

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH REAL-TIME PCR ĐỊNH LƯỢNG NỒNG ĐỘ ADN VIRUT BK CÓ ĐỘ NHẠY CAO Ở BỆNH NHÂN GHEP THẬN

Đinh Thị Thu Hằng¹; Lê Thị Bảo Quyên^{1,2}
Phạm Quốc Toàn³; Hoàng Xuân Sử¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: tối ưu hóa quy trình real-time PCR định lượng nồng độ ADN virus BK có độ nhạy cao trong huyết tương, nước tiểu ở bệnh nhân sau ghép thận. **Vật liệu và phương pháp:** kỹ thuật real-time PCR được phát triển, tối ưu với độ nhạy cao trên cơ sở phân tích trình tự vùng gen đặc hiệu VP1 của các chủng virus BK từ bệnh nhân sau ghép thận ở Việt Nam và đánh giá độ chính xác, độ ổn định trên mẫu chuẩn cũng như đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu trên 30 mẫu nhóm bệnh virus BK (+) và 30 mẫu nhóm chứng người hiến máu tình nguyện virus BK (-). **Kết quả và kết luận:** quy trình real-time PCR tối ưu có độ chính xác cao khi đánh giá trên các mẫu chuẩn nồng độ 10^4 , 10^3 , 10^2 (copy/ μ l) với hệ số biến thiên nội phản ứng lần lượt là 0,42%; 1,92% và 1,07%, hệ số biến thiên liên phản ứng lần lượt là 3,38%; 1,28% và 1,47%, độ ổn định 4 tháng ở điều kiện -20°C . Khi đánh giá trên các mẫu nhóm bệnh và nhóm chứng, kỹ thuật đạt độ nhạy, độ đặc hiệu 100%. Đồng thời, kỹ thuật phù hợp tốt so với kit thương mại Realstar BKV PCR 1.0 (Hãng Altona) với hệ số Kappa 0,73 trong xác định virus BK. Kết quả bước đầu cho thấy, kỹ thuật real-time PCR này sử dụng phù hợp hơn trong chẩn đoán virus BK trên bệnh nhân ghép thận ở Việt Nam, đã định lượng được 8/30 mẫu virus BK (+) có nồng độ 10^2 - 10^4 copies/ml mà kit Altona bỏ sót. Như vậy, đã tối ưu thành công quy trình real-time PCR định lượng virus BK, góp phần theo dõi, giám sát virus BK ở bệnh nhân sau ghép thận, giảm thiểu tối đa nguy cơ thải ghép do virus BK có nguy cơ dẫn đến bệnh thận.

* Từ khóa: Virus BK; Bệnh thận do virus BK; Ghép thận; Real-time PCR.

Optimization of a Novel Real-Time PCR Quantitative Assay for BK Polyomavirus in Renal Allograft Recipients

Summary

Objectives: To optimize a novel high sensitive real-time PCR quantitative assay in plasma and urine specimens for BK polyomavirus screening strategies and treatment options in renal allograft recipients. **Materials and methods:** A real-time PCR assay for BK polyomavirus quantification was developed and optimized based on sequence analysing of VP1 gene of BK virus strains isolated from the Northern Vietnamese renal transplant recipients, and evaluated the reproducibility,

1. Học viện Quân y

2. Trường Đại học Quốc gia Hà Nội

3. Bệnh viện Quân y 103

Người phản hồi (Corresponding): Đinh Thị Thu Hằng (hangdinhbio@gmail.com)

Ngày nhận bài: 20/12/2018; **Ngày phản biện đánh giá bài báo:** 16/01/2019

Ngày bài báo được đăng: 22/01/2019

stability on standard panels, including 10^2 , 10^3 , 10^4 copies/ μ L concentration (recombinant plasmid), as well as the sensitivity, specificity on control groups. Results and conclusion: Intra assay precision of optimized real-time PCR assay was excellent reproducibility based on the linear range of quantification with low CV values which were 0.42%, 1.92% and 1.07% of 10^4 , 10^3 and 10^2 standards, respectively. Additionally, a high degree of inter assay precision of the assay was also identified (CV values were 3.38%, 1.28% and 1.47% of 10^4 , 10^3 and 10^2 standards, respectively), and the stability of 4 months when stored at -20°C . Both the sensitivity and specificity of our assay were 100% when we evaluated on 30 BK polyomavirus (+) samples and 30 BK polyomavirus (-) samples of volunteer blood donors. Furthermore, a comparison of 30 BK polyomavirus (+) samples showed a good agreement between this assay and RealStar BK polyomavirus PCR 1.0 kit results (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany) when analyzed by Cohen's kappa statistic. Notably, 8 other positive BK polyomavirus samples which were quantified by our assay were undetermined by RealStar BKV PCR 1.0 kit. In conclusion, the real-time PCR assay is a reliable non-invasive method for measuring BK polyomavirus load in plasma and urine specimens, and identifying patients at risk of BK virus-associated nephropathy in Vietnamese renal post-transplant patients.

* Keywords: BK polyomavirus; BK virus-associated nephropathy; Renal allograft recipient; Real-time PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ghép thận là phương pháp điều trị thay thế hiệu quả nhất hiện nay cho bệnh nhân (BN) suy thận mạn giai đoạn cuối. Phẫu thuật ghép thận được thực hiện thành công lần đầu tiên ở Việt Nam vào năm 1992 tại Bệnh viện Quân y 103. Cho đến nay, nhiều cơ sở y tế trong nước đã triển khai thành công kỹ thuật này. Phẫu thuật ghép thận đã giúp những BN suy thận mạn giai đoạn cuối cải thiện rõ rệt về chất lượng cuộc sống cũng như hiệu quả kinh tế. Việc theo dõi điều trị BN sau ghép thận đóng vai trò rất quan trọng trong duy trì chức năng thận ghép, giảm thiểu tối đa nguy cơ mất mô ghép hay suy chức năng thận ghép. Tuy nhiên, hoạt động của virus BK (BKV) được cho là có vai trò quan trọng

dẫn đến suy chức năng thận ghép, thậm chí mất mô ghép ở BN sau ghép thận [3]. Điều này được lý giải: do BN ghép thận phải sử dụng các thuốc ức chế miễn dịch, BKV dạng tiềm ẩn trong tế bào biểu mô niệu đạo và biểu mô thận có khả năng tái hoạt động và gây bệnh. Ở những BN này, nếu không được phát hiện và điều trị kịp thời sẽ có nguy cơ dẫn đến bệnh thận do BKV (BK virus-associated nephropathy - BKVN) và thải ghép. Tỷ lệ BKVN ước tính 1 - 10%, hầu hết các trường hợp xảy ra trong những năm đầu sau ghép thận và > 50% trường hợp thận ghép bị tác động bởi BKV [4, 5]. Vì vậy, cần có một công cụ giám sát BKV hiệu quả góp phần chẩn đoán sớm và theo dõi điều trị BN sau ghép thận, ngăn ngừa thải ghép.

Hiện nay, vấn đề theo dõi và giám sát BKV ở BN ghép thận ở nước ta chưa được quan tâm đúng mức. Việc chẩn đoán ban đầu BKVN thường gặp nhiều khó khăn do các triệu chứng lâm sàng không đặc hiệu, có thể nhầm với giai đoạn thải ghép cấp khi sử dụng thuốc ức chế miễn dịch, dễ dẫn đến bỏ sót trong chẩn đoán. Sinh thiết thận ghép để chẩn đoán mô bệnh học được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán BKVN, tuy nhiên, đây là kỹ thuật xâm lấn dễ gây tổn thương thận ở BN, đòi hỏi chuyên gia giải phẫu bệnh có kinh nghiệm. Trong khi đó, việc xác định, giám sát tải lượng BKV bằng kỹ thuật real-time PCR trong huyết tương, nước tiểu BN ghép thận đã được công nhận là công cụ rất có giá trị trong giám sát BKV cũng như tiên lượng BKVN [3]. Chính vì vậy, để chủ động trong theo dõi, giám sát BKV trên BN ghép thận ở Việt Nam, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Tối ưu hóa quy trình real-time PCR định lượng nồng độ BKV ADN có độ nhạy cao trong định hướng điều trị ở BN ghép thận.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Mẫu bệnh phẩm.

Lựa chọn 18 mẫu máu ngoại vi và 12 mẫu nước tiểu của 30 BN sau ghép thận nhiễm BKV (mỗi BN được lựa chọn một loại mẫu bệnh phẩm, hoặc mẫu máu hoặc mẫu nước tiểu), trong đó 5 BN BKVN được khẳng định bằng chẩn đoán mô bệnh học, 25 trường hợp còn lại được

khẳng định bằng semi-nested PCR theo Arthur và CS, trình tự [6] (nhóm bệnh); 30 mẫu máu ngoại vi của người hiến máu tình nguyện, semi nested PCR (-) (nhóm chứng) sử dụng để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, sự phù hợp của kỹ thuật real-time PCR định lượng BKV có độ nhạy cao - trên cơ sở tối ưu kỹ thuật real-time PCR đã được nhóm nghiên cứu phát triển trước đó [5]. Các mẫu bệnh phẩm được cung cấp nhờ hợp tác nghiên cứu giữa Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y và Khoa Thận - Lọc máu, Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Việt Đức.

2. Tối ưu quy trình real-time PCR định lượng BKV-ADN có độ nhạy cao.

Kỹ thuật real-time PCR phát triển trước đó [2] được nghiên cứu tối ưu một số thông số liên quan đến quá trình tách chiết ADN tổng số cũng như phản ứng real-time PCR. Cụ thể, lượng mẫu bệnh phẩm đưa vào sử dụng thể tích là 0,5 ml, thể tích mẫu ADN thu hồi 54 μ l, đảm bảo cô đặc mẫu tối đa, thể tích ADN khuôn sử dụng trong phản ứng khảo sát từ 3 - 5 - 9 μ l.

3. Đánh giá kỹ thuật real-time PCR định lượng BKV-ADN trên bộ mẫu chuẩn.

Đánh giá kỹ thuật real-time PCR trên bộ panel mẫu ADN - được thiết lập từ mẫu plasmid tái tổ hợp chứa gen VP1 của BKV [2]. Để phân tích độ chính xác, ba mẫu chuẩn 10^2 - 10^4 (copy/ μ l) được chạy lặp lại 3 lần trong cùng một thí

nghiệm. Sau đó, chạy lặp lại giữa các lần thí nghiệm, tính trị số trung bình và độ lệch chuẩn. Đánh giá độ chính xác qua hệ số biến thiên nội phản ứng và liên phản ứng [7]. Tương tự, khảo sát hàng tháng độ ổn định của kit theo thời gian bảo quản (điều kiện -20°C).

4. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật real-time PCR.

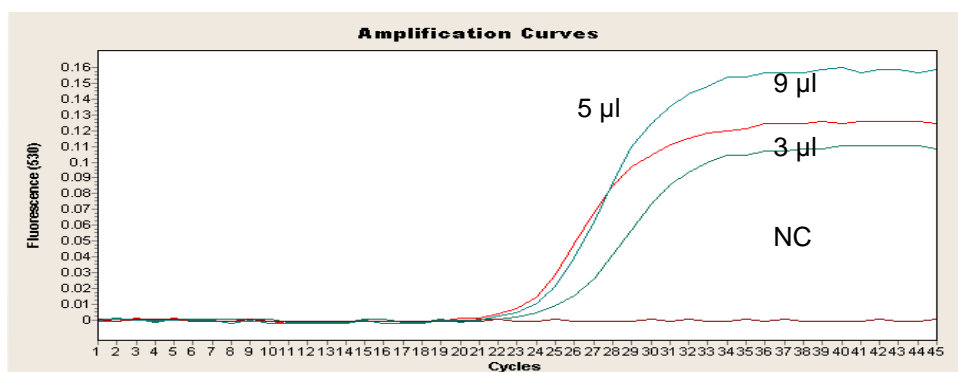
Khảo sát độ nhạy, độ đặc hiệu tương ứng trên 30 mẫu nhóm bệnh và 30 nhóm chứng ở trên, so sánh với kit thương mại RealStar BKV PCR 1.0 (Altona Diagnostics, Đức). Sự phù hợp (thống nhất) xác định BKV giữa hai bộ kit được tính theo hệ số Kappa (K) [7].

Tất cả các thử nghiệm tối ưu và định lượng đều tiến hành lặp lại 2 lần, lấy giá trị trung bình, mỗi lần chạy đều kèm theo chứng âm và chứng dương. Kỹ thuật real-time PCR định lượng BKV-ADN được tiến hành tối ưu đồng thời trên hai hệ thống máy real-time là LightCyler 2.0 (Roche, Đức) và Rotor-Gene Q (Qiagen, Đức).

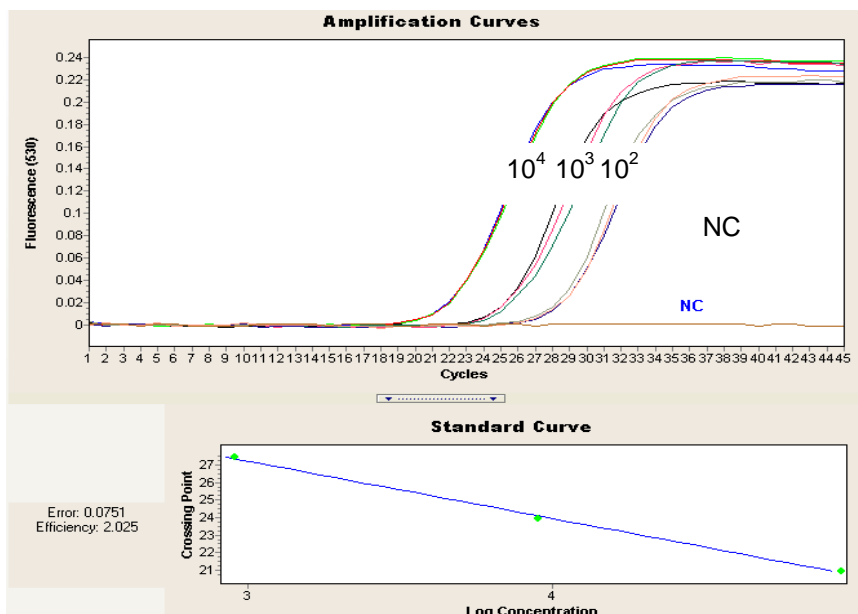
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tối ưu quy trình real-time PCR định lượng BKV-ADN có độ nhạy cao ở BN ghép thận.

Quy trình real-time PCR định lượng có độ nhạy cao, ngoài phụ thuộc vào chiến lược thiết kế môi, probe đặc hiệu của kỹ thuật mà quá trình tối ưu tách chiết ADN, thành phần phản ứng real-time PCR cũng góp phần rất quan trọng. Cụ thể, trong nghiên cứu này, mẫu ADN được tách chiết từ huyết tương và nước tiểu, ngoài BKV-ADN có thể còn chứa ADN người và các chất ức chế phản ứng PCR. Do đó, để tăng độ nhạy cho phản ứng real-time PCR, thử nghiệm thể tích BKV-ADN ở các mức 3, 5 và 9 μl . Kết quả với thể tích đầu vào của mẫu là 9 μl cho chu kỳ ngưỡng sớm hơn so với các mức 3 μl và 5 μl (hình 1). Như vậy, kỹ thuật real-time PCR được tối ưu với thể tích BKV-ADN trong 1 lần chạy lớn (9 μl) giúp tăng ngưỡng phát hiện và giảm sai số trong quá trình thực hiện. Quá trình tối ưu kỹ thuật real-time PCR thực hiện trên cả hai hệ thống (LightCyler 2.0 và Rotor-Gene Q) đều cho kết quả tương đương (dữ liệu không trình bày).



Hình 1: Tối ưu thể tích mẫu trong kỹ thuật real-time PCR.
(NC: Đối chứng âm là nước khử ion)



Hình 2: Xác định hệ số biến thiên nội phản ứng ở 3 mức nồng độ $10^2 - 10^4$ copies/ μ l bằng kỹ thuật real-time PCR tối ưu.
(NC: Đối chứng âm là nước khử ion)

Bảng 1: Xác định hệ số biến thiên và độ ổn định ở 3 mức nồng độ $10^2 - 10^4$ copies/ μ l bằng kỹ thuật real-time PCR tối ưu.

* Nội phản ứng:

Nồng độ	10^4			10^3			10^2		
Ct	20,93	21,11	21,02	23,92	24,44	24,86	27,46	26,94	27,43
Ct Mean	21,02			24,40			27,27		
SD	0,09			0,47			0,29		
CV	0,42			1,92			1,07		

* Liên phản ứng:

Nồng độ	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6	Lần 7	Ct Mean	SD	CV (%)
10^4	20,99	21,48	21,54	22,07	21,07	20,71	22,84	21,52	0,72	3,38
10^3	24,45	24,71	24,87	24,77	24,22	23,99	24,57	24,51	0,31	1,28
10^2	27,84	28,19	28,14	27,88	27,88	27,15	28,46	27,93	0,41	1,47

* Độ ổn định:

Nồng độ	T*0	T1	T2	T3	T4	Ct Mean	SD	CV (%)
10 ⁴	20,99	21,48	21,54	22,07	21,07	21,43	0,43	2,02
10 ³	24,45	24,71	24,87	24,77	24,22	24,60	0,26	1,08
10 ²	27,84	28,19	28,14	27,88	27,88	27,99	0,17	0,59

(T*: Tháng; Ct: Chu kỳ ngưỡng; Mean: Trung bình; SD: Độ lệch chuẩn; CV: Hệ số biến thiên)

Sau khi tối ưu được kỹ thuật real-time PCR định lượng nồng độ BKV-ADN (đặt tên là kit nghiên cứu), chúng tôi tiến hành đánh giá trên bộ mẫu chuẩn BKV-ADN thiết lập có dải nồng độ 10⁰ - 10⁸ (copy/μl). Đánh giá độ chính xác trên 3 mẫu chuẩn có nồng độ 10² - 10⁴ (copy/μl) thể hiện qua giá trị hệ số biến thiên CV (coefficient of variation) (hình 2, bảng 1A, B).

Xác định hệ số biến thiên nội phản ứng với khảo sát lặp lại 3 lần với 3 mức nồng độ 10⁴, 10³, 10² lần lượt là 0,42%; 1,92% và 1,07%. Đồng thời xác định hệ

số biến thiên liên phản ứng với khảo sát 7 lần lặp lại của 3 mức nồng độ 10⁴, 10³, 10² lần lượt là 3,38%; 1,28% và 1,47% (bảng 1A, B). Các giá trị của hệ số biến thiên thấp đã minh chứng bộ mẫu chuẩn được thiết lập có độ chính xác cao.

Kết quả đánh giá độ ổn định của kit hàng tháng thể hiện qua các mẫu chuẩn có hệ số biến thiên thấp lần lượt là 2,02%; 1,08%; 0,59%, cho thấy mẫu chuẩn cũng như kit có độ ổn định cao. Như vậy, độ ổn định của kit đến thời điểm nghiên cứu là 4 tháng khi bảo quản ở điều kiện -20°C.

2. Đánh giá kỹ thuật real-time PCR định lượng nồng độ BKV-ADN có độ nhạy cao trên mẫu lâm sàng.

Bảng 2: Khảo sát độ nhạy, độ đặc hiệu của hai bộ kit trên 30 mẫu nhóm bệnh và 30 mẫu nhóm chứng BKV(-).

A. Kit nghiên cứu và kit Altona.

		Kit Altona		Tổng
		Dương tính	Âm tính	
Kit nghiên cứu	Dương tính	22	8	30
	Âm tính	0	30	30
Tổng		22	38	60

B. Kít nghiên cứu và tham chiếu.

		Kết quả tham chiếu		
		Dương tính	Âm tính	Tổng
Kít nghiên cứu	Dương tính	30	0	30
	Âm tính	0	30	30
Tổng		30	30	60

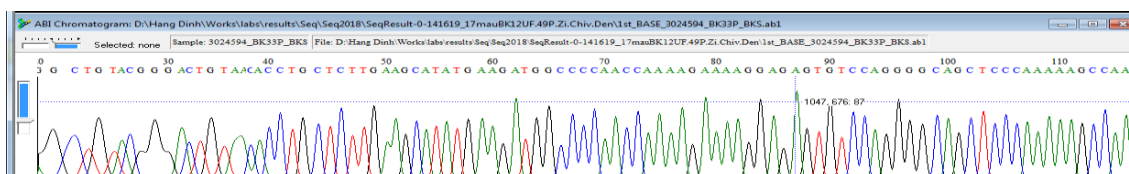
Bước đầu, chúng tôi đánh giá đồng thời kỹ thuật real-time PCR tối ưu và bộ kít Realstar BKV PCR 1.0 (Hãng Altona Diagnostics) trên 30 mẫu nhóm bệnh BKV(+) và 30 mẫu nhóm chứng BKV(-). Kết quả cho thấy, kít nghiên cứu đã xác định được 30/30 mẫu (độ nhạy 100%), trong khi đó kít Altona chỉ định lượng được 22/30 mẫu. Độ đặc hiệu kít nghiên cứu đạt 100% (bảng 2).

Bảng 3: Kết quả định lượng 8/30 mẫu nhóm bệnh bằng kít nghiên cứu mà kít Altona không định lượng được và biểu đồ phân tích trình tự BKV minh họa.

STT	Mã nghiên cứu	Nồng độ BKV-ADN (copy/ml)			
		Kít nghiên cứu		Kít Altona	
		Huyết tương	Nước tiểu	Huyết tương	Nước tiểu
1	PBK5P	$4,53 \times 10^2$		0	
2	PBK33P	$1,64 \times 10^2$		0	
3	PBK34U		$4,11 \times 10^4$		0
4	PBK35P	$8,13 \times 10^2$		0	
5	PBK06PF	$5,31 \times 10^2$		0	
6	PBK08PF	$5,43 \times 10^2$		0	
7	PBK08UF		$1,31 \times 10^3$		0
8	PBK43P	$5,43 \times 10^2$		0	

Như vậy, kít nghiên cứu có thể phù hợp hơn trong chẩn đoán trên các chủng BKV ở Việt Nam (minh chứng bằng 8 mẫu BKV định lượng bằng kít nghiên cứu nhưng kít Altona bị bỏ sót, các mẫu này đã khẳng định bằng giải trình tự). Tuy nhiên, hệ số K 0,73 cho thấy việc xác định BKV trên kít nghiên cứu và kít Altona có phù hợp tốt.

Mẫu PBK33P



BÀN LUẬN

Hiện nay, chiến lược hiệu quả nhất trong chẩn đoán và điều trị sớm BKV là theo dõi nồng độ BKV trong huyết tương, nước tiểu định kỳ, trong đó kỹ thuật real-time PCR định lượng nồng độ BKV-ADN có độ chính xác, độ nhạy cao, là công cụ đặc biệt có giá trị [8]. Ở Việt Nam, thực tế số ca BKVN ở BN sau ghép thận có thể nhiều hơn, tuy nhiên chưa được khảo sát toàn diện. Nếu không có một công cụ giám sát và sàng lọc BKV phù hợp, hiệu quả, BN BKV có thể bị bỏ sót chẩn đoán ở giai đoạn sớm, phải đến khi xuất hiện các triệu chứng lâm sàng rối loạn chức năng thận ghép, creatinin máu tăng đáng kể, BKV đã phát triển sang đến phần vỏ thận, BN mới được sinh thiết. Khi đã xuất hiện các tổn thương thận ghép, khả năng phục hồi chức năng thận vô cùng khó khăn [1]. Như vậy, việc chẩn đoán sớm BKV là yếu tố quyết định thành công trong bảo tồn chức năng thận ghép.

Trong công trình này, kỹ thuật real-time PCR sau tối ưu thành công đánh giá trên bộ mẫu chuẩn định lượng thiết lập theo Hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và Viện Quốc gia về Kiểm chuẩn Sinh học Anh (NIBSC, UK) - điều kiện tiên quyết cho bất kỳ bộ kit chẩn đoán nào trước khi đưa vào thử nghiệm thực địa [9]. Khi đánh giá 30 mẫu lâm sàng nhiễm BKV đồng thời trên 2 bộ kit, kit nghiên cứu đã xác định được 8/30 mẫu BKV còn lại mà kit thương mại bỏ sót, điều này có thể lý giải là do lựa chọn vùng bảo thủ để thiết kế mồi/probe của hai bộ kit khác nhau cũng như tính đa hình trình tự BKV-ADN của các mẫu thử nghiệm [10]. Kit nghiên cứu bước đầu cho thấy phù hợp

hơn trong xác định các chủng BKV ở Việt Nam. Như vậy, bộ kit nghiên cứu được phát triển có độ nhạy, độ đặc hiệu 100% trên 30 mẫu nhóm bệnh và 30 mẫu nhóm chứng.

Hiện nay, mẫu huyết tương hoặc nước tiểu hoặc cả hai đều được sử dụng để xác định tải lượng BKV. Hầu hết các nghiên cứu đều chỉ ra, BKV trong máu chỉ xảy ra khi BKV dương tính trong nước tiểu và BKV trong máu là điều kiện tiên quyết dẫn đến BKVN. Khoảng cách trung bình từ khi xuất hiện BKV trong nước tiểu tới khi xuất hiện BKV trong máu từ 1 - 3 tháng. Những BN này được khuyến cáo xét nghiệm hàng tháng nồng độ BKV trong máu hoặc nước tiểu hoặc cả hai (kết hợp với triệu chứng lâm sàng của BN) để theo dõi trong điều trị. Theo khuyến cáo, nồng độ BKV trong huyết tương, nước tiểu lần lượt $> 10^4$ copies/ml, 10^7 copies/ml là giá trị gợi ý nguy cơ cao của BKV [12]. Như vậy, kỹ thuật real-time PCR này là xét nghiệm ít xâm lấn, có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, đặc biệt phù hợp trong chẩn đoán các chủng BKV ở Việt Nam, góp phần theo dõi điều trị, giúp giảm chi phí cho BN.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tối ưu hóa và bước đầu đánh giá thành công quy trình real-time PCR định lượng nồng độ BKV-ADN có độ nhạy cao trong huyết tương, nước tiểu ở BN ghép thận. Quy trình này cần được đánh giá về hiệu quả lâm sàng để có thể là công cụ hữu ích trong sàng lọc và theo dõi nồng độ BKV-ADN, góp phần định hướng điều trị ở BN ghép thận.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. An H.P.H et al. Ca lâm sàng nhiễm virus BK ở BN sau ghép thận. Tạp chí Nghiên cứu Y học. 2015, 93 (1), pp.142-148.
2. Hoàng Xuân Sửu, Trịnh Thị Mỹ Anh, Nguyễn Sỹ Lánh, Phạm Quốc Toàn, Nguyễn Giang Hòa, Đinh Thị Thu Hằng. Nghiên cứu định lượng nồng độ ADN BK polyomavirus bằng kỹ thuật Taqman probe real-time PCR. Tạp chí Y Dược học Quân sự. 2018, 43 (5), tr.29-36.
3. Johnston O et al. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: A systematic review. Transplantation. 2010, 89 (9), pp.1057-1070.
4. Balba G.P, B. Javaid, J.G Timpone, Jr. BK polyomavirus infection in the renal transplant recipient. Infect Dis Clin North Am. 2013, 27 (2), pp.271-283.
5. Kuypers D.R. Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. Nat Rev Nephrol. 2012, 8 (7), pp.390-402.
6. Arthur R.R, S Dagostin, K.V Shah. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989, 27 (6), pp.1174-1179.
7. Burd E.M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clinical microbiology reviews. 2010, 23 (3), pp.550-576.
8. Hayden R.T et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: A multivariate analysis. J Clin Microbiol. 2012, 50 (2), pp.337-345.
9. NIBSC. Genetic reference materials in the diagnostics. National Institute for Biological Standards and Control. Biological Reference Materials. 2014.
10. Hoffman N.G et al. Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. J Clin Microbiol. 2008, 46 (8), pp.2671-2680.
11. Egli A et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. J Infect Dis. 2009, 19 (6), pp.837-846.
12. Bechert C.J et al. Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. American Journal of Clinical Pathology. 2010, 133 (2), pp.242-250.

THỰC TRẠNG CHẤP HÀNH QUY TRÌNH KHỬ KHUẨN,