

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ PHÁT HIỆN VIRUT DENGUE TRÊN MUỖI VÀ BỆNH NHÂN SỐT XUẤT HUYẾT

Vũ Xuân Nghĩa*; Nguyễn Khắc Lực*

TÓM TẮT

Nghiên cứu 1.023 muỗi *Ae. aegypti*, 885 muỗi *Ae. albopictus* từ 6 quận huyện Thành phố Hà Nội và 200 bệnh nhân (BN) sốt xuất huyết (SXH) điều trị tại Bệnh viện 103 và Bệnh viện Bạch Mai. Kết quả cho thấy: tỷ lệ lưu hành virut dengue (DENV) trên cả hai loại muỗi là 0%, trong đó, tỷ lệ phát hiện vật chất di truyền ARN của DENV trên BN SXH tại Bệnh viện 103 và Bệnh viện Bạch Mai lần lượt là 57% và 60%. Điều này cho thấy, DENV là nguyên nhân chủ yếu gây bệnh SXH trên địa bàn Thành phố Hà Nội.

* Từ khóa: Sốt xuất huyết; Virut dengue; Sinh học phân tử.

APPLYING PCR IN DETECTION OF DENGUE VIRUS ON MOSQUITOES AND HEMORRHAGIC FEVER PATIENTS

SUMMARY

Research was done on 1,023 *Ae. aegypti*, 885 *Ae. albopictus* from six districts of Hanoi and 200 hemorrhagic fever patients from 103 and Bachmai Hospitals. Results showed that the prevalence dengue virus on both mosquitos was 0%, while the rate of RNA material detection of dengue virus on hemorrhagic fever patients in Bachmai and 103 Hospitals were 57% and 60%, respectively. Detection rate showsed, dengue virus is a major cause of hemorrhage in the area of Hanoi.

* Key words: Hemorrhagic fever; Dengue virus; Molecular biology.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virut dengue có 4 týp huyết thanh gây bệnh: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4. DENV gây ra những vụ dịch SXH đầu tiên vào những năm 1778 - 1780 ở châu Á, châu Phi và Bắc Mỹ. Tại Hà Nội, số ca nghi mắc SXH năm 2012 tăng 2,2 lần so với cùng kỳ năm 2011. Nước ta có 2 loại muỗi *Aedes* gây bệnh chủ yếu là *Aedes aegypti* và *Aedes albopictus*. Muỗi *Aedes* hút máu ban ngày và thường hút máu nhiều nhất vào sáng sớm và chiều tối. Muỗi *Aedes aegypti* mình

nhỏ, đen, có khoang trắng, thường gọi là muỗi vằn, đậu ở nơi tối trong nhà, thường sống ở các đô thị. Muỗi *Aedes albopictus* thích sống ở lùm cây, ngọn cỏ, phần lớn sống ở vùng nông thôn. Sau khi hút máu người bệnh, muỗi cái có thể truyền bệnh ngay nếu hút máu người lành hoặc virut nhân lên ở tuyến nước bọt của muỗi sau 8 - 10 ngày hút máu người lành có thể truyền bệnh. Người ta thấy muỗi bị nhiễm DENV có thể truyền bệnh suốt vòng đời của muỗi khoảng 174 ngày (5 - 6 tháng). Để chẩn đoán phát hiện DENV,

* Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Lê Bách Quang

hiện nay có 3 phương pháp thực hiện thường quy ở labo: phân lập virus, phát hiện virus bằng kháng thể đặc hiệu và phát hiện virus ở mức độ gen bằng các kỹ thuật khuếch đại chuỗi axit nucleic. Phương pháp phân lập virus từ dòng tế bào muỗi C3/36 vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán, nhưng cần khoảng 7 ngày. Hơn nữa, việc phân lập DENV trên tế bào nuôi cấy từ máu không thành công do DENV rất khó nuôi cấy và nồng độ virus máu thấp. Phương pháp huyết thanh học, phát hiện DENV IgM và IgG bằng ELISA. Tuy nhiên, vẫn có phản ứng chéo giữa các thành viên của nhóm *Flavivirus* nên chưa đưa ra được độ đặc hiệu của phương pháp.

Cả hai phương pháp trên đều ít có ý nghĩa trong quản lý BN, khống chế dịch, bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Bởi vậy, cần có một phương pháp phát hiện nhanh DENV trong pha nhiễm virus cấp, nhằm giảm thời gian điều trị của BN, cung cấp dữ liệu cho điều tra dịch và khống chế phát triển lan tràn dịch. Phương pháp sinh học phân tử dựa trên phát hiện trình tự genome của virus là RT-PCR, nested PCR và Realtime PCR. Trong đó, phương pháp onestep RT-PCR phát hiện DENV biểu hiện tính vượt trội như: nhanh, tỷ lệ bội nhiễm thấp, độ nhạy, độ đặc hiệu cao và thực hiện đơn giản hơn. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi áp dụng phương pháp onestep RT-PCR phát hiện nhanh DENV.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

- 1.023 muỗi *Ae. aegypti*, 885 *Ae. albopictus* từ 6 quận huyện Thành phố Hà Nội.

- Huyết tương từ 100 BN SXH điều trị tại Bệnh viện 103 và 100 BN từ Bệnh viện Bạch Mai được chẩn đoán theo tiêu chuẩn WHO (2009).

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Chứng dương:*

Chứng dương của DENV được thiết kế tại Trung tâm Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, cấu trúc gồm đoạn gen E đặc hiệu của DENV được tách dòng vào vector pGOV4 bằng cặp mồi D1, D2.

* *Thiết kế lựa chọn mồi và chạy RT-PCR:*

Cặp mồi phát hiện DEN là D1-(5'-TCAATAT GCTGAAACGCGC-3') và D2-(5'-TGACCAA CAGTCAATGT-3') theo trình tự của DEN týp II đã công bố.

Tách ARN của virus từ 150 µl huyết tương và muỗi bằng Qiagen ARN Blood mini kit theo quy trình chuẩn (Qiagen, Đức) và lưu giữ ở -80°C đến khi sử dụng. Qui trình thực hiện phản ứng RT-PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thành phần tham gia phản ứng bao gồm: 5x Qiagen onestep RT-PCR buffer, dNTP 10 mM, cặp mồi phát hiện DENV 20 pmol, enzym Mix 2,5 đơn vị, ARN của virus và nước cất vừa đủ (50 µl). Thực hiện chu trình nhiệt theo 45°C trong 45 phút cho chuyển đổi từ ARN sang cADN. Tiếp đến, 95°C trong 2 phút và 40 vòng của các giai đoạn: duỗi xoắn ở 94°C trong 30 giây, bám mồi 55°C trong 1 phút, kéo dài 72°C trong 1 phút. Cuối cùng, giai đoạn kéo dài 72°C trong 10 phút. Sau khi nhân lên, sản phẩm PCR chạy trên agarose gel 1,2% ở điện áp 100 V và chụp trên hệ thống máy đọc gel.

* *Phân tích và xử lý số liệu:*

Số liệu thu thập từ bộ công cụ phỏng vấn và kết quả xét nghiệm được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Đặc điểm phân bố của muỗi *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* trên địa bàn nghiên cứu.

Muỗi *Ae. aegypti* và *Ae. albopictus* thu thập tại các địa điểm nghiên cứu trên địa bàn Thành phố Hà Nội, phân loại theo tiêu chuẩn hiện hành.

Bảng 1: Phân bố của muỗi *Ae. albopictus* trên các khu vực nghiên cứu.

LOÀI	HOÀNG MAI	BA VI	SÓC SƠN	PHÚC THỌ	THANH TRÌ	THANH XUÂN
<i>Ae. albopictus</i>	26	202	301	281	53	22
<i>Ae. aegypti</i>	231	13	19	32	260	450
Tổng số (con)	257	215	320	313	313	472

Bước đầu cho thấy, tỷ lệ muỗi *Ae. albopictus* có nhiều tại huyện Phúc Thọ, huyện Sóc Sơn và Ba Vi. So với 2 quận nội thành, tỷ lệ này cao hơn nhiều. Điều này phù hợp với phân bố và đặc tính của muỗi *Ae. albopictus*. Trong khi đó, *Ae. aegypti* phân bố chủ yếu ở Thanh Xuân, Thanh Trì và Hoàng Mai.

2. Đặc điểm BN SXH.

BN SXH được phỏng vấn và theo dõi bằng mẫu phiếu điều tra lâm sàng.

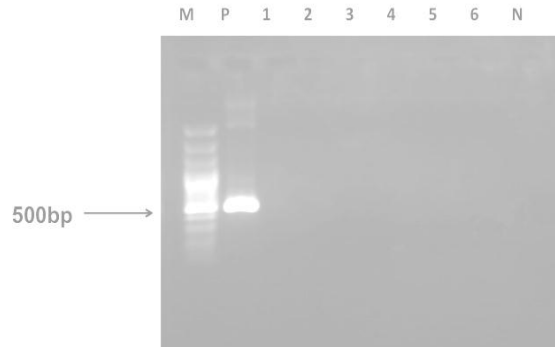
Bảng 2: Tỷ lệ các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng của BN SXH tại 2 khu vực lấy mẫu.

TRIỆU CHỨNG LÂM SÀNG VÀ CẬN LÂM SÀNG	BỆNH VIỆN 103 (n = 100)	BỆNH VIỆN BẠCH MAI (n = 100)
Sốt cao (39 - 40°C)	100%	100%
Test dây thắt (+)	100%	100%
Gan to	30%	27%
Phát ban	50%	48%
Đỏ mắt	30%	43%
Đau khớp	7%	8%
Sưng hạch	30%	40%
Tiểu cầu < 100 x 10 ³ /μl	90%	87%

3. Nghiên cứu ứng dụng phương pháp sinh học phân tử RT-PCR phát hiện DENV trên muỗi và BN SXH.

Muỗi sử dụng trong nghiên cứu được phân nhóm theo đơn vị quận hoặc huyện.

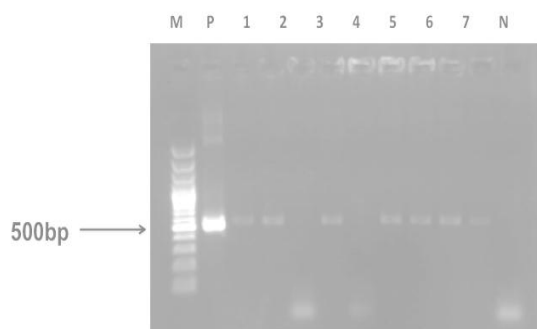
Thu thập tuyến nước bọt, ngực và bụng của muỗi. Sau đó, tách chiết ARN mẫu bệnh phẩm bằng kit Qiagen trên đá theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng ARN tổng số làm đích để chạy RT-PCR theo qui trình đã được chuẩn hóa với DENV.



Hình 1: Hình ảnh RT-PCR phát hiện ARN của virus DENV trên muỗi. M: ADN marker 100 bp; P: chứng dương; đường 1 - 6: Muỗi *Ae. albopictus* tại các khu vực nghiên cứu (1: Hoàng Mai, 2: Ba Vi; 3: Sóc Sơn; 4: Phúc Thọ; 5: Thanh Trì; 6: Thanh Xuân); N: chứng âm.

Kết quả bước đầu cho thấy, không phát hiện ARN của DENV trong muỗi trên địa bàn nghiên cứu. Muỗi tại thời điểm nghiên cứu (từ tháng 4 đến tháng 6 - 2011) đều không mang virus. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây. Tại thời điểm bắt muỗi, trên địa bàn Thành phố Hà Nội chưa xảy ra vụ dịch nào. Ở những khu vực bùng phát dịch hay ổ dịch trước đây đều đẩy mạnh tốt công tác phòng chống dịch. Do vậy, kết quả bước đầu cho thấy chưa có lưu hành của virus trong muỗi. Hơn nữa, tỷ lệ phát hiện ARN của virus trên muỗi mang mầm bệnh rất thấp. Do vậy, với số lượng chưa đủ lớn, việc phát hiện virus rất khó. Để làm rõ virus lưu hành trong vector, cần phải mở rộng khu vực nghiên cứu cũng như tăng số lượng muỗi.

BN SXH được lấy máu toàn phần có chống đông EDTA. Tách ARN tổng số bằng kit Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ứng dụng qui trình chuẩn hóa phát hiện ARN của DENV khi sử dụng kit Onestep trong nghiên cứu.



Hình 2: Sản phẩm PCR sau chạy Onestep RT-PCR. M: ADN marker 100bp; P: Chứng dương DENV; đường 2 - 8 các mẫu nghiên cứu; N: Chứng âm.

Bảng 3: Kết quả phát hiện ARN của DENV trên BN SXH.

VIRUS	BỆNH VIỆN 103 (n = 100)		BỆNH VIỆN BẠCH MAI (n = 100)	
	(+)	(-)	(+)	(-)
DENV	57%	43%	60%	40%

Kết quả trên cho thấy, tỷ lệ nhiễm DENV ở nhóm BN điều trị tại Bệnh viện 103 là 57% và Bệnh viện Bạch Mai là 60%. Như vậy, DENV vẫn là virus chủ yếu lưu hành trên địa bàn Thành phố Hà Nội và là nguyên nhân chính gây bệnh SXH. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trong nước. Theo Vũ Sinh Nam, tỷ lệ BN SXH do DENV chiếm 60%, 40% không do DENV trên địa bàn Thành phố Hà Nội. Một số tác giả khác cũng cho thấy ngoài DENV, còn lưu hành virus *Chikungunya*.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu ứng dụng Onestep RT-PCR phát hiện ARN của virus DENV trên muỗi *Ae. aegypti* và *Ae. albopictus*, cho thấy không phát hiện ARN của DENV trên muỗi *Ae. aegypti* ở các khu vực nghiên cứu. Tỷ lệ phát hiện ARN của DENV trên BN SXH ở hai địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện 103: 57% và Bệnh viện Bạch Mai: 60%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Sinh Nam, Nguyễn Thị Kim Tiến. Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh sốt dengue/SXH dengue tại Hà Nội. Y học thực hành. 2009.
2. Vũ Xuân Nghĩa và CS. Phát hiện nhanh virus Dengue trên BN SXH bằng phương pháp sinh học phân tử onestep RT-PCR. Tạp chí Y-Dược học quân sự. 2010.
3. Vũ Xuân Nghĩa và CS. Ứng dụng kỹ thuật RT-PCR phát hiện virus *Chikungunya* ở BN SXH. Tạp chí Y-Dược học quân sự. 2010.
4. Nimmannitya, S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. Southeast Asian J Trop Med. Public Health. 1987, 18, pp.392-397.
5. De Paula S. O, de Melo Lima C. Onestep RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to two-step RT-PCR approaches. J Clin Virol. 2004, 30, pp.297-301.
6. WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Denguenet Fact sheet. WHO, 2009, 117 (3).

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phản biện: 10/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

