

Đánh giá giá trị phát hiện virus dengue bằng phương pháp real-time PCR đa môi với bộ môi và đầu dò tự thiết kế dựa trên trình tự virus dengue phân lập tại Việt Nam

Performance evaluation of multiplex real-time PCR for dengue virus detection using in-house primer and probe designed based on dengue virus sequence isolated from Vietnam

Trần Thị Thu Hiền, Đào Thị Huyền,
Trần Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Hiệp,
Phạm Văn Chung, Nguyễn Thị Thúy,
Nguyễn Trọng Thế, Nguyễn Đăng Mạnh,
Vũ Viết Sáng và Trương Nhật Mỹ*

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu có mục tiêu đánh giá quy trình real-time PCR đa môi định type virus dengue sử dụng bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR với bộ môi/đầu dò do nhóm nghiên cứu tự thiết kế dựa trên dữ liệu trình tự gen virus dengue phân lập tại Việt Nam. **Đối tượng và phương pháp:** Tổng số 284 mẫu bệnh phẩm máu của bệnh nhân chẩn đoán sốt xuất huyết dengue được thu thập tại Bệnh viện TƯQĐ 108 trong giai đoạn tháng 10/2021 đến tháng 12/2022, ở Hà Nội, được tách chiết RNA và sử dụng cho đánh giá bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR và so sánh với bộ sinh phẩm xét nghiệm của CDC Hoa Kỳ (CE-IVD). **Kết quả:** Bộ sinh phẩm tự thiết kế định type virus dengue có ngưỡng phát hiện 10^2 bản sao/ μ L, độ đặc hiệu kỹ thuật 100%. Nghiên cứu thực hiện định type trên 284 mẫu bệnh phẩm cho thấy bộ sinh phẩm tự thiết kế có độ nhạy phát hiện virus dengue nhỉnh hơn bộ sinh phẩm CDC (lần lượt là 71,5% dương tính và 63,0% dương tính). **Kết luận:** Như vậy, bộ sinh phẩm tự thiết kế có độ đặc hiệu kỹ thuật cao, độ nhạy trên mẫu bệnh phẩm chẩn đoán sốt xuất huyết dengue tương đương với bộ sinh phẩm CDC Hoa Kỳ.

Từ khóa: Flavivirus, dengue virus, RT-qPCR đa môi, định type.

Summary

Objective: The study aimed to evaluate a multiplex real-time PCR for serotyping dengue virus using primers and probe designed by the research team, using genetic data from dengue viruses isolated from patients in Vietnam. **Subject and method:** A total of 284 blood sample specimens from patients diagnosed with dengue fever were collected at the 108 Military Central Hospital during the period from October 2021 to December 2022, in Hanoi. RNA of dengue virus were extracted and used to assess the in-house developed kit, which was compared with the CDC (U.S. Centers for Disease Control and

Ngày nhận bài: 22/8/2024, ngày chấp nhận đăng: 9/9/2024

* Tác giả liên hệ: truongnhatmy@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Prevention) diagnostic kit (CE-IVD). *Result:* The in-house developed kit procedure had a detection threshold of 10^2 copies/ μ L and a specificity of 100%. While performing on 284 samples, the in-house developed kit exhibited a slightly higher sensitivity for dengue virus detection compared to the CDC kit (71.5% positive and 63.0% positive, respectively). *Conclusion:* Thus, the in-house developed kit demonstrates high technical specificity, with sensitivity on diagnostic specimens for dengue fever comparable to the kit issued by the CDC US.

Keywords: Flavivirus, dengue virus, RT-qPCR multiplex, serotyping.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt xuất huyết dengue là bệnh truyền nhiễm do virus dengue gây nên, đang lưu hành phổ biến ở cả Việt Nam và trên thế giới¹. Virus dengue là một Arbovirus nhóm B thuộc chi Flavivirus với 4 serotype phổ biến bao gồm: DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4². Việt Nam là một trong những quốc gia nằm trong vùng dịch tễ của nhiễm Flavivirus đặc biệt là virus dengue và chịu gánh nặng kinh tế nặng nề từ dịch sốt xuất huyết dengue hằng năm³. Nhiều nghiên cứu trên người bệnh đã chỉ ra mối liên quan giữa trình tự mắc các serotype trong quần thể với mức độ nặng của mùa dịch theo mức độ cộng đồng⁴⁻⁶. Vì vậy việc theo dõi serotype trong mỗi lần nhiễm bệnh là vô cùng quan trọng giúp thêm thông tin dự đoán bệnh tật từ đó có phương hướng chăm sóc và điều trị tốt nhất cho bệnh nhân.

Hiện nay, các xét nghiệm sinh học phân tử cho phép phát hiện vật liệu di truyền của virus dengue trong máu hoặc dịch tiết của bệnh nhân nhiễm virus, do đó độ nhạy và độ đặc hiệu thường cao hơn các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán khác. Tuy nhiên, các bộ sinh phẩm thương mại chẩn đoán và định types virus dengue đạt chuẩn CE-IVD không có nhiều lựa chọn và sẵn, kèm giá thành cao, cũng như yêu cầu về máy móc thiết bị đắt tiền, xét nghiệm này thường chỉ được dùng trong phòng thí nghiệm với mục đích nghiên cứu và với quy mô nhỏ. Bên cạnh đó, theo thời gian, trình tự di truyền của virus cũng biến đổi có thể làm giảm giá trị chẩn đoán của các bộ sinh phẩm đó trên mẫu virus phân lập trên người bệnh Việt Nam. Tại Việt Nam, đa số các nghiên cứu về sốt xuất huyết dengue có ứng dụng các quy trình xét nghiệm nucleic acid từ các nghiên cứu của các nước châu Âu, châu Mỹ. Trong khi đó, sự phân

hóa của các genotype virus dengue khác biệt giữa các vùng miền, đặc điểm genotype dengue châu Á khác biệt so với vùng châu Âu hay châu Mỹ. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành thiết kế bộ mồi và đầu dò mới, dựa trên trình tự gene của virus dengue chủ yếu phân lập được từ người bệnh Việt Nam và đã xây dựng bộ quy trình real-time PCR đa mồi sử dụng bộ sinh phẩm tự thiết kế, 108 DENV-1-4 RT-qPCR Multi, gọi tắt là 108 DENV Real-time PCR, phục vụ chẩn đoán, định type virus Dengue với mục đích có thể ứng dụng trong lâm sàng. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu có hai mục tiêu chính: (1) *Tìm hiểu ngưỡng phát hiện, độ đặc hiệu kỹ thuật của bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR và (2) Đánh giá kết quả của bộ sinh phẩm với bộ sinh phẩm CDC DENV-1-4 Realtime RT-PCR Assay CE-IVD do CDC Hoa Kỳ ban hành.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

Đối với mục tiêu 1: Đối tượng nghiên cứu là RNA tách chiết từ chủng chuẩn virus dengue thuộc 4 type và các chủng virus phổ biến bao gồm: Influenza nhóm A phân nhóm H3 (FluA-H3), Influenza nhóm A phân nhóm H1 (FluA-H1), Influenza nhóm B (FluB), human enteroviruses (hEV), viêm gan C (HCV), virus Chikungunya, được sử dụng để đánh giá ngưỡng phát hiện, độ nhạy và độ đặc hiệu kỹ thuật. Chứng âm là RNA được tách chiết từ huyết thanh của người khỏe mạnh.

Đối với mục tiêu 2: Đối tượng nghiên cứu là RNA tách chiết từ 284 mẫu bệnh phẩm huyết thanh được thu thập từ 284 bệnh nhân mắc sốt xuất huyết dengue, ở các mức độ nặng khác nhau, trong giai đoạn tháng 10/2021 đến tháng 12/2022, trải qua hai

mùa dịch tại Hà Nội. Thời điểm lấy mẫu bệnh phẩm là vào ngày đầu tiên nhập viện.

2.2. Phương pháp

Theo phương pháp thực nghiệm labo có đối chứng so sánh. Quy trình nghiên cứu cụ thể như sau:

Tách chiết RNA

RNA của virus được tách chiết bằng bộ hóa chất QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat#. 52906, Qiagen) theo quy trình của nhà sản xuất. 200μL huyết thanh sau tách chiết RNA được hoàn nguyên trong 60μL AVE (Cat. 52906, Qiagen), và bảo quản ở -80°C.

Định type virus dengue sử dụng bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR

Nghiên cứu thực hiện định type virus dengue bằng phương pháp RT-qPCR đa mỗi một bước với sự kết hợp của 4 bộ mỗi được thiết kế đặc hiệu cho 4 serotype DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4: Bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR. Mỗi type được phát hiện bằng một đầu dò đặc hiệu gắn các màu khác nhau FAM, HEX, Texrad Red, Cy5 (Bảng 1). Trong đó, gen đích được nhắm tới để phát hiện cho mỗi genotype DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 lần lượt là NS4A (vị trí 6647-6752), Envelope Protein E (vị trí 1975-2072), NS5 (vị trí 8863-9018), NS3 (vị trí 5501-5603). Bộ mỗi và đầu dò được tổng hợp bởi IDT (Hoa Kỳ).

Bảng 1. Bộ mỗi cho phát hiện định type virus dengue của bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR

Serotype DENV	Tên mỗi/đầu dò	Trình tự (5' – 3')	Tm°C	GC%	Kích thước sản phẩm (bp)
1	Mỗi xuôi	TCAAGCGTACTGCTATGGATG	62	48	106
	Mỗi ngược	GTCTGTCTGGCTCTGGAATAAG	62	50	
	Đầu dò	ACTGGAGTTCTTCCTGATGGTGCTG	68	52	
2	Mỗi xuôi	GTCTTAGGTGCGCTGATTACAG	62	50	98
	Mỗi ngược	ATGATGTAGCTGTCTCCGAATG	62	50	
	Đầu dò	AGGTTCTGCTTCTATGTTGACTGGGC	68	50	
3	Mỗi xuôi	TGTGGACAGAGAACGTGAAC	58	50	156
	Mỗi ngược	AACTCAAGGTACCTGGCTCC	59	55	
	Đầu dò	GCAAGTGTGGAAGCTGTGTT	60	50	
4	Mỗi xuôi	CCAGAGCAACAGCCCAATAG	58	55	103
	Mỗi ngược	CCACACAGTTTTCCCTTGGT	58	50	
	Đầu dò	AACACAGGGTTCGACTGGAT	60	50	

Thành phần phản ứng chứa 25μL bao gồm 1X One-Step RT-qPCR ToughMix, 150nM mỗi mỗi DENV1-F, DENV1-R, DENV2-F, DENV2-R, DENV4-F, DENV4-R; 75nM mỗi đầu dò DENV1-probe, DENV2-probe, DENV3-probe; 250nM mỗi mỗi DENV3-F, DENV3-R; 250nM đầu dò DENV3-probe và 5μL mẫu bệnh phẩm. Xét nghiệm được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: Tổng hợp cDNA ở 50°C

trong 10 phút, biến tính mạch ở 95°C trong 1 phút, lặp lại 45 chu kỳ bao gồm: Dẫn mạch ở 95°C trong 10s, gắn mỗi và kéo dài ở 60°C trong 60s. Tín hiệu huỳnh quang sẽ được ghi nhận lại ở mỗi chu kỳ tại bước 60°C. Tín hiệu huỳnh quang của DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 được kết luận là dương tính khi vượt qua tín hiệu ngưỡng trong vòng 37 chu kỳ (Ct ≤ 37). Nếu tín hiệu Ct > 37 thì

kết luận là âm tính. Trong một số trường hợp, có thể thu nhận được nhiều hơn 2 tín hiệu dương tính tức đồng nhiễm nhiều hơn 1 type dengue virus cùng một lúc.

Xét nghiệm 108 DENV Real-time PCR phát hiện dengue được thực hiện trên hệ thống máy AriaMx Real-time PCR với bộ hoá chất UltraPlex 1-Step ToughMix RT-qPCR (Quantabio, US).

Đánh giá ngưỡng phát hiện, độ đặc hiệu kỹ thuật bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR

Đầu tiên, nhóm nghiên cứu thực hiện xét nghiệm với bộ chuẩn dương được tạo từ các plasmid chứa trình tự gene đích của 4 serotype của virus Dengue, được pha loãng thành dải nồng độ từ cao đến thấp với nồng độ pha loãng 10 lần liên tiếp từ 10^7 đến 10^2 bản sao/ μ L. Thực hiện xét nghiệm 108 DENV Real-time PCR lặp lại 20 lần cho mỗi nồng độ, và xác định độ nhạy xét nghiệm tại nồng độ có thể phát hiện $\geq 19/20$ lần (độ tin cậy $\geq 95\%$).

Tiếp theo, độ đặc hiệu được phân tích dựa trên phản ứng chéo với RNA người khoẻ mạnh và RNA các chủng virus phổ biến. Theo đó, mỗi mẫu được lặp lại 10 lần. Độ đặc hiệu của bộ quy trình 108 DENV Real-time PCR định type dengue virus được xác định bằng tỷ lệ kết quả âm tính trong tổng số lần thử nghiệm với các mẫu chứng âm.

Xét nghiệm real-time PCR đa môi sử dụng bộ sinh phẩm của CDC Hoa Kỳ ban hành

Nhóm nghiên cứu sử dụng bộ sinh phẩm chẩn đoán và định type virus dengue: CDC DENV-1-4 Realtime RT-PCR Assay do CDC Hoa Kỳ ban hành (Catalog No. KK0129)⁷, gọi tắt là CDC Hoa Kỳ để khảo sát và so sánh với bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR. Bộ sinh phẩm xét nghiệm CDC Hoa Kỳ được phê chuẩn sử dụng cho chẩn đoán (In vitro Diagnostic - IVD) trên bệnh nhân bởi Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (US Food and Drug Administration (FDA)).

Thành phần phản ứng của bộ xét nghiệm CDC Hoa Kỳ chứa 25 μ L bao gồm 1X One-Step RT-qPCR ToughMix, primer D1-F, D1-R, D2-F, D2-R, D3-F, D3-R, D4-F, D4-R; probe D1-probe, D2-probe, D3-probe,

D4-probe; và 5 μ L mẫu bệnh phẩm. Xét nghiệm được thực hiện theo chu trình nhiệt: Tổng hợp cDNA ở 50°C 10 phút, biến tính mạch ở 95°C trong 1 phút, lặp lại 45 chu kỳ bao gồm: Dẫn mạch ở 95°C trong 10s, gắn mỗi và kéo dài ở 60°C trong 60s. Tín hiệu huỳnh quang sẽ được ghi nhận lại ở mỗi chu kỳ tại bước 60°C. Tín hiệu huỳnh quang của DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 được kết luận là dương tính khi vượt qua tín hiệu ngưỡng trong vòng 37 chu kỳ ($C_t < 37$). Nếu tín hiệu $C_t > 37$ thì kết luận là âm tính. Trong một số trường hợp, có thể thu nhận được nhiều hơn 2 tín hiệu dương tính tức đồng nhiễm nhiều hơn 1 type dengue virus cùng một lúc.

Phân tích số liệu

Dữ liệu kết quả thực hiện quy trình xét nghiệm real-time PCR sử dụng bộ sinh phẩm CDC Hoa Kỳ và bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR đa môi định type virus dengue được thu thập bằng phần mềm LightCycler® 96 (Roche Diagnostic, Rotkreuz, Thụy Sĩ), xử lý và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel (Microsoft, US) và phần mềm SPSS (IBM, US).

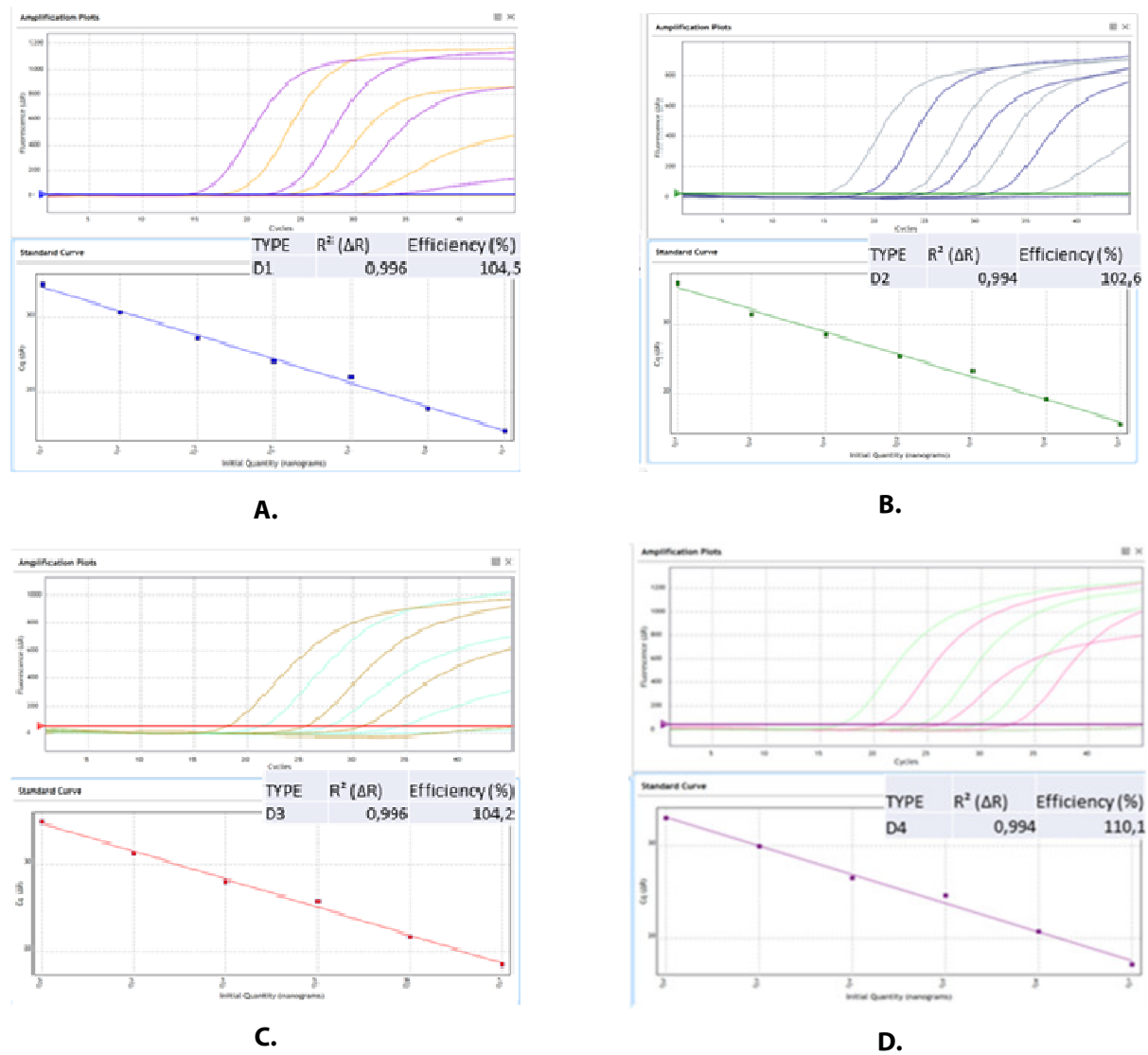
2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu là một phần kết quả thuộc đề tài cấp nhà nước trong chương trình hợp tác quốc tế "Nghiên cứu phát triển bộ sinh phẩm RealTime-PCR đa môi và Antigen Microarray trong chẩn đoán, định type và tiên lượng bệnh Sốt xuất huyết Dengue", mã số NĐT.IL.21.11 được thông qua Hội đồng Y đức Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Chứng nhận số 4763/HĐĐĐ, ngày 08 tháng 10 năm 2021. Các tác giả cam kết không có xung đột lợi ích liên quan đến nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

3.1. Ngưỡng phát hiện, độ đặc hiệu kỹ thuật của bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR

Sử dụng panel chuẩn dương được pha loãng theo hệ số 10 từ 10^7 đến 10^0 bản sao/ μ L, nhóm nghiên cứu thực hiện quy trình 108 DENV Real-time PCR nhằm xác định giới hạn phát hiện của phản ứng. Kết quả được trình bày ở Hình 1 và Bảng 2.



Hình 1. Kết quả sử dụng bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR trên dải nồng độ chuẩn dương. A: Tín hiệu khuếch đại serotype DENV-1 bao gồm tín hiệu khuếch đại và đường chuẩn. B: Tín hiệu khuếch đại serotype DENV-2 bao gồm tín hiệu khuếch đại và đường chuẩn. C: Tín hiệu khuếch đại serotype DENV-3 bao gồm tín hiệu khuếch đại và đường chuẩn. D: Tín hiệu khuếch đại serotype DENV-4 bao gồm tín hiệu khuếch đại và đường chuẩn.

Bảng 2. Cq phát hiện tại mỗi nồng độ bản sao của panel chuẩn dương

Nồng độ bản sao/μL	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
10 ⁰	AT	AT	AT	AT
10 ¹	34,4	35,9	AT	AT
10 ²	30,6	31,5	34,8	32,9
10 ³	27,2	28,5	31,2	29,9
10 ⁴	24,1	25,3	27,9	26,5
10 ⁵	21,9	23,2	25,7	24,6
10 ⁶	17,7	19,1	21,6	20,7
10 ⁷	14,7	15,5	18,4	17,1

AT: giá trị âm tính.

Kết quả cho thấy bộ panel chuẩn dương cho tín hiệu rõ ràng, với nồng độ pha loãng 10 lần. DENV-1, DENV-2 có dải Cq sớm hơn so với DENV-3 và DENV-4. Đường chuẩn xây dựng cả 4 chủng đều tuyến tính và có $R^2 > 0,99$, hiệu suất từ 100 - 110%. Do đó, panel chuẩn dương xây dựng được hoàn toàn phù hợp. Chu kỳ ngưỡng nồng độ DNA plasmid thấp nhất cho tín hiệu dương tính ở cả 4 serotype là 10^2 bản sao/ μ L với Ct lần lượt cho type 1, 2, 3 và 4 là 30,68, 31,55, 34,82 và 32,97.

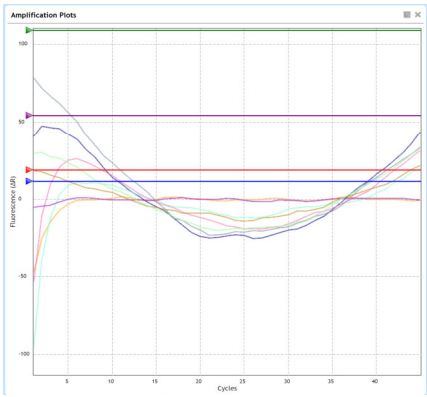
Dựa vào kết quả trên, nhóm nghiên cứu xác định ngưỡng phát hiện của quy trình 108 DENV Real-time PCR đa mỗi định type virus dengue, trên toàn dải nồng độ, mỗi nồng độ lặp lại 20 lần. Hơn nữa, nhóm nghiên cứu thực hiện khảo sát thêm nồng độ 50 bản sao/ μ L để có đánh giá sát thực hơn cho ngưỡng phát hiện của phản ứng. Kết quả được thống kê ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả ngưỡng phát hiện của bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR

Số bản sao/ μ L	DENV-1 (số lần phát hiện/ tổng số lần)	DENV-2 (số lần phát hiện/ tổng số lần)	DENV-3 (số lần phát hiện/ tổng số lần)	DENV-4 (số lần phát hiện/ tổng số lần)
10^0	3/20	6/20	1/20	4/20
10^1	8/20	9/20	4/20	8/20
5×10^1	20/20	20/20	19/20	15/20
10^2	20/20	20/20	19/20	19/20
10^3	20/20	20/20	20/20	20/20
10^4	20/20	20/20	20/20	20/20
10^5	20/20	20/20	20/20	20/20
10^6	20/20	20/20	20/20	20/20
10^7	20/20	20/20	20/20	20/20

Kết quả cho thấy ngưỡng phát hiện của xét nghiệm là 10^2 bản sao/ μ L (với độ tin cậy 100% đối với serotype DEN-1, 100% DEN-2, 95% DEN-3, 95% DEN-4).

Để kiểm tra tính đặc hiệu của phản ứng, thực hiện quy trình 108 DENV Real-time PCR đa mỗi chẩn đoán và định type virus dengue với RNA người khỏe mạnh và RNA của các chủng virus phổ biến gây bệnh ở người bao gồm: FluA-H3, FluA-H1, FluB, hEV, HCV, virus Chikungunya. Theo đó, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần, kết quả được ghi nhận cho thấy không có sự bắt chéo nào với RNA người và các chủng virus khác (Hình 2).



Hình 2. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu quy trình 108 DENV Real-time PCR.
Tín hiệu huỳnh quang âm tính với cả 4 kênh màu FAM, HEX, TEXAD-RED, CY5.

3.2. So sánh kết quả giữa bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR với bộ sinh phẩm CDC DENV-1-4 Realtime RT-PCR Assay trên mẫu bệnh phẩm

Bảng 4 thể hiện kết quả xét nghiệm chẩn đoán nhiễm virus dengue trên 284 mẫu bệnh phẩm nhiễm sốt xuất huyết dengue (ở cả 3 mức độ bệnh). Sử dụng bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR tự

thiết kế có thể xác định 203/284 serotype (tỷ lệ dương tính 71,5%), trong khi bộ sinh phẩm CDC Hoa Kỳ phát hiện được 179/284 serotype (tỷ lệ dương tính 63%). Trong đó trên tổng số 155 mẫu có chẩn đoán nhiễm sốt xuất huyết dengue, 119 mẫu dương tính với virus dengue bằng bộ sinh phẩm DEN108 và 106 mẫu dương tính với virus dengue khi sử dụng bộ sinh phẩm CDC Hoa Kỳ (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả xét nghiệm chẩn đoán nhiễm virus dengue trên 284 mẫu bệnh phẩm của hai bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR và CDC DENV-1-4 Realtime RT-PCR Assay

Bộ sinh phẩm Kết quả phân độ SXHD	108 DENV Real-time PCR	CDC DENV-1-4 Realtime RT-PCR Assay
	Dương tính n (%)	Dương tính n (%)
SXHD (n = 155)	119 (76,8%)	106 (68,4%)
SXHDCDHCB (n = 118)	78 (66,1%)	68 (57,6%)
SXHDN (n = 11)	6 (54,5%)	5 (45,5%)
Tổng số (n = 284)	203 (71,5%)	179 (63%)

(SXHD: Sốt xuất huyết Dengue, SXHDCDHCB: Sốt xuất huyết dengue có dấu hiệu cảnh báo, SXHDN: Sốt xuất huyết dengue nặng).

Bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR định danh 65 mẫu thuộc serotype DENV-1; 97 mẫu thuộc serotype DENV-2; 0 mẫu thuộc serotype DENV-3; 2 mẫu thuộc serotype DENV-4; và 39 mẫu đồng nhiễm hơn 1 type (Bảng 5). Số mẫu đồng nhiễm chủ yếu của hai serotype dengue 1 và 2 ($21/39 = 53,8\%$). Sử dụng bộ sinh phẩm CDC Hoa Kỳ định type được lần lượt 69 serotype DENV-1; 97 DENV-2; 0 DENV-3; và 2 serotype DENV-4, số mẫu đồng nhiễm trên 1 type phát hiện bởi bộ kit CDC Hoa Kỳ là 11 mẫu trong đó

6/11 (54,5%) mẫu là đồng nhiễm của dengue 1 và 2 (Bảng 5).

Kết quả cũng cho thấy số lượng mẫu đồng thuận giữa hai bộ sinh phẩm là 56 mẫu serotype dengue 1, 70 mẫu cho serotype dengue 2. Cả hai bộ sinh phẩm đều thống nhất, không phát hiện có serotype dengue 3. Nhưng không có đồng thuận trong phát hiện serotype dengue 4. Phân tích thống kê cho thấy chỉ số đồng thuận Kappa đạt 0,6 ($p < 0,05$) chỉ ra sự đồng thuận trung bình giữa hai phương pháp.

Bảng 5. Kết quả định type dengue virus trên 284 mẫu bệnh phẩm bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR so với bộ sinh phẩm của CDC Hoa Kỳ

		CDC Hoa Kỳ						Tổng
		Âm tính	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Đồng nhiễm > 1 type	
108 DENV Real-time PCR	Âm tính	69	3	8	0	1	0	81
	DENV-1	7	56	0	0	0	2	65
	DENV-2	24	0	70	0	0	3	97
	DENV-3	0	0	0	0	0	0	0
	DENV-4	2	0	0	0	0	0	2
	Đồng nhiễm > 1 type	3	10	19	0	1	6	39
Tổng		105	69	97	0	2	11	284

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu thực hiện xây dựng phương pháp RT-qPCR đa mỗi chẩn đoán và xác định serotype virus dengue với thiết kế mỗi-đầu dò dựa chủ yếu vào trình tự các chủng virus dengue phân lập được tại Việt Nam. Kết quả khảo sát độ nhạy và độ đặc hiệu trên cả 4 serotype cho thấy phương pháp nghiên cứu xây dựng đạt ngưỡng phát hiện tại nồng độ 10^2 bản sao/ μ L (độ tin cậy 95%). Độ đặc hiệu đạt 100%, không dương tính chéo với RNA các chủng virus phổ biến bao gồm: FluA-H3, FluA-H1, FluB, hEV, HCV, virus Chikungunya.

Việt Nam là một trong số các quốc gia có dịch sốt xuất huyết thường xuyên và liên tục. Trong hai năm 2021 và năm 2022, nghiên cứu thu thập được 284 mẫu bệnh phẩm bệnh nhân chẩn đoán trên lâm sàng nhiễm sốt xuất huyết dengue ở 3 mức độ. Thời điểm lấy mẫu vào ngày đầu tiên nhập viện, đối với các trường hợp mà thời điểm nằm trong khoảng 3 đến 5 ngày sau khi khởi phát, nồng độ virus trong máu được giả thuyết là cao. Ngược lại, một số nghiên cứu cho thấy nồng độ virus trong máu giảm dần sau khi triệu chứng khởi phát, và có thể không phát hiện được sau khoảng một tuần ở nhiều bệnh nhân⁸. Theo số liệu của nghiên cứu này, có 17% số ca thuộc DENV-1; 25% thuộc DENV-2; 0 có ca nào thuộc DENV-3 và 1% thuộc DENV-4. Nhận thấy rằng hầu hết các ca gây bệnh chủ yếu là DENV-1 và DENV-2 trong 2 năm 2021 và 2022. Số liệu phù hợp với các số liệu đã được báo cáo trước đây chỉ ra DENV-2 đã gây ra vụ dịch sốt xuất huyết năm 2022 tại miền Nam, Việt Nam⁹. Các số liệu trước đây cho thấy DENV-3 genotype II là nguyên nhân chính gây ra các vụ dịch từ năm 1998 đến năm 2010¹⁰. Tuy vậy, DENV-3 đều không được báo cáo trong nghiên cứu này và các nghiên cứu gần đây. Nhóm nghiên cứu đưa ra giả thuyết serotype này có thể đã bị thay thế hoàn toàn bởi các serotype còn lại. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cho thấy vẫn có sự hiện diện của serotype DENV-4 trong hai năm 2021 và 2022. Trong một nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra sự xuất hiện với tỷ lệ thấp của serotype này trong những năm từ 2016 đến năm 2020⁴. Nhận thấy rằng DENV-1 và DENV-2 vẫn là hai chủng đặc hữu gây ra các vụ dịch tại Việt Nam trong một khoảng thời gian dài gần

đây. Do vậy, khi nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát tại nồng độ 50 bản sao/ μ L, quy trình xét nghiệm 108 DENV Real-time PCR đa mỗi phát hiện định type virus dengue có thể phát hiện được 20/20 (100%) lần với serotype DEN-1; 20/20 (100%) lần với serotype DEN-2; 19/20 (95%) lần với serotype DEN-3; 15/20 (75%) lần với serotype DEN-4. Nhóm nghiên cứu cho rằng, do tại Việt Nam và các nước Đông Nam Á, các serotype phổ biến lưu hành là type 1, type 2 và hiếm gặp đối với type 4; nên phương pháp hoàn toàn đáng tin cậy tại ngưỡng phát hiện 50 bản sao (với độ tin cậy 100% đối với serotype DEN-1, 100% DEN-2, 95% DEN-3, 75% DEN-4)

Khi so sánh với bộ sinh phẩm tham chiếu CDC Hoa Kỳ, kết quả thực hiện trên 284 mẫu bệnh phẩm cho thấy bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR có độ nhạy 71,2% cao hơn so với bộ sinh phẩm CDC Hoa Kỳ, với độ nhạy 63% (Bảng 4). Về phương diện định type, xác định serotype virus dengue trong các mẫu bệnh phẩm được chẩn đoán mắc sốt xuất huyết trên lâm sàng, hai bộ sinh phẩm có chỉ số đồng thuận Kappa đạt 0,6, ở mức trung bình. Hai bộ sinh phẩm có mức độ tương đồng trong định type dengue 1, dengue 2, và hoàn toàn có sự đồng nhất khi không có serotype dengue 3 nào được phát hiện. Nhưng ở serotype dengue 4 hai bộ kit cho kết quả không đồng nhất, tuy nhiên, số lượng serotype dengue 4 xác định được lại rất ít (1%) nên khó có thể đưa ra kết luận chính xác bộ sinh phẩm nào tốt hơn trong việc xác định serotype dengue 4. Để kiểm chứng thì phương pháp giải trình tự cần được thực hiện với các mẫu có sự không đồng nhất này. Kết quả nghiên cứu với bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR có 39/203 ca (19,2%) đồng nhiễm hai chủng tại một thời điểm, chủ yếu là sự kết hợp giữa DENV-1 và DENV-2. Các nghiên cứu khác trên thế giới cũng đã chỉ ra có xuất hiện hiện tượng nhiễm đồng thời hai serotype virus dengue trong cùng một vụ dịch, hai serotype đồng nhiễm chủ yếu là DENV-1 và DENV-2 (chiếm 57,5% số trường hợp¹¹) tỉ lệ này cũng tương đương với tỉ lệ xác định bởi bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR là 53,8%. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra có đến 15,3% trong tổng số các ca bị nhiễm đồng thời hai serotype tại cùng một thời điểm, trong đó DENV-1/DENV-2 chiếm tới 85%¹².

V. KẾT LUẬN

Bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR có độ nhạy kỹ thuật, độ đặc hiệu kỹ thuật cao, là cơ sở đảm bảo việc ứng dụng kỹ thuật real-time PCR với bộ sinh phẩm tự thiết kế cho chẩn đoán và định type virus dengue. Thực hiện chẩn đoán nhiễm virus dengue trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng cho thấy bộ sinh phẩm 108 DENV Real-time PCR có độ nhạy tốt, tương ứng với bộ sinh phẩm CDC Hoa Kỳ tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ et al (2013) *The global distribution and burden of dengue*. Nature 496(7446): 504-507.
2. Dwivedi VD, Tripathi IP, Tripathi RC, Bharadwaj S, Mishra SK (2017) *Genomics, proteomics and evolution of dengue virus*. Brief Funct Genomics 16(4): 217-227.
3. Hung TM, Clapham HE, Bettis AA et al (2018) *The Estimates of the Health and Economic Burden of dengue in Vietnam*. Trends Parasitol 34(10): 904-918. doi:10.1016/j.pt.2018.07.007.
4. Phadungsombat J, Vu HTT, Nguyen QT, Nguyen HTV, Nguyen HTN, Dang BT, Nakayama EE, Ishizaki A, Ichimura H, Shioda T, Pham TN (2023) *Molecular Characterization of dengue Virus Strains from the 2019–2020 Epidemic in Hanoi, Vietnam*. Microorganisms. 11(5):1267. doi: 10.3390/microorganisms11051267.
5. Vicente CR, Herlinger KH, Fröschl G, Romano CM, Cabidelle A de SA, Junior CC (2016) *Serotype influences on dengue severity: A cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitória, Brazil*. BMC Infect Dis 16(1): 1-7.
6. Rocha BAM, Guilarde AO, Argolo AFLT et al (2017) *Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil*. Infect Dis poverty 6(04): 73-83.
7. Centre for Disease Control and Prevention (2013) *CDC DENV-1-4 Real-Time RT-PCR assay for detection and serotype Identification of dengue virus The CDC real time RT-PCR Assay for dengue diagnosis*. Cdc. Published online:1-5.
8. Vuong NL, Ha Quyen NT, Hanh Tien NT et al (2024) *Dengue viremia kinetics and effects on platelet count and clinical outcomes: An analysis of 2340 patients from Vietnam*. Published online. doi:10.7554/elife.92606.2.
9. Nabeshima T, Ngwe Tun MM, Thuy NTT et al (2023) *An outbreak of a novel lineage of dengue virus 2 in Vietnam in 2022*. J Med Virol 95(11): 29255.
10. Nguyễn Đức Thuận, Đặng Thành Chung (2021) *Nghiên cứu Tỷ lệ type virus dengue ở bệnh nhân nhi trong một số đợt dịch tại khu vực miền Nam Việt Nam*. Tạp chí Y học Việt Nam 503(1). doi:10.51298/vmj.v503i1.695.
11. Senaratne UTN, Senaratne UTN, Murugananthan K et al (2020) *Dengue virus co-infections with multiple serotypes do not result in a different clinical outcome compared to mono-infections*. Epidemiol Infect. Published online :0-8. doi:10.1017/S0950268820000229.
12. Dhanoa A, Hassan SS, Ngim CF et al (2016) *Impact of dengue virus (DENV) co-infection on clinical manifestations, disease severity and laboratory parameters*. BMC Infect Dis 16: 1-14.