

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REALTIME-PCR HRM PHÁT HIỆN TÁC NHÂN GÂY BỆNH TAY CHÂN MIỆNG

VŨ XUÂN NGHĨA, NGUYỄN THANH VIỆT, PHẠM ĐỨC MINH,  
LƯƠNG CAO ĐỒNG, NGUYỄN THỊ BẠCH YẾN

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Tay Chân Miệng (TCM) là một bệnh nhiễm trùng thường gặp ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, có tính chất lây truyền và có thể gây thành dịch. Bệnh có thể gây biến chứng nguy hiểm như viêm não-màng não, viêm cơ tim, phù phổi cấp và dẫn tới tử vong nếu không được phát hiện sớm và xử lý kịp thời. Tại Việt Nam, Theo báo cáo của Bộ Y tế, tính đến ngày 17/10/2011, cả nước đã ghi nhận 72.472 trường hợp mắc bệnh tay chân miệng tại 63 tỉnh thành, trong đó đã có 130 trường hợp tử vong tại 22 tỉnh, thành phố.

Bệnh TCM do virus đường ruột gây ra. Hai nhóm tác nhân gây bệnh thường gặp là *Coxsackie virus A16(CA16)* và *Enterovirus E71 (EV71)*, gây bệnh chủ yếu lây nhiễm qua đường tiêu hóa, trực tiếp phân-miệng, hoặc gián tiếp qua nước, thực phẩm, tay bẩn... bị ô nhiễm phân người bệnh. Hiện nay, nhiều phương pháp được ứng dụng phát hiện mầm bệnh gây bệnh TCM, trong đó realtime-PCR với ưu điểm vượt trội cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Trong nghiên cứu này, dựa trên nền nguyên tắc hoạt động của phương pháp PCR, công nghệ mới sử dụng SYBR Green, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật realtime-PCR HRM (high resolution melting) phát hiện sớm mầm bệnh virus E71 gây bệnh TCM.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng

5 bệnh nhi có độ tuổi từ 8 tháng đến 10 tuổi, vào viện ngày thứ 4 của bệnh với các biểu hiện: sốt, nổi ban ở bàn tay, mông, đầu gối, chân, loét miệng họng, ho và nôn.

**2. Bệnh phẩm:** Bệnh nhi được lấy nhầy họng và phân.

### 3. Chứng dương

Chứng dương EV71 được cung cấp bởi trung tâm nghiên cứu ứng dụng y sinh dược học, Học viện Quân y.

### 4. Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

**4.1. Tách chiết RNA của virus:** RNA của EV71 được tách chiết từ nhầy họng hoặc phân của bệnh nhi bằng Qiagen ARN mini kit theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất (Qiagen, Đức) và cất giữ ở  $-80^{\circ}\text{C}$  đến khi sử dụng.

**4.2. Thiết kế môi:** cặp môi được thiết kế dựa trên khuếch đại vùng gen VP1 của virus được công bố trước đây. Trình tự của EV71-F 5'-GARAGYTCTA TAGGRGAYAG-3', EV71-R 5'-AGAGGGAGRTCTATCTCYCC-3'.

**4.3. Công nghệ SYBRGreen thế hệ mới:** Các hạt SybrGreen bám vào liên kết giữa 2 sợi đơn DNA. Khi sợi DNA duỗi xoắn và bị phân tách ở điểm nóng chảy sẽ giải phóng ra các hạt SybrGreen. Dựa vào tín hiệu

này, các sản phẩm PCR được phát hiện và được biểu diễn dưới dạng đồ thị sau mỗi chu kỳ.

### 4.4. Quy trình Realtime-PCR HRM

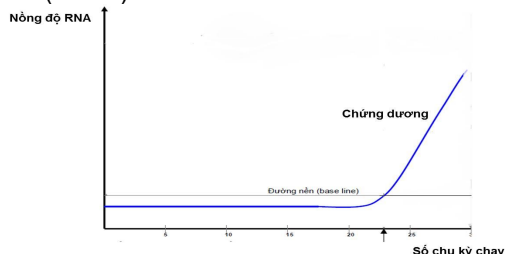
Bộ kit KAPA™ FAST SYBR One-Step qRT-PCR được sử dụng trong quy trình Realtime-PCR HRM. Thành phần phản ứng: KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) 10 $\mu\text{l}$ ; KAPA RT Mix (50X) 0,4 $\mu\text{l}$ ; Forward Primer (10  $\mu\text{M}$ ) 0,4 $\mu\text{l}$ ; Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ ) 0,4 $\mu\text{l}$ ; RNA 5 $\mu\text{l}$  và nước 3,8 $\mu\text{l}$ . Chu trình nhiệt: 50 $^{\circ}\text{C}/15'$ ; 95 $^{\circ}\text{C}/20''$ ; chu kỳ 40 vòng: 95 $^{\circ}\text{C}/5''$ ; 60 $^{\circ}\text{C}/15''$ . Quy trình được thwdj hiện trên máy Eco realtime-PCR (*Illumina-Hoa kỳ*)

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 1. Kết quả

#### 1.1. Tối ưu hóa quy trình realtime-PCR

Quy trình được tối ưu hóa trên chứng dương EV71 với tỉ lệ các thành phần tham gia phản ứng, nhiệt độ bám mỗi, nồng độ RNA toàn phần. Kết quả được hình chuẩn được sử dụng phát hiện EV71 trong mẫu bệnh phẩm (Hình 1)



Hình 1: Kết quả chuẩn hóa quy trình Realtime-PCR HRM chứng dương EV71

#### 1.2. Phát hiện EV71 trong mẫu bệnh phẩm

##### 2.1.1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

Bệnh nhi nhập viện 103 - Học viện Quân y được chẩn đoán sơ bộ ban đầu mắc bệnh TCM với biểu hiện sốt, phát ban, loét, ho và nôn.

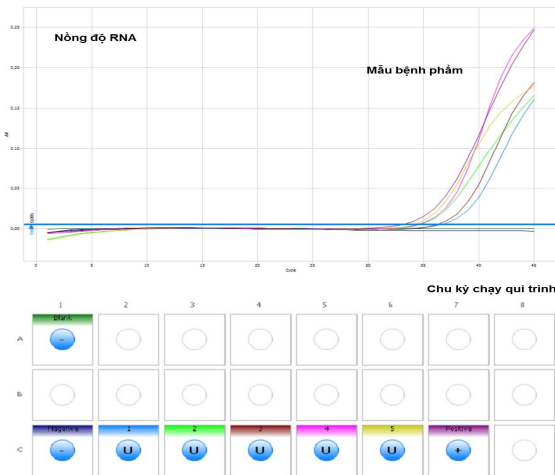
Bảng 1: Biểu hiện triệu chứng lâm sàng

TC lâm sàng	Số lượng	Tỉ lệ (%)
Sốt	5/5	100
Nổi ban ở da	4/5	80
Loét miệng họng	4/5	80
Ho	3/5	60
Nôn	4/5	80

Kết quả cho thấy, bệnh nhân biểu hiện sốt 5/5 (100%), loét miệng họng 4/5 (80%) và phát ban 4/5 (80%).

3.2.1.2. ứng dụng realtime-PCR HRM phát hiện EV71

Sau khi chuẩn hóa, quy trình được ứng dụng phát hiện EV71 trên 5 bệnh nhi. Kết quả cho thấy 5/5 (100%) nhiễm EV71 (Hình 2)



Hình 2: Đường biểu diễn các mẫu bệnh phẩm và chứng dương

## 2. Bàn luận

Tình hình dịch bệnh TCM hiện nay vẫn đang diễn biến phức tạp trên cả 3 miền, số trẻ mắc và tử vong vẫn liên tục tăng. Trên thế giới và trong nước đã sử dụng nhiều kỹ thuật phân tử để phát hiện các mầm bệnh sinh học. Trong đó, có những kỹ thuật phát hiện những sản phẩm trực tiếp hoặc gián tiếp của mầm bệnh.

Máy Realtime PCR HRM được trang bị hệ thống đèn quang học hiện đại với 48 đèn LED (Light Emitting Diode) và Block ra nhiệt nhanh bởi vậy cho kết quả nhanh chóng, chính xác với độ đặc hiệu cao. Tính ưu việt và vượt trội so với kỹ thuật Realtime-PCR đang được ứng dụng hiện nay. Kỹ thuật Realtime-PCR thường có độ nhạy cho phép phát hiện mầm bệnh từ 20-30 copies, nhưng với máy Realtime-PCR HRM bằng sự đột phá trong công nghệ cho độ nhạy cao gấp nhiều lần, cho phép phát hiện mầm bệnh chính xác 1 copies.

Trong nghiên cứu, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật Realtime PCR HRM và công nghệ Fast SYBR Green phát hiện EV71 trong các mẫu bệnh phẩm lấy từ phân và nhầy họng của bệnh nhi được chẩn đoán sơ bộ bệnh TCM. Qui trình được tối ưu hóa cho kết quả nhanh, chính xác và đặc hiệu với EV71. Ưu điểm của phương pháp nổi bật với khả năng thao tác đơn giản, phần mềm phân tích thông minh, nhanh và chính xác.

Bước đầu ứng dụng công nghệ mới phát hiện mầm bệnh gây bệnh TCM trên 5 bệnh nhi. Kết quả cho thấy, cả 5 bệnh nhi (100%) nhiễm EV71. Tỷ lệ nhiễm EV71 cũng phù hợp với những công bố của các nghiên cứu khác trong năm 2011, nguyên nhân chủ yếu trong những vụ dịch 2011 là EV71.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tối ưu hóa kỹ thuật Realtime PCR HRM với công nghệ Fast SYBR Green phát hiện EV71, nguyên nhân gây bệnh chân tay miệng. Bước đầu phát hiện EV71 trong 5 trường hợp (100%) nhiễm bệnh TCM.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Peter Charles (2003), "Enterovirus 71 in the Asia-Pacific region: An emerging cause of acute neurological disease in young children", *Neurol J Southeast Asia*. 8, tr. 57-63.
2. C-Y Chong và các cộng sự (2000), "Hand, foot and mouth disease in Singapore: a comparison of fatal and non-fatal cases".
3. Yang Z, Habib M, Shuai J, Fang W (2007), "Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR". *J Zhejiang Univ Sci B* 7, 8:162-169.
4. Tian H, Wu J, Shang Y, Cheng Y, Liu X (2010), "The development of a rapid SYBR one step real-time RT-PCR for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol J*, 7:90.
5. Guo Y, Cheng A, Wang M, Shen C, Jia R, Chen S, Zhang N (2009), "Development of TaqMan# MGB fluorescent real-time PCR assay for the detection of anatis herpesvirus 1. *Virol J*, 6:71.