

# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT RT-PCR PHÁT HIỆN VIRUT CHIKUNGUNYA Ở BỆNH NHÂN SỐT XUẤT HUYẾT

Nguyễn Trọng Viễn\*; Vũ Xuân Nghĩa\*; Nguyễn Linh Toàn \*;  
Trần Viết Tiến\*\*; Lương Cao Đồng\*\*

## TÓM TẮT

Gần đây, virus Chikungunya (CHIKV) là một nguyên nhân gây ra dịch sốt xuất huyết (SXH) ở các nước Đông Nam á và châu Phi. Mặc dù, xét nghiệm huyết thanh học có thể phát hiện nhưng việc phát hiện CHIKV-ARN trong mẫu bệnh phẩm vẫn cần được phát triển, cải thiện. Nghiên cứu này, mô tả kỹ thuật RT-PCR khuếch đại gen E1 của virus dùng chẩn đoán CHIKV-ARN. Bằng kỹ thuật này phát hiện 4/50 (8%) bệnh nhân (BN) SXH dương tính với CHIKV-ARN. Phân tích trình tự gen 4 mẫu này xác định độ tương đồng các nucleotide trên 93% so với các chủng CHIKV đã công bố.

\* Từ khóa: Sốt xuất huyết; Chikungunya.

## APPLYING THE RT-PCR ASSAY TO IDENTIFY CHIKUNGUNYA VIRUS IN HEMORRHAGIC FEVER PATIENTS

### SUMMARY

*Chikungunya virus (CHIKV) has recently caused hemorrhagic fever in Southeast Asian and African countries. Although serological test may be used, however, to examine CHIKV-RNA in sample still need to improvement. In this study, we have described a revert transcript (RT)-PCR assay targeting E1 gene of virus for diagnosis of CHIKV-RNA. In 4/50 (8%) blood samples of hemorrhagic fever patients were positive sample for CHIKV-RNA by RT-PCR assay. Sequencing analyzed for 4 sample patients demonstrated more than 93% homological nucleotides.*

\* Key words: Hemorrhagic fever; Chikungunya.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Chikungunya (CHIKV) thuộc nhóm *Alphavirus*, họ *Togaviridae*. CHIKV gây các triệu chứng lâm sàng điển hình như đau khớp, sốt và xuất huyết. Những triệu chứng lâm sàng này cũng thường thấy trên bệnh nhân nhiễm virus Onyong-nyong, Virus Ross River, Virus Barmah Forest và đặc biệt ở các nước Đông Nam châu Á và châu Phi thường giống với dengue xuất huyết. CHIKV là virus

có cấu trúc ARN đơn, kích thước khoảng 12 kb, capsid và protein màng. CHIKV lần đầu tiên được phát hiện ở Tanzania (Châu Phi). Sau đó, virus phát triển gây dịch ở nhiều nước và các khu vực trên thế giới. Gần đây, CHIKV gây ra các vụ dịch lớn ở Ấn Độ, Singapore, Thái lan, Indonesia và đặc biệt ở Italia, một nước thuộc Châu Âu có khí hậu ôn hòa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật revert transcript (RT)-PCR để phát hiện CHIKV trên BN SXH.

\* Học viện Quân y

\*\* Bệnh viện 103

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

NGHIÊN CỨU

## 1. Đối tượng nghiên cứu.

Nghiên cứu sử dụng huyết thanh của 50 BN chẩn đoán SXH ở giai đoạn sớm trong vụ dịch SXH năm 2009 nhập viện tại Bệnh viện 103 và Trạm xá xã Tả Thanh Oai, Thanh Trì Hà Nội. Bệnh nhân nhập viện và Trung tâm y tế với biểu hiện sốt đột ngột 38 - 39 °C (hết sốt ở ngày thứ 6 - 7), niêm mạc mắt đỏ, kết mạc xung huyết, nốt xuất huyết tự nhiên dưới da, nhiều ở cẳng tay và đùi, nhiều bệnh nhân có đau cơ, khớp. Gan to 2 - 3 cm dưới bờ sườn, mật độ mềm.

## 2. Phương pháp nghiên cứu.

### \* Plasmid tái tổ hợp:

Plasmid mang toàn bộ đoạn gen mã hoá cho protein màng E1 của CHIKV được tách dòng (cloning) vào vector pGOV4, sử dụng làm chứng dương cho phản ứng RT – PCR phát hiện CHIKV huyết thanh. Đây là plasmid nhận từ Malaysia theo chương trình hợp tác nghiên cứu. Chúng âm cho phản ứng RT-PCR, sử dụng cùng thể tích nước khử ion. Chứng dương của DENV là vector pGEMT chứa của DENV được thiết kế chế tạo tại Trung tâm Y Dinh Dưỡng Học Viện Quân y. Quá trình tạo chứng dương này sử dụng sản phẩm rt – PCR là một đoạn gen của DENV, sau đó tách dòng trong vector pGEMT.

\* *Thiết kế và lựa chọn môi:* cặp primer phát hiện CHIKV thiết kế bắt cặp đặc hiệu trên gen E1 của CHIKV là E1F: 5-

ACCGGCGTCTACCC-ATTTATGTG-3 và E1R: 5-AGGGCGGGTAGTCCATGTTG-3 (331bp) dựa trên CHIKV chủng S27 (AF490259). Cặp môi của DENV là D1 5'-TCAATATGCTGAAACGCGC-3 và D2 5'-TGCACCAACAGTCAATGT-3' (511bp) theo trình tự nucleotid của DENV typ II đã công bố.

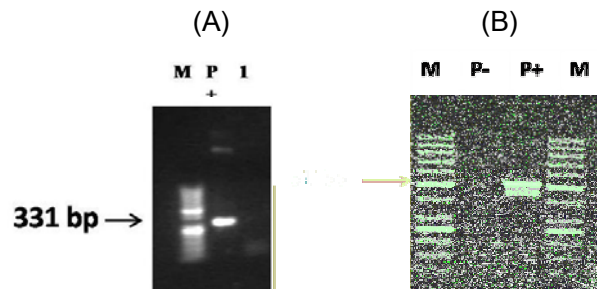
\* *Tách chiết ARN:* tách và tinh sạch ARN của virus được từ 150 micro huyết tương, dùng kit của hãng Qiagen (Qiagen ARN Blood mini kit) theo qui trình của nhà sản xuất (Qiagen, Đức). ARN thu được thường sử dụng ngay cho phản ứng RT-PCR hoặc cất giữ ở -80°C đến khi sử dụng.

\* *Quy trình phản ứng RT-PCR:* thực hiện phản ứng RT-PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất với một số thay đổi để tối ưu hóa điều kiện phản ứng. Thành phần tham gia phản ứng RT-PCR bao gồm: 5x Qiagen Onestep RT-PCR buffer x 5l, dNTP 10 mM/l x 0, 4l, cặp môi phát hiện CHIKV và DENV 10 pmol/l x 1l (mỗi primer), enzyme taq-polymerase x 2,5U, ARN của virus và nước khử ion ARNfree vừa đủ 50 microl. Chu trình nhiệt thực hiện ở 45°C trong 45 phút cho chuyển đổi từ ARN sang cADN. Tiếp đến là 95°C trong 2 phút và 40 vòng của các giai đoạn: duỗi xoắn ở 94°C trong 30 giây, bám môi 55°C trong 1 phút, kéo dài 72 C trong 1 phút. Cuối cùng là giai đoạn kéo dài 72°C trong 10 phút. Sau khi nhân lên, sản phẩm PCR chạy trên agarose Gel 1,2% /100v và chụp trên hệ thống máy đọc gel.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

## 1. Chuẩn hóa phản ứng RT-PCR.

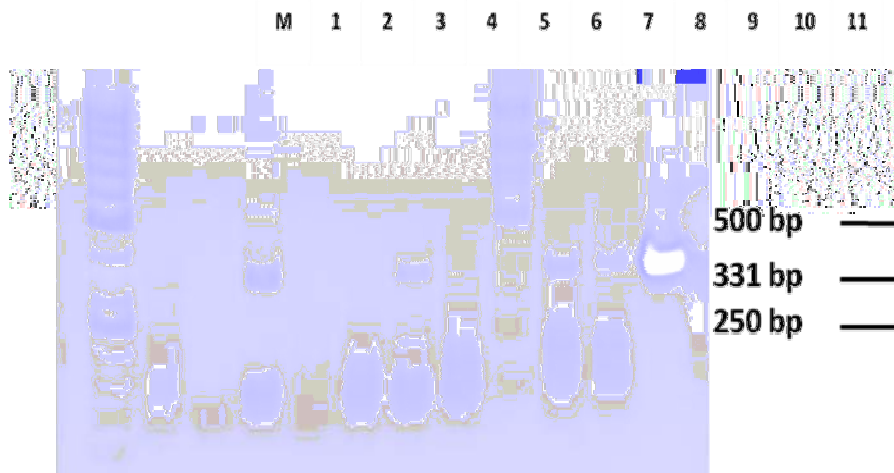
Để tối ưu hóa điều kiện phản ứng RT-PCR, chúng tôi thực hiện phản ứng trên plasmid tái tổ hợp mang gen E1 của CHIKV (chứng dương) sử dụng các cặp primer đặc hiệu tương ứng E1F-E1R cho CHIKV và D1-D2 cho DENV. Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR của CHIKV và DENV chạy trên agarose gel 1,2% với 100 vòng đạt 331 bp và 511 bp riêng biệt.



Hình 1: Tối ưu hóa phản ứng RT-PCR phát hiện CHIKV (A) M: Thang chuẩn ADN 50bp; P+: chứng dương. cột1: chứng âm; DENV (B) M: Thang chuẩn ADN 50bp; P+: chứng dương. P-: chứng âm

## 2. Phát hiện CHIKV-ARN trong máu BN bằng kỹ thuật RT-PCR.

Sau khi chuẩn hóa, sử dụng kỹ thuật RT-PCR phát hiện RNA của CHIKV và DENV trong máu BN. Kết quả: trong 50 mẫu BN có 4 mẫu dương tính là mẫu số 3, 6, 9 và 10, cho sản phẩm cADN kích thước là 331 bp, kích thước tương đương chứng dương của plasmid (Hình 2).



Hình 2: Kỹ thuật RT-PCR phát hiện sớm CHIKV-ARN trong máu BN.  
M: thang chuẩn ADN 50bp; Cột từ 1-10: Mẫu của BN; cột 11: chứng dương.

4 mẫu dương tính với CHIKV-ARN tiếp tục thực hiện phản ứng RT-PCR với cặp mồi D1-D2 đặc hiệu DENV để phát hiện DENV. Kết quả cho thấy trong 4 mẫu dương tính với CHIKV không có mẫu nào dương tính với DENV-ARN (Hình 3). Trong khi đó, ở nhóm chứng âm (n=10) không có mẫu nào dương tính với CHIKV và cả với DENV.



Hình 3: Kỹ thuật RT-PCR không phát hiện DENV trong các mẫu dương tính với CHIKV. Cột 1 - 4: âm tính với DENV; P+: chứng dương DEN; M: Thang chuẩn ADN 50bp.

Để xác định chính xác 4 mẫu dương tính với CHIKV, sản phẩm cADN của CHIKV được tinh sạch và tách dòng (cloning) vào vector pGEMT. Sau đó giải trình tự acid nucleic, so sánh với genbank và Blast. Kết quả tương đồng nucleotide với CHIKV có nguồn gốc từ châu Phi (chủng S27), là > 93% tương đồng. Điều này khẳng định 4 mẫu trên chính xác 100% là CHIKV liên quan đến SXH ở những BN này mà không phải do DENV.

### BÀN LUẬN

Sự thay đổi nhanh chóng của khí hậu trên toàn cầu dẫn tới cảnh báo về các vụ dịch do Arbovirut gây ra. Hiện nay, CHIKV và DENV là những Arbovirut quan trọng nhất gây SXH ở người. CHIKV và DENV lây nhiễm do cùng một loại vector, nên chúng lưu hành ở những khu vực giống nhau, có những biểu hiện triệu chứng lâm sàng khá giống nhau. Bởi vậy, có giả thiết cho rằng nhiều ca mắc CHIKV không được phát hiện trong những vụ SXH gần đây.

Hiện nay, trên thế giới và trong nước sử dụng nhiều kỹ thuật phân tử để phát hiện các mầm bệnh sinh học. Trong đó, có những kỹ thuật phát hiện sản phẩm trực tiếp hoặc gián tiếp mầm bệnh. ứng dụng kỹ thuật RT-PCR có thể xác định CHIKV và DENV trong mẫu bệnh phẩm bằng những cặp primer đặc hiệu của virus. Kỹ thuật RT-PCR cho phép thực hiện nhanh, thuận lợi và giảm thiểu tối đa khả năng lây nhiễm so với hai giai đoạn. Sử dụng RT-PCR phát hiện được 4/50 (8%) CHIKV-ARN trong máu BN đã chứng minh SXH hiện nay ở nước ta không đơn thuần chỉ do DENV mà còn cả CHIKV. Đây là điều khá thú vị, cần được đầu tư nghiên cứu sâu và rộng hơn. Đến nay, chưa có một công bố nào về việc phát hiện CHIKV-RNA ở BN người Việt Nam. Tuy nhiên, tài liệu trước đây cho thấy tồn tại kháng thể kháng CHIKV trên những lính Mỹ tham gia trong chiến tranh Việt Nam. Mặc dù phát hiện đầu

tiên ở Châu Phi, nhưng CHIKV nhanh chóng gây các vụ SXH lớn ở các khu vực châu Phi và châu Mỹ. Gần đây, chúng gây ra những vụ dịch lớn ở châu Á và đặc biệt là các nước Đông Nam Á như: Singapore, Thailand, Indonesia và Ấn Độ. Qua kết quả này cho thấy, bùng nổ dịch SXH ở Việt Nam, ngoài nguyên nhân do DENV, còn một virus khác có thể cũng đóng vai trò gây bệnh là Chikungunya. Chính vì vậy, cần có những nghiên cứu cơ bản và toàn diện về CHIKV ở nước ta.

## KẾT LUẬN

Kỹ thuật RT-PCR có thể sử dụng để phát hiện CHIKV-ARN trong máu bệnh nhân SXH. Bước đầu phát hiện 4/50 BN (8%) có CHIKV-ARN dương tính trong máu, cho thấy CHIKV lưu hành trong cộng đồng ở nước ta.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? J Hist Med Allied Sci. 1971, 26: pp.243-262.
2. De Paula SO, de Melo Lima C, Torres MP, Pereira MR, Lopes da Fonseca BA. One-step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to two-step RT-PCR approaches. J Clin Virol. 2004, 30, pp.297-301.
3. Eric M. Leroy, Dieudonné Nkoghe. Concurrent Chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. Emerging infectious diseases www.cdc.gov /eid. 2009, Vol 15, No 4, April.
4. Myers RM, Carey DE. Concurrent isolation from patient of two arboviruses, Chikungunya and dengue type 2. Science. 1967, 57, pp.1307-1308.
5. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguierry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. Lancet Infect Dis. 2007, 7, pp.319-327.
6. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. Lancet. 2007, 370, pp.1840-1846.
7. Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. Intern Med. 2010, 49 (5), pp.501-505. Mar.