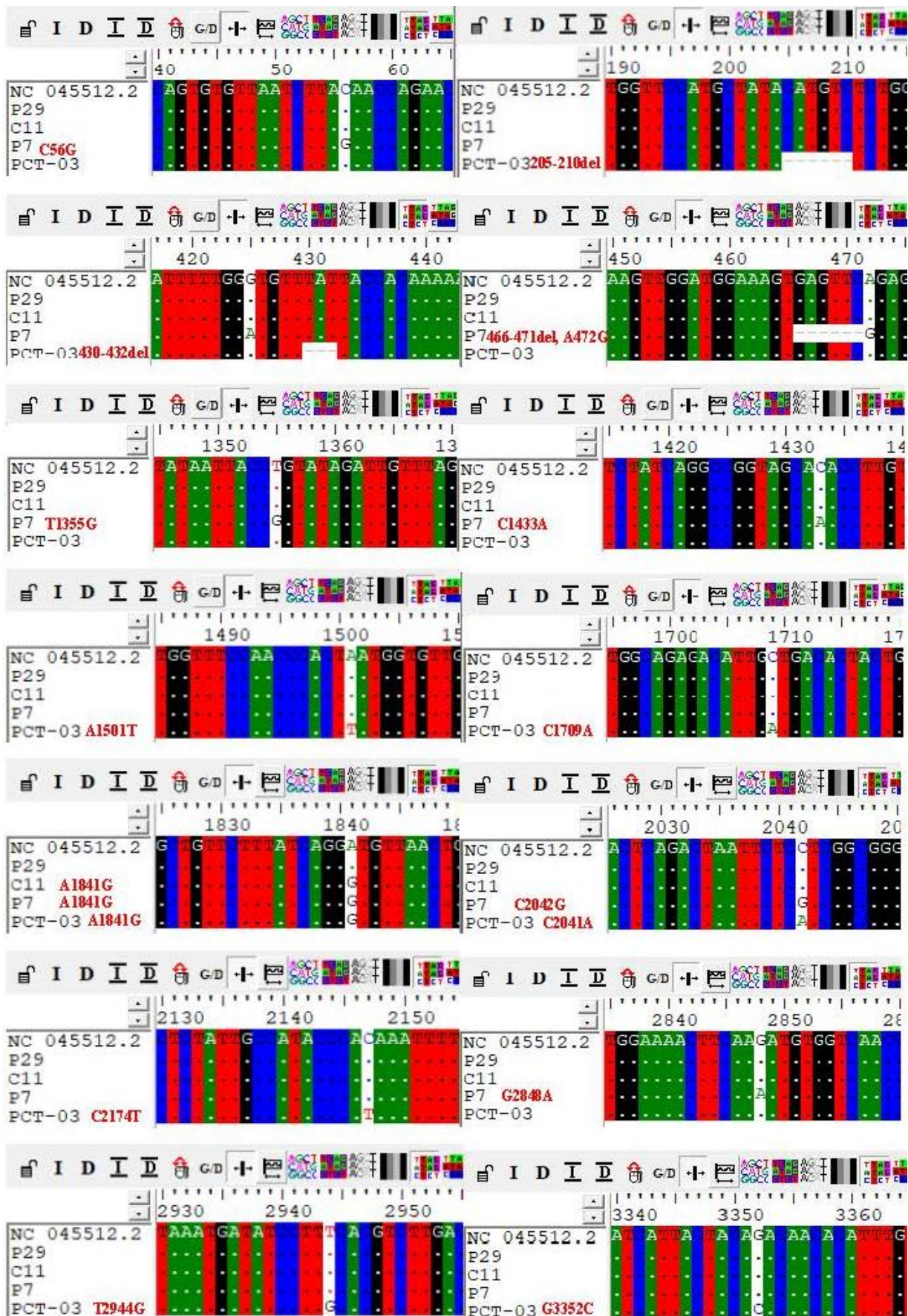
Biểu đồ 2: Kết quả xác định mẫu là biến thể Alpha, có đột biến D614G, không đột biến E484K. (Các đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại với FAM [xanh đen], HEX [hồng], TexasRED [đỏ] và Cy5 [xanh lá])



Biểu đồ 3: Kết quả xác định mẫu là chủng nguyên thủy, không đột biến D614G, không đột biến E484K. (Các đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại với FAM [xanh đen], HEX [hồng], TexasRED [đỏ] và Cy5 [xanh lá])



Biểu đồ 4: Kết quả xác định mẫu là không có biến thể, có đột biến D614G, không đột biến E484K. (Các đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại với FAM [xanh đen], HEX [hồng], TexasRED [đỏ] và Cy5 [xanh lá])



Hình 1: Kết quả so chuỗi các trình tự gen S trong các mẫu P29, C11, P7 và PCT-03 với trình tự gen S của vi rút SARS-CoV-2 tham chiếu (NC45512.2).

Bảng 16: Kết quả các đột biến phát hiện được qua giải trình tự các mẫu và với kết quả này có thể xác định mẫu P7 là biến thể Delta, mẫu PCT-03 là biến thể Alpha, mẫu P-29 là mẫu không đột biến, mẫu C11 là mẫu có đột biến D614G.

PCT-03		P7	
Nucleotide	Amino acid	Nucleotide	Amino acid
205-207del	69del;	C56G	T19R
208-210del	70del	G425A	G142D
430-432del	144del	466-468del	156del
A1501T	N501Y	469-471del	157del
C1709A	A570D	A472G	R158G
A1841G	D614G	T1355G	L452R
C2042A	P681H	C1433A	T478K
C2147T	T716I	A1841G	D614G
T2944G	S982A	C2042G	P681R
G3352C	D1118H	G2848A	D950N

P29		C11	
Nucleotide	Amino acid	Nucleotide	Amino acid
Không có đột biến trên gen S		A1841G	D614G

Bảng 17: Độ nhạy phát hiện gen E, phát hiện biến thể Delta, đột biến D614G và E484K được phân tích trên các giếng của MPL-A, MPL-B và MPL-C khi cho các độ pha loãng của các tách chiết RNA của mẫu P-7 được xác định là biến thể Delta.

P7	MPL-A		MPL-B			MPL-C	
Copy/v*	FAM	HEX	FAM	HEX	TxRED/CY5	FAM/HEX	TxRED/CY5
10 ⁶	17.02	18.08	NA	17.72	18.45/19.14	18.22/19.50	20.60/25.59
10 ⁵	20.34	21.33	NA	21.09	21.70/22.37	21.55/22.95	24.07/28.69
10 ⁴	23.44	24.59	NA	24.25	25.03/25.67	24.90/26.29	27.32/31.97
10 ³	26.74	28.01	NA	27.59	28.28/29.10	28.32/29.69	30.65/35.72
10 ²	30.00	31.17	NA	30.48	31.46/32.46	31.66/33.03	34.18/NA
10	34.09	33.8	NA	33.67	35.61/NA	34.22/35.39	36.26/NA
1	35.04	35.64	NA	36.56	NA/NA	NA/NA	NA/NA
10 ⁻¹	NA	35.24	NA	34.81	NA/NA	NA/NA	NA/NA

TxRED: TexasRED; v*: Thể tích mẫu tách chiết cho vào mỗi real-time PCR mix.

Bảng 18: Độ nhạy phát hiện gen E, phát hiện biến thể Alpha, đột biến D614G và E484K được phân tích trên các giếng của MPL-A, MPL-B và MPL-C khi cho các độ pha loãng của các tách chiết RNA mẫu PCT-03 được xác định là biến thể Alpha.

PCT-03	MPL-A		MPL-B			MPL-C	
Copy/v*	FAM	HEX	FAM	HEX	TxRED/CY5	FAM/HEX	TxRED/CY5
10 ²	31.63	N/A	31.43	31.38	32.12/33.84	32.95/33.50	33.42/34.28
10	35.07	N/A	33.91	35.42	NA/NA	37.30/37.54	37.05/38.29
1	36.43	NA	N/A	38.47	NA/NA	NA/NA	NA/NA
10 ⁻¹	N/A	N/A	N/A	N/A	NA/NA	NA/NA	NA/NA

TxRED: TexasRED; v*: Thể tích mẫu tách chiết cho vào mỗi real-time PCR mix.

Bảng 19: Độ nhạy phát hiện gen E, phát hiện không có biến thể, phát hiện không có đột biến D614G và E484K được phân tích trên các giếng của MPL-A, MPL-B và MPL-C khi cho các độ pha loãng của các tách chiết RNA của mẫu P29 được xác định không đột biến.

P29	MPL-A		MPL-B			MPL-C	
Copy/v*	FAM	HEX	FAM	HEX	TxRED/CY5	FAM/HEX	TxRED/CY5
10 ³	24.41	24.35	24.37	24.56	24.83/26.12	27.19/26.00	25.16/25.88
10 ²	27.57	27.62	27.64	28.01	28.20/29.51	30.31/29.22	28.28/29.13
10	31.2	31.33	30.59	31.16	31.05/32.42	34.00/32.69	31.54/32.37
1	33.76	34.55	33.33	33.42	35.44/NA	36.82/35.64	34.30/35.16
10 ⁻¹	NA	36.27	NA	37.62	36.24/NA	38.44/37.43	37.09/37.97

TxRED: TexasRED; v*: Thể tích mẫu tách chiết cho vào mỗi real-time PCR mix.