

# PHÁT HIỆN NHANH VIRUT DENGUE TRÊN BỆNH NHÂN SỐT XUẤT HUYẾT BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ ONESTEP RT-PCR

*Vũ Xuân Nghĩa\**; *Nguyễn Trọng Viễn\**; *Nguyễn Đình Ứng\**  
*Hoàng Văn Lương\**; *Đỗ Như Bình\**

## TÓM TẮT

Virut Dengue (DENV) được coi là tác nhân gây ra các vụ dịch sốt xuất huyết (SXH) ở Đông Nam châu Á và Việt Nam. Mặc dù có nhiều phương pháp phát hiện DENV ở mức độ huyết thanh, nhưng những phương pháp phát hiện sớm virut cần được quan tâm và phát triển. Việc phát hiện sớm virut có ý nghĩa rất quan trọng trong chẩn đoán, điều trị và xây dựng phương án phòng chống dịch. Trong nghiên cứu này, phương pháp onestep RT-PCR với cặp mồi thiết kế đặc hiệu cho DENV được áp dụng để phát hiện sớm DENV. Kết quả, trong 80 mẫu máu của bệnh nhân (BN) sốt xuất huyết có 36 mẫu dương tính với DENV.

\* Từ khóa: Virut Dengue; Sốt xuất huyết; Phương pháp sinh học phân tử onestep RT-PCR.

## RAPID DETECTION OF DENGUE VIRUS IN HEMORRHAGIC PATIENTS BY ONESTEP RT-PCR ASSAY

### SUMMARY

*Dengue virus (DENV), a member of Flaviridae family, is of considerable public health concern in Southeast Asian and African countries. However, despite of serological evidence, the diagnosis of this arthropod-borne human disease is confirmed infrequently and needs to be improved. In fact, hemorrhagic patients were caused by many pathogens but the most of them is DENV in Vietnam. In this study, a specific and sensitive DENV onestep RT-PCR assay was used as a tool for the diagnosis of DENV. Results showed that 36 cases were positive with DENV in 80 suspected clinical samples.*

\* Key words: Dengue virus; Haemorrhagic fever; Onestep RT-PCR assay.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Virut Dengue (DENV) thuộc họ Plaviridea, có hình cầu, đường kính 40 - 50 nm, có cấu

trúc ARN sợi đơn 11.000 bp, capsid và protein màng [2]. BN nhiễm DENV biểu hiện từ mức nhẹ như không triệu chứng đến mức

---

\* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn

độ vừa, nặng và rất nặng. Trong những năm gần đây, sốt xuất huyết (SXH) do DENV và những biểu hiện nặng của nó như SXH và sốc dengue xuất hiện ở nhiều khu vực trên thế giới, tần suất dịch ngày càng tăng, gây ảnh hưởng lớn đến sức khỏe cộng đồng [6].

Để chẩn đoán phát hiện DENV, 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 acid nucleic [3]. 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 thường không thành công do DENV rất khó khăn trong nuôi cấy và nồng độ virus máu thấp. Phương pháp huyết thanh học, phát hiện DENV IgM và IgG bằng ELISA [4]. 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 twostep RT-PCR được sử dụng thường xuyên để phát hiện virus trên thế giới và trong nước. Tuy nhiên, twostep RT-PCR có nhược điểm như thời gian thực hiện kéo dài, các bước thực hiện phức tạp và độ nhạy giảm. Gần đây, một số tác giả đã công bố phương pháp onestep RT-PCR trong phát hiện DENV. Phương pháp này biểu hiện tính vượt trội so với twostep RT-PCR 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.

## **VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP      NGHIÊN CỨU**

### **1. Bệnh nhân.**

Nghiên cứu sử dụng huyết tương ( $n = 80$ ) của BN nghi ngờ SXH do DENV ở giai đoạn cấp trong vụ dịch SXH 2009 tại Bệnh viện 103 và trạm xá xã Tân Lĩnh, Thanh Trì, Hà Nội. BN nhập viện và trung tâm y tế với biểu hiện sốt cao, phát ban và xuất huyết. Nhiều BN có biểu hiện đau sưng khớp. Nhóm người khỏe mạnh ( $n = 10$ ) được sử dụng như chứng âm trong nghiên cứu

### **2. Chứng dương.**

Chứng dương của DENV được thiết kế tại Trung tâm Sinh Y Dược học quân sự, Học viện Quân y, cấu trúc gồm đoạn gen E đặc hiệu của DENV được clon vào vector pGOV4 bằng cặp mồi D1, D2 và ARN tổng số từ chứng DENV dương.

### **3. Thiết kế và lựa chọn mồi.**

Thiết kế và lựa chọn cặp primers phát hiện DENV trên đoạn gen E đặc hiệu đã được công bố [5]. Đánh giá primer này cho chuẩn hóa với quy trình chuẩn của onestep RT-PCR và đảm bảo tính đặc hiệu và nhạy. Cặp mồi phát hiện DEN là D1-(5'-TCAATATGCTGAAACGCGC-3' và D2- (5'-TGCACCAACAGTCAATGT-3') theo trình tự của DEN týp II đã công bố.

#### 4. Tách chiết ARN.

Tách ARN của virus từ 150 µl plasma bằng Qiagen ARN Blood mini kit theo quy trình chuẩn (Qiagen, Đức) và cất giữ ở  $-80^{\circ}\text{C}$  đến khi sử dụng.

#### 5. Quy trình onestep RT-PCR.

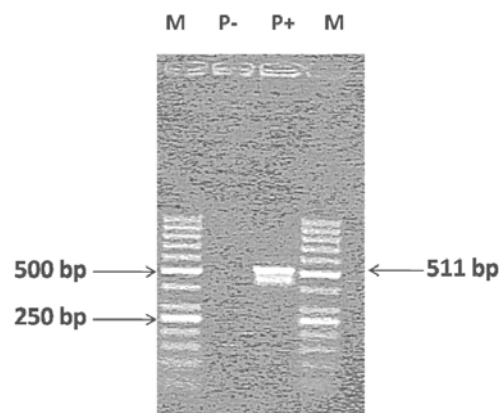
Thực hiện quy trình theo hướng dẫn của bộ kit nhưng có thay đổi để tối ưu hóa phương pháp. Thành phần tham gia phản ứng bao gồm: 5x Qiagen onestep RT-PCR buffer, dNTP 10 mM, cặp mồi phát hiện DENV 20 pmol, enzym Mix 2,5 đơn vị, ARN của virus và nước cất vừa đủ (50 µl). Thực hiện chu trình nhiệt theo  $45^{\circ}\text{C}$  trong 45 phút cho chuyển đổi từ ARN sang cADN. Tiếp đến,  $95^{\circ}\text{C}$  trong 2 phút và 40 vòng của các giai đoạn: duỗi xoắn ở  $94^{\circ}\text{C}$  trong 30 giây, bám mồi  $55^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút, kéo dài  $72^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút. Cuối cùng là giai đoạn kéo dài  $72^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút. Sau khi nhân lên, sản phẩm PCR chạy trên agarose gel 1,2% ở điện áp 100V và chụp trên hệ thống máy đọc gel.

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### VÀ BÀN LUẬN

#### 1. Chuẩn hóa onestep RT-PCR.

Để tối ưu hóa quy trình phát hiện DENV từ mẫu bệnh phẩm, áp dụng phát hiện với chứng dương theo quy trình của bộ kit có sửa đổi. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR của DENV chạy trên agarose gel 1,2% với hiệu điện thế 100 V đạt 511 bp.



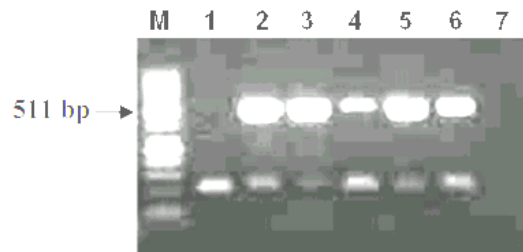
Hình 1: Chuẩn hóa quy trình chạy onestep RT-PCR. DEN M: marker ADN 50bp; P+: chứng dương. P-: chứng âm.

Để đánh giá độ nhạy của phương pháp onestep RT-PCR, pha loãng ARN tổng số của chứng dương trong TE buffer với nồng độ khác nhau, tạo panel dương tính chuẩn có nồng độ từ 100 ng - 1 ng. Kết quả cho thấy, onestep RT-PCR có khả năng phát hiện nồng độ nhỏ nhất 1 ng ARN tổng số.

Độ đặc hiệu của phương pháp so sánh với alphavirus. Kết quả cho thấy, phương pháp có độ đặc hiệu cao với DENV, không có phản ứng chéo với *Chikungunya virus* (CHIKV), một virus gây triệu chứng SXH như DENV. Hơn nữa, ở nhóm chứng âm (n = 10) không có mẫu nào dương tính với DENV.

## 2. Phát hiện DENV bằng Qiagen onestep RT-PCR.

Sau khi tối ưu hóa, sử dụng phương pháp onestep RT-PCR nhằm phát hiện nhanh, chính xác ARN của DENV trong mẫu nghiên cứu. Kết quả, 36/80 mẫu phát hiện ARN của DENV với tỷ lệ 45%. Các mẫu thuộc lane 2,3,4,5 dương tính hiện rõ vạch band có độ lớn 511 bp (hình 2).



Hình 2: Phương pháp onestep RT-PCR phát hiện sớm ARN DENV trong huyết tương. M: Thang chuẩn ADN 50bp; lane 1 - 5: Mẫu của BN; lane 6: chứng dương; lane 7: chứng âm.

## BÀN LUẬN

Sự thay đổi nhanh chóng của khí hậu trên toàn cầu dẫn tới cảnh báo về các vụ dịch do *Arbovirus* gây ra. DENV được cảnh báo là một trong những *Arbovirus* quan trọng nhất gây ảnh hưởng lớn đến sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Do vậy, để phát hiện nhanh DENV trong cộng đồng là một đòi hỏi cấp bách, nhằm khống chế, ngăn chặn và dập tắt những vụ dịch do chúng gây ra. Hiện nay, trên thế giới và trong nước sử dụng nhiều phương pháp sinh học phân tử để phát hiện các mầm bệnh sinh học. Trong đó, có những phương pháp phát hiện sản phẩm trực tiếp hoặc gián tiếp của mầm bệnh. Các phương pháp ứng dụng PCR có thể xác định DENV trong mẫu bệnh phẩm khi tập trung vào những đoạn gen đặc hiệu của virus. Phương pháp onestep RT-PCR sử dụng trong nghiên cứu có tính vượt trội so với twostep RT-PCR [1]. Sử dụng onestep RT-PCR trong phát hiện sớm virus DENV mở ra hướng đi mới trong công tác phòng và chống bệnh SXH ở nước ta. Kết quả cho thấy, trong 80 mẫu bệnh phẩm, tỷ lệ nhiễm DENV 36/80 (45%). Tỷ lệ này phù hợp với số liệu công bố mới đây của Bộ Y tế về tỷ lệ nhiễm DENV trên BN SXH là 40% trong vụ dịch

2009. Ngoài ra, kết quả onestep RT-PCR cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thời điểm lấy máu, bảo quản, vận chuyển, quy trình tách, bảo quản mẫu và chạy RT-PCR.

## KẾT LUẬN

Phát triển vắc xin và điều trị nhiễm DENV không thu được nhiều thành công và vẫn cần được nghiên cứu phát triển. Trong thực tế hiện nay, phương pháp chẩn đoán nhanh là công cụ hữu hiệu nhất trong công tác phòng chống dịch bệnh. Phương pháp sinh học phân tử onestep RT-PCR sử dụng phát hiện nhanh DENV trong nghiên cứu này cho tỷ lệ nhiễm DENV trên BN SXH là 45% (36/80 BN).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *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.
2. *Gubler, D. J.* Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem, p. 1–22. In D. J. Gubler and G. Kuno (ed.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* CAB International, New York, N.Y. 1997.
3. *Guzman, M. G., and G. Kouri.* Advances in dengue diagnosis. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* 1996, 3, pp.621-627.
4. *Innis, B. L, A. Nisalak.* An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg.* 1989, 40, pp.418-427.
5. *Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin Microbiol.* 1992, 30, pp.545-551.
6. *Nimmannitya, S.* Clinical spectrum and management of dengue hae-morrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med. Public Health.* 1987, 18, pp.392-397.