

ĐÁNH GIÁ ĐỘ NHẠY VÀ ĐỘ ĐẶC HIỆU CỦA QUE THỬ SẮC KÝ MIỄN DỊCH NANO TỪ TÍNH TỰ TẠO TRONG PHÁT HIỆN NHANH KHÁNG NGUYÊN NS1 CỦA VIRUS DENGUE

Đỗ Như Bình^{1,2}, Lê Văn Nam¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử sắc ký miễn dịch sử dụng hạt nano từ tính tự tạo phát hiện kháng nguyên NS1 của virus Dengue. **Đối tượng và phương pháp:** Sử dụng hạt nano từ tính gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên NS1 kết hợp hiện màu enzyme để chế tạo que thử sắc ký miễn dịch từ tính, áp dụng phát hiện NS1 trong các mẫu nhiễm chủ động và huyết thanh của bệnh nhân để xác định ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu. **Kết quả:** Que thử có khả năng phát hiện NS1 từ mức 0,025 ng/ml đối với týp 1 và týp 3; 0,01 ng/ml đối với týp 2 và 0,1 ng/ml đối với týp 4. Độ nhạy và độ đặc hiệu đều đạt 100%, cao hơn so với que thử thương mại Dengue Ag Rapid Test CE (CTK Biotech, Mỹ) và không có phản ứng chéo với kháng nguyên NS1 của virus zika cũng như virus Chikungunya, viêm não Nhật Bản, HBV và HCV. **Kết luận:** Que thử nano từ tính có khả năng xác định nhanh NS1 trong huyết thanh bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue.

Từ khóa: Sốt xuất huyết Dengue; Hạt nano từ tính; Que thử sắc ký miễn dịch từ tính.

Evaluate the Sensitivity and Specificity of Home-Made Magnetic Immunochromatographic Test Strip Using Magnetic Nanoparticle for Rapid Detection of Dengue NS1 Antigen

Summary

Objectives: To evaluate the sensitivity and specificity of immunochromatographic test strips using nanoparticles from the detection of NS1 antigen of Dengue virus. **Subjects and methods:** Using magnetic nanoparticles with NS1 antigen-specific monoclonal antibodies combined with a reporter enzyme to make magnetic immunochromatographic test strips, applying NS1 detection in actively NS1 spiked samples and patient serum to determine threshold, sensitivity and specificity. **Results:** The threshold comes up with a limit of detection of spiked NS1 for 4 serotypes are 0.025 ng/mL of DENV-1 and DENV-3; 0.01 ng/mL of DENV-2 and 0.1 ng/mL DENV-4. The sensitivity and specificity of nanomagnetic ICT were 100%, higher than the commercial Dengue Ag Rapid Test CE (CTK Biotech, USA) and there is no cross-reactivity with the recombinant NS1 antigen of Zika, Chikungunya, Japanese Encephalitis, HBV and HCV. **Conclusion:** The magnetic nanoparticle strip test holds a great potential to be applied to NS1 detection in the sera of Dengue haemorrhagic fever patients.

* *Keywords:* Dengue haemorrhagic fever; Magnetic nanoparticle; Immunochromatographic strip test.

¹Bộ môn - Khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

²Ban Khoa học Quân sự, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

Người phản hồi: Đỗ Như Bình (nhubinh.do@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 05/5/2021

Ngày bài báo: 26/5/2021

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt xuất huyết Dengue (SXHD) là một bệnh truyền nhiễm lây truyền qua muỗi gây ra bởi virus Dengue, bao gồm 4 týp DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4; trong đó, DENV-2 là týp thường hay gây ra các biến chứng nguy hiểm cho người bệnh [1, 7]. Đây được coi là một trong mười nguyên nhân hàng đầu về tỷ lệ mắc bệnh, tử vong trên toàn thế giới. Theo ước tính của WHO, có khoảng 3 - 3,9 tỷ người đang sống trên 128 quốc gia có nguy cơ nhiễm virus Dengue. Bệnh ảnh hưởng đến khoảng 100 triệu người mỗi năm, trong số này có khoảng 500.000 người phát triển thành thể nặng và có > 25.000 người, chủ yếu là trẻ em tử vong trên toàn thế giới [8].

Tại Việt Nam, SXHD đã trở thành dịch hàng năm và cả 4 týp virus Dengue đã được xác định đang lưu hành, phân bố khắp cả nước. Biểu hiện lâm sàng chủ yếu của bệnh là sốt cấp diễn và xuất huyết với nhiều dạng khác nhau, đặc biệt có thể dẫn đến tử vong do giảm lượng máu lưu hành dẫn đến tình trạng sốc [1]. Việc chẩn đoán xác định nhanh tình trạng sốt có phải do virus Dengue hay không ngay từ những ngày đầu là một nhu cầu cấp thiết, đặc biệt với týp virus nguy hiểm như DENV-2.

Hiện nay, chẩn đoán SXHD bằng que thử sắc ký miễn dịch phát hiện kháng nguyên NS1 được ưu tiên nghiên cứu do thời gian trả kết quả nhanh và dễ thực hiện. Đa số nghiên cứu đều sử dụng hạt nano vàng làm chất đánh dấu tạo cộng hợp chế tạo que thử. Tuy nhiên, hạn chế

cơ bản của kỹ thuật này so với các kỹ thuật chẩn đoán khác như ELISA, RT-PCR là có độ nhạy thấp [2, 3, 4, 6].

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy khi sử dụng hạt nano/bi từ sẽ cho phép định lượng được cường độ tín hiệu trong toàn bộ lớp nitrocellulose tại vị trí vạch tín hiệu [5, 8]. Ngoài ra, sắc ký miễn dịch sử dụng hạt nano/bi từ còn có ưu điểm nâng cao độ nhạy phát hiện lên hàng chục lần nhờ khả năng làm giàu mẫu bằng công nghệ phân tách từ tính [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kết hợp giữa hạt nano từ tính với kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên NS1 kết hợp khuếch đại tín hiệu bằng hiện màu enzyme để tạo que thử nano từ tính nhằm: *Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử sắc ký miễn dịch nano từ tính tự tạo trong phát hiện nhanh kháng nguyên NS1, giúp chẩn đoán nhanh bệnh SXHD.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị nghiên cứu

* *Vật liệu:*

- Mẫu huyết thanh: Các mẫu bệnh phẩm, trong đó có 50 mẫu của người khỏe mạnh và 70 mẫu dương tính với Dengue đã kiểm chứng bằng RT-qPCR, thu thập tại Khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 103.

- Que thử sắc ký miễn dịch nano từ tính: Que thử (do nhóm nghiên cứu tự chế tạo) có cấu tạo gồm cặp kháng thể kháng NS1 có mã hiệu lần lượt là HM164 và HM026 (East Coast Bio, Mỹ), trong đó HM164 là

kháng thể bắt giữ gắn trên que thử (1,5 µg/cm trên màng nitrocellulose HF120) ở vị trí vạch thử nghiệm và HM026 là kháng thể phát hiện gắn hạt nano từ (kích thước = 100 nm và lượng sử dụng là 0,5 µl/phần ứng) và đã được biotin hóa. Vạch kiểm chứng là kháng thể đa dòng kháng IgG chuột. Que thử hoạt động theo nguyên lý Sandwich, kết quả dương tính sẽ cho hai vạch màu vàng (màu hạt nano từ), hiện màu enzyme sẽ cho hai vạch màu xanh (phản ứng cơ chất TMB với Biotin-Streptavidin gắn HRP).

* *Hóa chất*: Kháng nguyên Dengue virus NS1 tái tổ hợp serotype 1-4. Cụ thể: DENV1-NS1 chủng Nauru/Western Pacific/1974; DENV2-NS1 chủng Thailand/16681/84; DENV3-NS1 chủng Sri Lanka D3/H/IMTSSA-SRI/2000/1266; DENV4-NS1 chủng Dominica/814669/1981. Cộng hợp Streptavidin-PolyHRP 80 65R-S118 (Fitzgerald, Mỹ). NHS-Biotin (Sigma-Aldrich). Đệm PBS pH 7,4 có bổ sung thêm 0,5% BSA và 0,01% Tween 20.

* *Thiết bị*: Máy vortex (Labnet); Giá từ (Invitrogen); Pipet đơn kênh; Một số thiết bị thông thường khác được trang bị ở phòng thí nghiệm.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Xác định ngưỡng phát hiện, phản ứng chéo của que thử sắc ký miễn dịch từ tính phát hiện nhanh NS1*:

Để đánh giá ngưỡng phát hiện của que thử, 4 týp kháng nguyên NS1 tái tổ hợp được nhiễm chủ động vào đệm chạy với các nồng độ biến đổi từ 1 - 0,05 ng/ml/týp, tiến hành cô đặc và nhúng que thử. Đánh giá kết quả ở nhiệt độ phòng sau 10 phút.

Sau khi que thử hút hết dịch, cộng hợp gắn HRP được pha loãng 200 lần (tương ứng với nồng độ cộng hợp 0,25 µg/ml) và tiếp tục nhỏ vào que thử. Sau khi đã hút hết dịch trong ống, bổ sung thêm 50 µl đệm chạy để đẩy hết lượng cộng hợp còn dư trên que thử. Sau khi hút hết đệm, que thử được hiện màu trong 200 µl cơ chất TMB. Tiếp tục đọc kết quả trong 10 phút.

Để thử nghiệm phản ứng chéo của que thử sắc ký miễn dịch kẹp đôi phát hiện nhanh NS1, chúng tôi tiến hành phân tích với protein NS1 tái tổ hợp của virus Zika, Chikungunya, Viêm não Nhật Bản với nồng độ 100 ng/ml/que thử. Các mẫu HBV và HCV được nhiễm chủ động 10^6 phiên bản thể gen/que thử.

* *Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử sắc ký miễn dịch từ tính phát hiện nhanh NS1 của virus Dengue trong các mẫu bệnh phẩm*:

Để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử, 70 mẫu huyết thanh dương tính và 50 mẫu huyết thanh âm tính với virus Dengue (đã được kiểm tra bằng RT-qPCR) được pha loãng 10 lần trong đệm chạy, sau đó tiến hành phân tích theo quy trình mục 2.1. Đồng thời, so sánh kết quả với que thử thương mại Dengue Ag Rapid Test CE (CTK Biotech, Mỹ).

* *Thời gian và địa điểm nghiên cứu*:

- Thời gian: Từ 8/2020 - 3/2021.

- Địa điểm nghiên cứu: Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y; Khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 103.

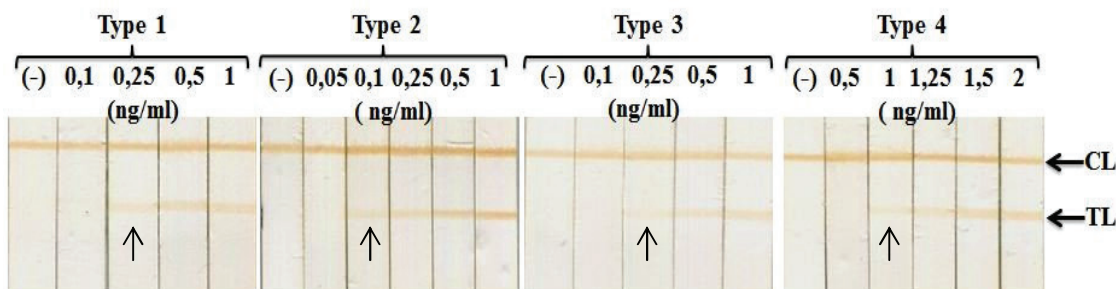
* *Xử lý số liệu*: Sử dụng phần mềm STATA 14.0.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Xác định ngưỡng phát hiện, phản ứng chéo của que thử sắc ký miễn dịch từ tính phát hiện nhanh NS1

* Ngưỡng phát hiện của que thử:

- Trước khi nhỏ cơ chất TMB:

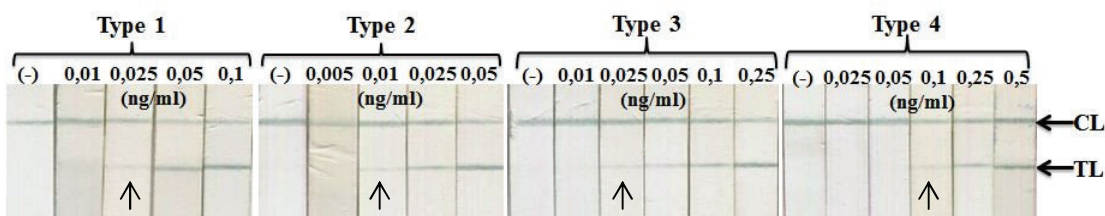


Hình 1: Ngưỡng phát hiện của que thử sắc ký miễn dịch từ tính phát hiện nhanh NS1 khi không hiện màu cộng hợp Streptavidin-PolyHRP80.

Số chỉ trên que thử là các nồng độ kháng nguyên NS1 tái tổ hợp nhiễm chủ động đối với từng tít; CL: Vạch kiểm chứng; TL: Vạch thử nghiệm.

Kết quả hình 1 cho thấy que thử có thể phát hiện được kháng nguyên NS1 từ mức nhiễm chủ động là 0,25 ng/ml đối với tít 1 và tít 3; 0,1 ng/ml đối với tít 2 và 1 ng/ml đối với tít 4.

- Sau khi nhỏ cơ chất TMB:



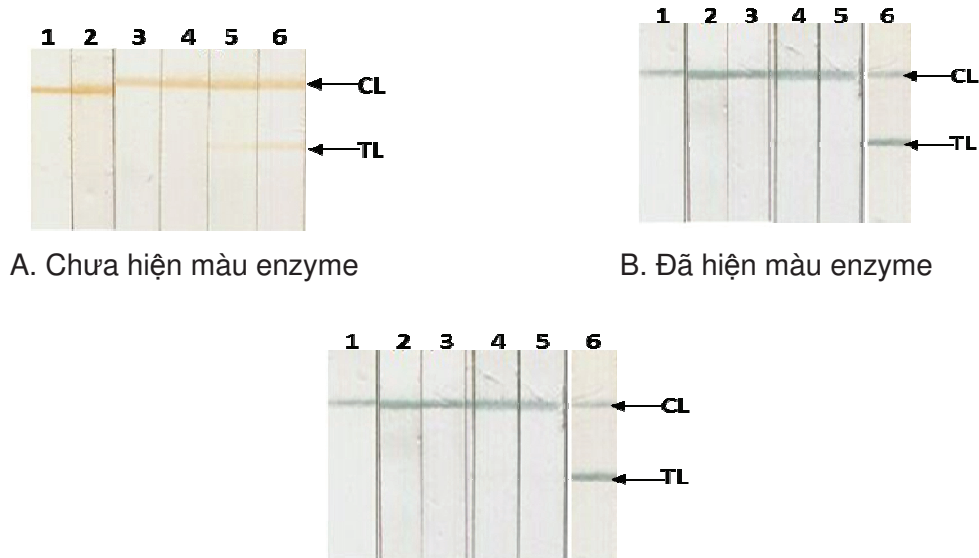
Hình 2: Ngưỡng phát hiện của que thử sắc ký miễn dịch từ tính phát hiện nhanh NS1 bằng phản ứng hiện màu cộng hợp Streptavidin-PolyHRP80.

Số chỉ trên que thử là các nồng độ kháng nguyên NS1 tái tổ hợp nhiễm chủ động đối với từng tít; CL: vạch kiểm chứng; TL: vạch thử nghiệm

Khi tiến hành hiện màu cộng hợp enzyme bằng cơ chất TMB, que thử có thể phát hiện NS1 từ mức nhiễm chủ động là 0,025 ng/ml đối với tít 1 và tít 3; 0,01 ng/ml đối với tít 2 và 0,1 ng/ml đối với tít 4.

Như vậy, độ nhạy của que thử đều tăng hơn 10 lần so với phương pháp chạy que thử thông thường.

* Phản ứng chéo của que thử:



Hình 3: Thử nghiệm đánh giá phản ứng chéo của que thử sắc ký miễn dịch từ tính với NS1 của các virus khác.

(1) NS1 của virus Zika tái tổ hợp (100 ng/ml); (2): Virus Chikungunya; (3): Virus Viêm não Nhật Bản; (4): HBV; (5): HCV; (6): Mẫu dương tính NS1 (1 ng/ml); TL: Vạch thử nghiệm; CL: Vạch kiểm chứng.

Kết quả cho thấy que thử không có phản ứng chéo với kháng nguyên NS1 tái tổ hợp của chủng virus Zika, cũng như kháng nguyên NS1 của các *Flaviviridae* virus khác được thử nghiệm ở mức nồng độ cao hơn nhiều lần so với thường gặp trên thực tế. Bên cạnh đó, không có phản ứng chéo với các tác nhân HBV và HCV, là hai virus hay gặp với tỷ lệ người nhiễm cao ở Việt Nam.

2. Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của que thử sắc ký miễn dịch từ tính phát hiện nhanh NS1 của virus Dengue trong các mẫu bệnh phẩm

Bảng 1: Kết quả thử nghiệm trên mẫu bệnh phẩm của hai loại que thử phát hiện nhanh NS1.

		Kết quả dương tính khi phân tích bằng que thử	Kết quả âm tính khi phân tích bằng que thử
Que thử Dengue Ag Rapid Test CE (CTK Biotech, Mỹ)	Dương tính với RT-qPCR	66 (PA)	4 (ND)
	Âm tính với RT-qPCR	0 (PD)	50 (NA)
Que thử phát triển trong nghiên cứu	Dương tính với RT-qPCR	70 (PA)	0 (ND)
	Âm tính với RT-qPCR	0 (PD)	50 (NA)

Kết quả cho thấy, khi phân tích trên que thử thương mại, trong số 70 mẫu bệnh phẩm dương tính chỉ có 66 mẫu dương tính thực sự và 4 mẫu âm tính. Trái lại, với que thử nano từ tính đã phát hiện được toàn bộ 70 mẫu bệnh phẩm dương tính, trong đó 4 mẫu được phát hiện bằng phản ứng hiện màu enzyme với cơ chất TMB và được kiểm tra bằng nested RT-PCR.

Như vậy, trên tập hợp mẫu đã được thử nghiệm, độ nhạy của que thử sắc ký miễn dịch từ tính phát hiện nhanh NS1 đạt 100% và độ đặc hiệu đạt 100%, cao hơn so với que thử thương mại hiện đang được sử dụng phổ biến tại Việt Nam là Dengue Ag Rapid Test CE (CTK Biotech, Mỹ) với độ nhạy đạt 94,3% và độ đặc hiệu đạt 100%.

BÀN LUẬN

Theo công bố của một số nhà sản xuất que thử thương mại hiện đang lưu hành tại thị trường Việt Nam như que thử Dengue Ag Rapid Test CE (CTK Biotech, Mỹ), que thử Panbio® Dengue Early Rapid (Hàn Quốc) có ngưỡng phát hiện với kháng nguyên NS1 tái tổ hợp của các týp như sau: 0,75 ng/ml đối với týp 1; 0,25 ng/ml đối với týp 2; 3,5 ng/ml đối với týp 3 và 2,4 ng/ml đối với týp 4 [2, 4]. Như vậy, với ngưỡng phát hiện NS1 như đã trình bày ở trên, độ nhạy của que thử phát triển trong nghiên cứu này cao hơn rất nhiều, đặc biệt với týp DENV-2, độ nhạy phát hiện cao gấp 25 lần so với các que thử thương mại.

Về phản ứng chéo của que thử, do độ tương đồng về trình tự protein NS1 giữa chủng virus Dengue và chủng virus Zika đạt tới 44%, ngoài ra còn một số virus

khác như Chikungunya, viêm não Nhật Bản, West Nile. Do vậy, chúng tôi đã tiến hành sử dụng que thử từ tính phát hiện NS1 tái tổ hợp của các *Flaviviridae* virus trên, kết quả cho thấy que thử đã phát triển trong nghiên cứu này có tính đặc hiệu rất cao, cho phép chẩn đoán phân biệt được NS1 đi từ các loài *Flaviviridae* virus khác.

Độ nhạy và độ đặc hiệu phụ thuộc rất nhiều vào kháng thể sử dụng. Các phương pháp miễn dịch phát hiện kháng nguyên NS1 đều dựa trên cấu hình kẹp đôi vốn yêu cầu một cặp kháng thể có ái lực cao và có khả năng nhận biết hai yếu tố quyết định kháng nguyên khác nhau trên NS1. Do virus Dengue có 4 kiểu huyết thanh với trình tự acid amin của NS1 có độ tương đồng không cao nên việc lựa chọn được một tổ hợp kháng thể cho phép phát hiện NS1 đi từ tất cả các kiểu huyết thanh có ý nghĩa rất quan trọng, quyết định tính chính xác của phương pháp phân tích [6]. Cặp kháng thể đơn dòng kháng NS1 sử dụng trong que thử sắc ký miễn dịch từ tính của chúng tôi hoàn toàn đáp ứng yêu cầu.

Thêm vào đó, các hạt nano từ tính với kích thước nhỏ có rất nhiều ưu thế như diện tích bề mặt lớn, sự ổn định lâu dài và khả năng di chuyển lên màng dễ dàng hơn hạt nano vàng và tránh khả năng bị tụ ở dưới màng như hạt nano carbon.

So với các cách phát hiện dựa trên tín hiệu quang học (có màu, huỳnh quang) chỉ cho phép quan sát được tín hiệu trên bề mặt của màng nitrocellulose, sử dụng hạt nano từ sẽ cho phép định lượng được cường độ tín hiệu trong toàn bộ lớp nitrocellulose tại vị trí vạch tín hiệu. Do vậy, ngoài khả năng định lượng, sắc ký

miễn dịch sử dụng hạt nano từ còn có ưu điểm nâng cao độ nhạy phát hiện lên hàng chục lần [5]. Một ưu điểm khác của việc sử dụng hạt nano từ làm cộng hợp phát hiện trong kỹ thuật sắc ký miễn dịch là khả năng làm giàu mẫu bằng công nghệ phân tách từ tính nên có thể dùng cộng hợp phát hiện với hạt nano từ để cô đặc mẫu trước khi phân tích bằng que thử sắc ký miễn dịch [8], cùng với đó việc sử dụng cộng hợp phát hiện khuếch đại tín hiệu bằng phức hợp streptavidine gắn enzyme HRP tương tự như ELISA đã giúp cho que thử nano từ tính có độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác đạt 100%, cao hơn các que thử sử dụng hạt nano vàng và tương đương với phương pháp định lượng RT-PCR.

KẾT LUẬN

Que thử nano từ tính phát hiện nhanh kháng nguyên NS1 theo nguyên lý Sandwich, có ngưỡng phát hiện NS1 ở nồng độ thấp (0,1 - 0,01 ng/ml). Không có phản ứng chéo với các *Flaviviridae* virus khác như *Zika*, *Chikungunya* hay virus viêm não Nhật Bản. Que thử có khả năng chẩn đoán đúng những trường hợp không có bệnh và những trường hợp mắc SXHD thực sự là 100%, cao hơn so với que thử thương mại Dengue Ag Rapid Test CE (CTK Biotech, Mỹ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị sốt xuất huyết Dengue. Ban hành kèm theo

Quyết định số 458/QĐ-BYT ngày 16 tháng 02 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế 2011.

2. Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for Dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis* 2009 Jan; 3(1):e360.

3. Cucunawangsih, Nata Pratama Hardjo Lugito. Trends of Dengue disease epidemiology. *Virology: Research and treatment*. SAGL Journals 2017; (8):1-6.

4. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremond L, Leduc A, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using ns1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(8): e280.

5. Mingyuan Gao et al. Lateral Flow Immunochromatographic Assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents. *Anal. Chem* 2011; 83(17), 6778-6784.

6. Jihoo Lee et al. Development and clinical evaluation of a highly accurate Dengue NS1 rapid test: From the preparation of a soluble NS1 antigen to the construction of an RDT. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2015; 82:128-134.

7. World Health Organization. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012 - 2020. Geneva, Switzerland: WHO 2012:1-43.

8. Xiaolin Huang, Zoraida P Aguilar, et al. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 2016;75(15): 166-180.