

Xây dựng quy trình realtime RT-PCR phát hiện Zika và Chikungunya

Establishing a novel realtime RT-PCR to detect Zika and Chikungunya viruses

Đào Thanh Quyên, Ngô Tất Trung, Bùi Tiến Sỹ,
Trần Thị Huyền Trang, Đào Phương Giang,
Trần Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Tĩnh,
Trần Thái Hà, Nguyễn Việt Hà, Trần Đức Anh,
Hồ Thị Hương, Phan Quốc Hoàn

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng quy trình realtime RT-PCR phát hiện Zika (ZIKV) và Chikungunya (CHIKV). **Đối tượng và phương pháp:** Mẫu chứng dương ZIKV do NIHE, CHIKV do Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) cung cấp và các virus khác được sử dụng trong nghiên cứu này. Để đánh giá ngưỡng phát hiện, độ nhạy kỹ thuật realtime RT-PCR, nghiên cứu sử dụng mẫu RNA chứng dương pha loãng từ 10^5 ÷ 10^0 copies/μl. Mồi và probe được thiết kế dựa trên trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen. Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá dựa trên khả năng không bắt chéo với các virus khác. Một phản ứng khuếch đại nội chuẩn để đánh giá hiệu quả tách chiết và hiệu suất khuếch đại của phản ứng realtime RT-PCR. **Kết quả:** Ngưỡng phát hiện ZIKV và CHIKV tương ứng 5 và 3 copies/μl tương đương 500 và 300 copies/ml. Độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng 95%, 100%. **Kết luận:** Đã thiết lập thành công quy trình realtime RT-PCR phát hiện virus Zika và Chikungunya với độ nhạy, độ đặc hiệu kỹ thuật cao.

Từ khóa: realtime RT-PCR, Zika virus, Chikungunya virus

Summary

Objective: To establish of a real-time RT-PCR method for the detection of Zika and Chikungunya viruses. **Subject and method:** This real-time RT-PCR-based method is for the amplification of target genes, using relevant negative, ZIKV and CHIKV controls that were provided by NIHE and WHO, respectively. Detection limits and sensitivity were determined by a range of spiking assays from 10^5 ÷ 10^0 copies/μl. **Result:** Our data demonstrated that the LOD of our newly developed method for detecting Zika virus and Chikungunya virus were 5 and 3 RNA copies/μl that are equal to 500 and 300 copies/ml. Specificity and sensitivity were 100 - 95%, respectively. **Conclusion:** A real-time RT-PCR assay for the detection of Zika virus and Chikungunya virus was successfully established.

Keywords: Realtime RT-PCR, Zika virus, Chikungunya virus.

Ngày nhận bài: 23/12/2020, ngày chấp nhận đăng: 25/12/2020

Người phản hồi: Phan Quốc Hoàn, Email: drhoan108@gmail.com - Bệnh viện TWQĐ 108

1. Đặt vấn đề

Virus Zika (*ZIKV*) thuộc chi *Flavivirus*, họ *Flaviviridae* được phân lập và mô tả lần đầu tiên vào năm 1947 từ khỉ Rhesus sống trong rừng nhiệt đới cùng tên Zika tại Uganda [1]. Virus này lây lan qua trung gian muỗi và thường gây nhiễm trùng nhẹ ở người lớn như sốt, đau khớp, phát ban. Tuy nhiên, cũng có thể gây nên những biến chứng nghiêm trọng như hội chứng Guillain-Barré, viêm màng não, mất thính giác và viêm màng bồ đào. Hiện tại, việc bùng phát virus này cho thấy nó là liên quan tới dị tật thai nhi ở những bà mẹ đang mang thai nhiễm virus Zika [2]. Một loại khác cũng lây truyền qua muỗi là virus Chikungunya (*CHIKV*), một anphavirus thuộc họ *Togaviridae*, được phân lập đầu tiên trên người năm 1952 tại Tanzania [3]. Chủ yếu lây truyền sang người bởi 2 loài muỗi *Aedes aegypti* và *Aedes albopictus*. Cũng giống *ZIKV*, các triệu chứng thường nhẹ, xuất hiện sau thời gian ủ bệnh từ 2 - 7 ngày. Các triệu chứng biến mất trong vòng một tuần sau đó, tuy nhiên, đau khớp có thể tồn tại ở một số bệnh nhân cho đến một vài năm sau [3, 4]. Hai virus này thường xuất hiện cùng ở một vùng địa lý và gây ra triệu chứng bệnh tương tự nhau, do đó việc chẩn đoán phân biệt hai tác nhân gặp khó khăn. Thêm vào đó, xét nghiệm huyết thanh học có thể gặp khó khăn do gặp phải phản ứng chéo giữa các loài flavivirus khác hay đối với virus Chikungunya chỉ được phát hiện ở ngày 2 hoặc 3 cho tới ngày thứ 15 sau khi bệnh nhân có biểu hiện sốt [5]. Để tăng hiệu quả chẩn đoán, phương pháp realtime RT-PCR được sử dụng ưu tiên hơn cả với nhiều ưu điểm như giai đoạn chẩn đoán sớm từ ngày 0 với virus *CHIKV* hay nguy cơ nhiễm chéo thấp, độ nhạy và độ đặc hiệu cao và có thể định lượng được nồng độ virus. Do đó, nghiên cứu này thực hiện với mục tiêu: *Tối ưu hóa điều kiện realtime RT-PCR chẩn đoán virus ZIKV và CHIKV*.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Nhóm chứng dương: Sử dụng các mẫu RNA chủng *ZIKV* từ NIHE và *CHIKV* do WHO cung cấp. uncRNA chứng dương được tổng hợp

invitro từ plasmid pIDTBlue mang đầy đủ đoạn gen đích liên kết với vùng T7 promotor.

Nhóm chứng âm: Nhằm kiểm tra độ đặc hiệu của các bộ mồi thiết kế, đề tài sử dụng các mẫu RNA được tách chiết từ các virus khác như Dengue (*DENV*), cúm A, virus viêm gan E (*HEV*), viêm gan C (*HCV*), HIV.

2.2. Nguyên vật liệu và thiết bị sử dụng

Các hoá chất: 108@Uzol, ethanol 70%, isopropanol, chloroform, enzyme phiên mã ngược reverse transcriptase Fermentas - Mỹ, Master-Mix QuanTitech probe Realtime PCR.

Các trang thiết bị thường quy của xét nghiệm sinh học phân tử: Tủ an toàn sinh học cấp 2, máy ly tâm, máy phân tích real-time PCR- Cyclor 7500 Fast-Real-Time-PCR System, Applied Biosystems, CFX96-Biorad.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Thiết kế mồi và mẫu dò

Các cặp mồi đơn được thiết kế bắt cặp đặc hiệu vào các khu vực bảo tồn cao cho mỗi loài như các gen mã hóa cho protein độc tố đặc trưng của loài. Các cặp mồi không bắt cặp chéo với nhau (khi thực hiện phản ứng realtime RT-PCR cho nội chuẩn).

Cấu trúc gen *ZIKV* gồm sợi đơn RNA dài khoảng 10,794bp với hai vùng không mã hóa là 5' và 3' NCR (non-coding regions). Bao gồm các protein C (capsid), màng tiền thân (prM), vỏ (E), và các protein không cấu trúc khác (NS1-NS5). Các protein không cấu trúc NS1, NS3, và NS5 là những protein kích thước lớn và có tính bảo tồn cao trong khi protein NS2A, NS2B, NS4A và NS4B là những protein nhỏ hơn và kỵ nước.

CHIKV là một virus có vỏ, đường kính virion khoảng 70nm và có hệ gen là đoạn RNA sợi đơn, dương, dài khoảng 11,8kb [7]. Bộ gen bao gồm đầu 5' vùng methyl hóa không dịch mã (UTR), tiếp theo là đoạn RNA mã hóa cho 4 protein không cấu trúc (NsP1-4) và 5 protein cấu trúc (C-E3-E2-6K-E1), và đầu 3' là đuôi poly-A. Trong nghiên cứu này, có hai bộ mồi được thiết kế đặc hiệu cho target là virus Zika và virus

Chikungunia. Một bộ mồi nội chuẩn Rnase P được sử dụng kiểm soát quá trình tách chiết và hoạt động của enzyme phiên mã ngược. Chúng tôi sử dụng phần mềm tin sinh học VectorNTI 10.0 để thiết kế mồi và mẫu dò. Virus Zika được thiết kế vào vùng vỏ gen NS2b (trình tự mồi xuôi: 5'-

TGATGACCATCTGTGGCATGAACCCAATAGC
CAATAGCC-3'; mồi ngược: 5'-
AGGCACATCCCATAGA
GCACCACTCCTTTTTC-3'; mẫu dò: FAM-
CCACGCTCCAGCTGCAAAGGTAC-BHQ-3').

Mồi/probe virus Chikungunia được thiết kế vào vùng vỏ gen E1 (mồi xuôi: 5'-GACCATGCCGTCACAGTTAAG-3'; mồi ngược: 5'-CAGTACCAGTTGTGTATTAGC-3'; mẫu dò: 5'-FAM-TCGCCAAATTGTCCTGGTCTTCC-BHQ1-3'. Mồi/probe nội chuẩn được sử dụng theo CDC RnaseP, nhóm nghiên cứu đổi kênh màu để phù hợp với thí nghiệm: (Mồi xuôi: 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'; mồi ngược: 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'; probe: 5'-HEX - TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG - BHQ-1-3') [6].

2.3.2. Tối ưu điều kiện phản ứng và đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu kỹ thuật realtime RT-PCR

Mẫu ARN tách chiết được đo nồng độ và độ sạch ở bước sóng A280, tỷ lệ độ sạch A260/A280 trong khoảng 1,9 - 2,1. Nồng độ ARN sử dụng 5 - 10ng/phản ứng phiên mã ngược RT-PCR.

Do trong nghiên cứu sử dụng Mater mix Qiagen đã được hãng tối ưu nồng độ đệm. Do đó, nghiên cứu tập trung vào tối ưu hai yếu tố về nồng độ và nhiệt độ gắn mồi. Nồng độ mồi được của ZIKV và CHIKV được khảo sát trong khoảng 100 - 600mM/phản ứng, nồng độ Probe được tối ưu sao cho giá trị dRn đạt mức cao.

Trái với mục tiêu khuếch đại gen đích của hai virus trên, việc tối ưu nồng độ mồi/probe của nội

chuẩn được hướng tới việc nồng độ tối thiểu cần sử dụng để đạt mục tiêu khuếch đại được gen nội chuẩn tốt mà không ảnh hưởng tới tín hiệu của gen đích.

Nhiệt độ gắn mồi thích hợp dựa vào khoảng biến thiên của nhiệt độ Tm mồi lý thuyết $\pm 3^{\circ}\text{C}$, với trình tự mồi ở trên Tm được tính là $60 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Tất cả cả thử nghiệm này được đánh giá trên cùng một nồng độ chứng dương [7].

Độ nhạy chẩn đoán được tính toán dựa vào panel mẫu chuẩn đánh giá độ nhạy là 20 mẫu chứng dương và panel mẫu chuẩn đánh giá độ đặc hiệu là 20 mẫu RNA tách từ các mẫu lâm sàng trên bệnh nhân nhiễm cúm A, Dengue, HIV, HCV. Mẫu chứng dương và bệnh phẩm được tách chiết RNA bằng dung dịch 108@Uzol và Kit Qiagen Viral Mini Kit (Qia, Germany). Thử nghiệm tách chiết 200 μl mẫu, thời gian trong 100 μl water RNA/DNA free.

Để xác định được ngưỡng phát hiện (LOD) kỹ thuật, sử dụng mẫu RNA từ chủng. Cách tính số bản sao RNA được tính theo công thức tính của QIAGEN [8].

$$\text{RNAcopies}/\mu\text{l} = \frac{6,022 \times 10^3 [\text{copies}/\text{mol}] \times \text{concentration} [\text{g}/\mu\text{lRNA}]}{\text{MV} [\text{g}/\text{mol}]}$$

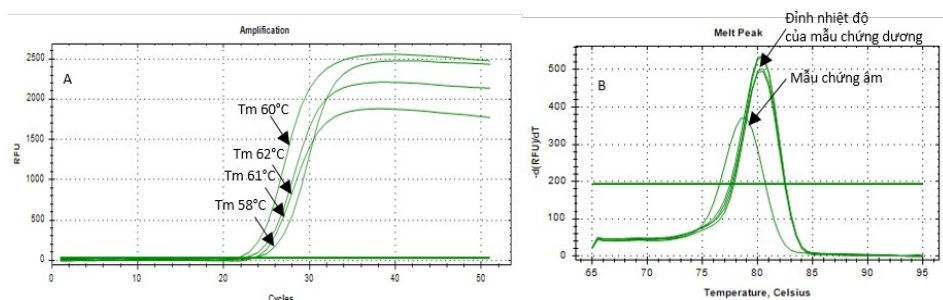
Độ nhạy kỹ thuật được đánh giá trên dải pha loãng từ 10^5 ÷ 10^0 copies, trong đó từ 10^1 copies/ μl chúng tôi pha loãng thành 5 copies, 3 copies và 1 copies/ μl . Giới hạn phát hiện là nồng độ pha loãng thấp nhất cho kết quả dương tính trên 95% mẫu chạy.

2.4. Xử lý và phân tích số liệu

Nghiên cứu sử dụng phần mềm Vector NTI 10.0 để phân tích đa hình kiểu gen từ các trình tự trên ngân hàng gen của các chủng ZIKV và CHIKV. Sử dụng phần mềm SPSS 16.0 phân tích các chỉ số kỹ thuật.

3. Kết quả

3.1. Kết quả tối ưu nhiệt độ phản ứng realtime PCR và mồi nội chuẩn

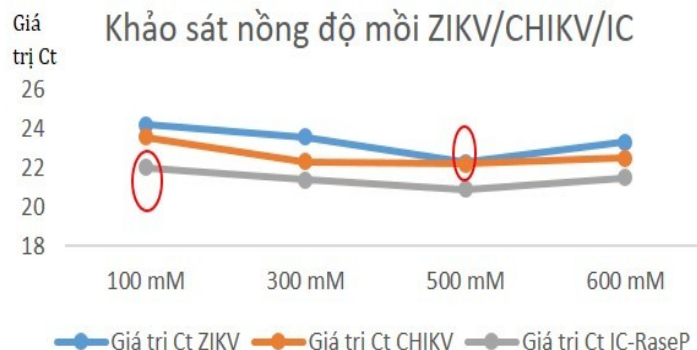


Hình 1. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi của phản ứng realtime PCR phát hiện *ZIKV* kết hợp với mồi nội chuẩn

Việc khảo sát nhiệt độ gắn mồi dựa trên dải nhiệt độ tính toán lý thuyết là $60 \pm 3^\circ\text{C}$. Kết quả cho thấy tín hiệu khuếch đại cho gen đích ở các dải nhiệt độ khảo sát đều lên tốt và đạt giá trị Ct tốt nhất ở nhiệt độ 60°C (Hình A); Các đỉnh Melting curve chứng tỏ việc khuếch đại PCR là đặc hiệu (Hình B).

3.2. Kết quả tối ưu nồng độ mồi, probe sử dụng

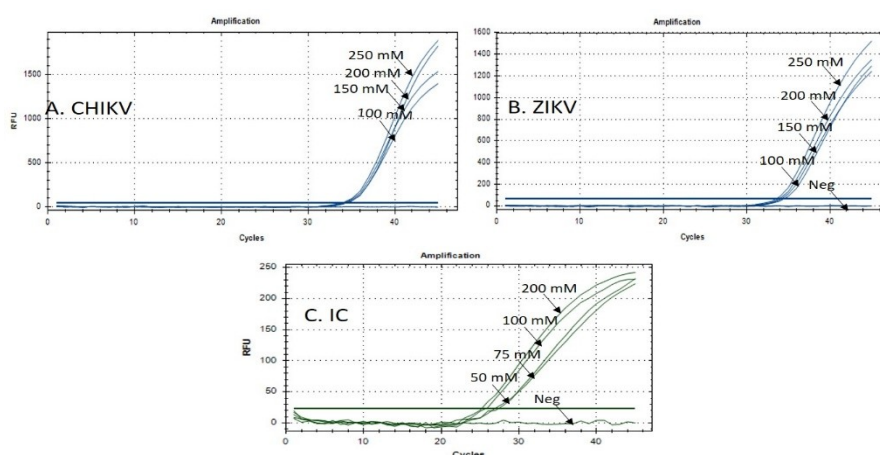
Theo hướng dẫn (Morrison, 2010), để tối ưu nồng độ mồi sử dụng cho phản ứng realtime PCR, khoảng nồng độ khuyến cáo từ 50 - 600nM. Nồng độ mồi được lựa chọn đảm bảo hai yêu cầu: Nồng độ không được quá cao dẫn tới dư thừa nguyên liệu là tạo primer dimer và đảm bảo giá trị Ct đạt được thấp nhất. Trái lại, việc tối ưu khuếch đại chứng nội IC, nhóm nghiên cứu sẽ thực hiện nồng độ mồi/probe sử dụng phải nhỏ nhất để đảm bảo tín hiệu nội chuẩn được khuếch đại mà không cạnh tranh nguyên liệu với *ZIKV* hoặc *CHIKV*. Kết quả cụ thể như sau:



Hình 2. Kết quả lựa chọn nồng độ mồi realtime PCR phát hiện đơn gen đích của *ZIKV* và mồi nội chuẩn

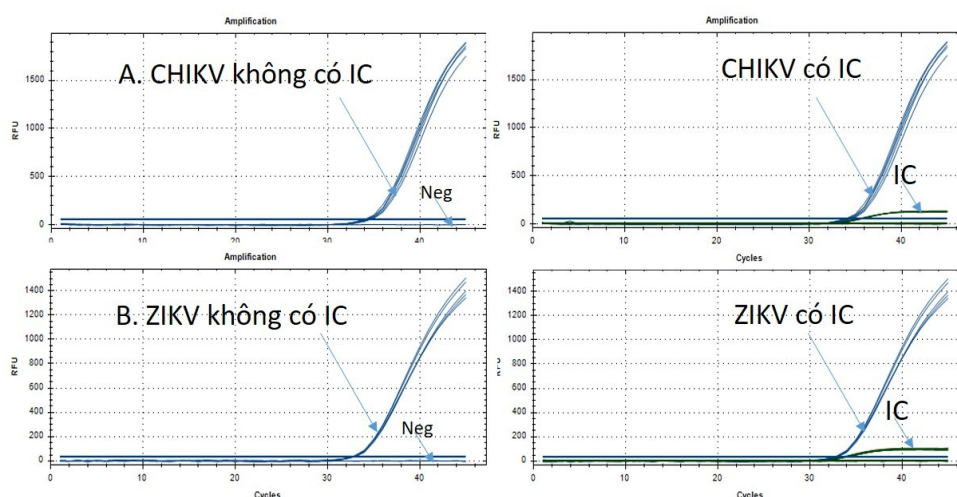
Nhận xét: Biểu đồ trên cho thấy, ở nồng độ 500mM giá trị Ct lên thấp nhất ở cả hai *ZIKV* và *CHIKV*. Đối với nội chuẩn, nồng độ 100mM là giá trị thích hợp đảm bảo cho tín hiệu nội chuẩn.

Tiếp theo, nhóm nghiên cứu tiến hành tối ưu nồng độ probe sao cho dRn đạt giá trị cao nhất, kết quả cho thấy, ở nồng độ 250mM là điều kiện tối ưu cho *ZIKV* và *CHIKV*, nồng độ probe cho IC là 100mM. Cụ thể hình dưới đây:



Hình 3. Kết quả xác định nồng độ probe cho phản ứng phát hiện *ZIKV* và nội chuẩn

Sau khi tìm được nồng độ môi/probe thích hợp, thực hiện trộn các môi và probe để nồng độ cuối cùng đạt như trên theo cặp (*ZIKV*, IC) và (*CHIKV*, IC) để đánh giá mức độ ảnh hưởng của môi IC với Target, kết quả như sau:

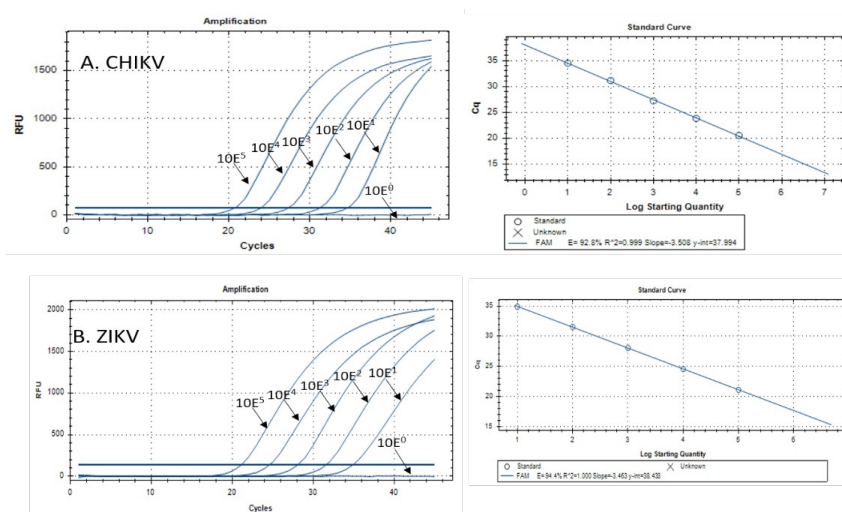


Hình 4. Kết quả realtime PCR của hỗn hợp môi/probe của *ZIKV* kết hợp với nội chuẩn.

Như vậy, điều kiện tối ưu khuếch đại phản ứng realtime PCR trong nghiên cứu này là: Sử dụng 5μl RNA/phản ứng phiên mã ngược RT-PCR; sử dụng 5μl cDNA cho phản ứng realtime PCR. Trong điều kiện nhiệt độ 95°C, 15 phút; (95°C, 15 giây; 60°C, 60 giây) × 45 chu kỳ. Nồng độ môi, probe cho *ZIKV/CHIKV* tương ứng 500mM, 250mM. Phản ứng kết hợp nội chuẩn không ảnh hưởng tới hiệu suất phản ứng khuếch đại virus nhưng vẫn đảm bảo tín hiệu nội chuẩn.

3.3. Kết quả xác định ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu kỹ thuật

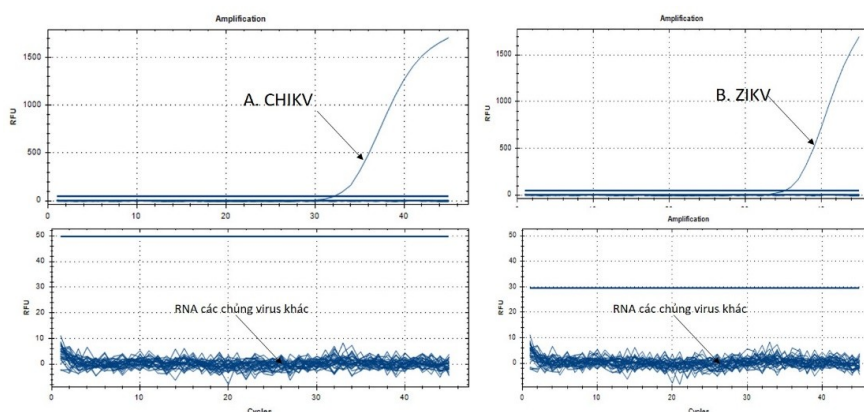
Nồng độ OD virus được xác định bằng máy nanodrop với giá trị *ZIKV* (35ng/μl) và *CHIKV* (38,25ng/μl). Từ công thức trên đo được số bản copy RNA, tiến hành pha loãng theo dải 10^5 – 10^0 copies/μl.



Hình 5. Kết quả realtime PCR trên các dải pha loãng 10^5 – 10^0 copies RNA ZIKV và CHIKV

Nhận xét: Kết quả cho thấy, ở ngưỡng 10^0 copies RNA/ μ l ZIKV, CHIKV kỹ thuật có thể phát hiện được. LOD được ước tính bằng khả năng phát hiện nồng độ tối thiểu mà kỹ thuật có thể phát hiện được với độ tin cậy 95% bằng cách lặp lại 20 lần với một dải nồng độ quanh ngưỡng phát hiện. Theo công thức $LOD = \text{mean} + 3SD$ cho thấy: LOD ZIKV đạt 5,0 copies RNA/ μ l (95%, $1 \div 10$) tương đương 500 copies/ml; LOD CHIKV đạt 3 copies RNA/ μ l (95%, $1 \div 10$) tương đương 300 copies/ml.

Độ đặc hiệu kỹ thuật được đánh giá dựa trên khả năng bắt chéo không đặc hiệu với các virus RNA 8 mẫu mỗi loại virus cúm A, HEV, HCV, DENV, HIV. Kết quả cho thấy, các mẫu RNA virus khác đều không có tín hiệu khuếch đại với độ đặc hiệu đạt 100%. Kết quả cho thấy các bộ môi chúng tôi thiết kế có độ đặc hiệu cao, không nhầm lẫn với các mầm bệnh khác cũng như RNA của bộ gen người. Hình ảnh minh họa dưới đây:



Hình 6. Kết quả realtime PCR mỗi ZIKV/CHIKV trên các virus khác

Nhận xét: Qua kết quả cho thấy không có kết quả dương tính giả nào được ghi nhận trên các bệnh phẩm thử nghiệm.

4. Bàn luận

Để thiết lập được quy trình realtime RT-PCR trước hết chúng tôi phải tối ưu các điều kiện như nồng độ môi, nhiệt độ. Kết quả cho thấy khi thử nghiệm realtime PCR các tín hiệu huỳnh quang đẹp, rõ nét, dRn cao. Việc đánh giá độ nhạy,

ngưỡng phát hiện được tiến hành trên các dải RNA pha loãng được tách chiết từ chủng. Kết quả cho thấy kỹ thuật có độ nhạy cao, xây dựng đường chuẩn cho hiệu suất phản ứng cao *CHIKV* ($R^2 = 0,999$), *ZIKV* ($R^2 = 1$). Giá trị LOD của *ZIKV* và *CHIKV* là (5 và 3 copies/ μ l) tương ứng 500 và 300 copies/ml. Kết quả của nghiên cứu tương đương với nghiên cứu của Corman và cộng sự (2016) với LOD (2,1 copies/ μ l) [9]. So sánh với nghiên cứu của Wang SM và cộng sự, 2016 với độ nhạy LOD đạt 3,5 RNA copies/ μ l và giá trị $R^2 = 0,0992$ [10]. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu đạt 100%, không có sự bắt chéo không đặc hiệu nào giữa mỗi phát hiện *ZIKV* hay *CHIKV* với các virus khác như DENV, cúm A, HEV, HCV, HIV, nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả của nhóm tác giả Wang SM (2016) [10].

Việc bổ sung nội chuẩn được chú trọng, nhằm kiểm soát chất lượng RNA tách chiết. Dựa trên trình tự gen *RaseP* của CDC, nhóm nghiên cứu đã thiết lập phản ứng đa mục đích kết hợp mục đích và nội chuẩn, giá trị C_t nội chuẩn mẫu trong khoảng $25 \leq C_{t_{ic}} \leq 36$ là khoảng chấp nhận được.

5. Kết luận

Phương pháp realtime RT-PCR phát hiện *ZIKV* và *CHIKV* đã được thiết lập thành công với ngưỡng phát hiện tương ứng là 5 và 3 copies/ μ l. Độ nhạy $\geq 95\%$, độ đặc hiệu đạt 100%.

Lời cảm ơn

Công trình này được tài trợ kinh phí bởi Đề tài Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp Quốc gia do Bộ Khoa học và Công nghệ chủ quản, tên đề tài: "Nghiên cứu chế tạo bộ sinh phẩm chẩn đoán vi rút Zika và Chikungunya". Mã số: KC.10.21/16-20 do Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược lâm sàng 108 chủ trì.

Tài liệu tham khảo

1. GW D (1952) *Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties*. Trans R Soc Trop Med Hyg 46(5): 521-534.
2. Brasil P et al (2016) *Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro*. N Engl J Med 375(24): 2321-2334.
3. Lyle RP, Ann MP and Margaret AH (2016) *Zika virus*. N Engl J Med 374: 1552-1563.
4. Miner JJ, Diamond MS (2017) *Zika virus pathogenesis and tissue tropism*. Cell Host Microbe 21(2): 134-142.
5. Charrel RN et al (2016) *Background review for diagnostic test development for Zika virus infection*. Bull World Health Organ 94(8): 574-584.
6. Ngaosuwanikul N et al (2010) *Influenza A viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses*. Virol J 7: 75.
7. Morrison LE (2010) *Basic principles of fluorescence and energy transfer applied to real-time PCR*. Mol Biotechnol 44(2): 168-176.
8. QIAGEN, QuantiFast SYBR Green PCR Handbook (2014) *For fast, quantitative, real-time PCR and two-step RT-PCR using SYBR Green*. QIAGEN 44.
9. Corman VM et al (2016) *Assay optimization for molecular detection of Zika virus*. Bull World Health Organ 94(12): 880-892.
10. Wang SM et al (2016) *Detection and quantification of Chikungunya virus by Real-time RT-PCR assay*. Methods Mol Biol 1426: 105-117.