

Xét nghiệm RNA virus Zika trong mẫu bệnh nhân sốt xuất huyết tại tỉnh Tây Ninh

Nguyễn Hà Thúy Diễm^{1*}, Nguyễn Thị Dung², Lương Thị Mơ²,
Nguyễn Thị Nga³ và Lê Thị Hồng¹

¹Phòng khám Đa khoa Bình An

²Chi nhánh phía Nam, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

³Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Bệnh sốt do virus Zika là bệnh truyền nhiễm virus cấp tính và được lan truyền thông qua vết đốt của muỗi vằn *Aedes aegypti* và *Aedes albopictus*. Hiện nay, nhiễm virus Zika không còn là sự kiện y tế cộng đồng khẩn cấp gây quan ngại quốc tế nhưng những hậu quả do nhiễm virus Zika vẫn là một thách thức y tế cộng đồng. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá sự lưu hành của virus Zika trong bệnh nhân bị sốt chưa rõ nguyên nhân đến thăm khám, điều trị tại Bệnh viện tỉnh Tây Ninh năm 2022 - 2023. Phân tích tổng 484 mẫu bằng phương pháp realtime RT-PCR sử dụng enzyme SuperScript IV RT. Mẫu chứng dương là chủng virus ZIKV đã được phân lập bất hoạt. Mồi và Probe được sử dụng theo quy trình Bộ Y tế. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ nhiễm virus Zika tập trung nhiều nhất ở độ tuổi 15 - 60 là 55.11% (46/90). Huyện Tân Châu chiếm tỷ lệ dương tính nhiều hơn với 21.69%.

Từ khóa: Zika virus, RT-Realtime PCR, muỗi *Aedes*, Tây Ninh

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Zika (ZIKV) được phát hiện và phân lập lần đầu tiên từ khỉ Rhesus ở rừng Zika (Uganda) vào năm 1947 và phân lập trên người vào năm 1968, bùng phát thành dịch năm 2007 trên đảo Yap, Liên bang Micronesia. ZIKV là nguyên nhân của hội chứng Zika bẩm sinh (Congenital Zika syndrome – CZS), bao gồm dị tật đầu nhỏ, các bất thường về thị giác, xơ hóa cơ, suy giảm thính lực và các rối loạn chức năng hệ thần kinh trung ương khi phơi nhiễm với ZIKV trong bào thai [1-4]. Trong vụ dịch Zika tại Châu Mỹ Latinh và Nam Mỹ vào năm 2015 – 2016, có sự gia tăng trẻ có các dị tật (mù, nghe kém, giảm trương lực cơ, động kinh và chậm phát triển tâm thần vận động sau khi sinh ra từ mẹ nhiễm ZIKV [5]. Tháng 2 - 2016, Tổ chức Y tế Thế giới tuyên bố lây nhiễm Zika là vấn đề y tế khẩn cấp trong cộng đồng quốc tế [6]. Đến tháng 8 năm 2016 đã có 70 quốc gia và vùng lãnh thổ đã báo cáo bằng chứng của muỗi truyền virus Zika từ năm 2007. Đường lây

truyền Zika được xác nhận là vector trung gian muỗi vằn *A. aegypti* và *A. albopictus*, có thể qua quan hệ tình dục [7]. Trong khi các triệu chứng lây nhiễm Zika thầm lặng hoặc có thể bệnh giống sốt Dengue, các bằng chứng Zika gây biến chứng nghiêm trọng đến hệ thần kinh trung ương ở thai nhi/trẻ sơ sinh (bệnh đầu nhỏ, microcephaly), triệu chứng Guillain-Barré ở người trưởng thành và tế bào gốc vạn năng thần kinh của người được công bố với các bằng chứng khoa học tin cậy [8, 9, 10].

Cuối tháng 3/2016, Việt Nam ghi nhận trường hợp thai phụ nhiễm ZIKV lúc thai 8 tuần, với thai bị lưu sau 2 ngày có chẩn đoán nhiễm ZIKV [11]. Trong giai đoạn năm 2016 - 2017, khoảng 90% số ca mắc ZIKV của cả nước tập trung tại khu vực ở phía Nam, có 60 - 80% ca nhiễm bệnh không biểu hiện triệu chứng lâm sàng, chưa có thuốc điều trị và vaccine phòng bệnh đặc hiệu [12]. Tây Ninh là tỉnh có 2 cửa khẩu, mỗi ngày

Tác giả liên hệ: CN. Nguyễn Hà Thúy Diễm

Email: diemnht194@gmail.com

tiếp nhận hơn 2,000 khách quốc tế nhập cảnh vào Việt Nam, trong đó, có nhiều khách nhập cảnh từ vùng có dịch bệnh. Vì vậy, để góp phần cung cấp bằng chứng cho công tác phòng ngừa và kiểm soát sự lan truyền của dịch bệnh, chúng tôi tiến hành đề tài: “Xét nghiệm RNA virus Zika trong mẫu bệnh nhân sốt xuất huyết tại tỉnh Tây Ninh”.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Từ tháng 8/2022 đến tháng 8/2023, thu thập mẫu huyết tương của bệnh nhân có triệu chứng sốt xuất huyết và sốt chưa rõ nguyên nhân đến thăm khám và điều trị tại Bệnh viện tỉnh Tây Ninh.

- Tiêu chuẩn chọn mẫu

Mẫu bệnh phẩm đã tách chiết RNA, được lưu tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga ở -70 °C.

- Tiêu chuẩn loại trừ

Lượng mẫu còn quá ít sau khi phân tích, không được bảo quản ở -70 °C.

Mẫu được rửa đông trên 1 lần.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Các phường xã có ca bệnh sốt không rõ nguyên nhân đến khám tại các Bệnh viện tỉnh Tây Ninh năm 2022 - 2023. Huyện Tân Châu có 12 phường xã được chọn nghiên cứu, huyện Tân Biên có 8 phường xã được chọn nghiên cứu.

2.3. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.4. Cỡ mẫu nghiên cứu

Trung bình 20 - 40 hộ gia đình/phường, xã.

2.5. Phương pháp chọn mẫu

Tại mỗi phường xã thu thập mẫu huyết thanh của người sốt xuất huyết, sốt không rõ nguyên nhân.

Thời gian thu thập từ 8/2022 - 8/2023, mẫu thu thập được tách huyết thanh và bảo quản lạnh để vận chuyển về phòng thí nghiệm trong ngày. Tại phòng thí nghiệm, mẫu được bảo quản -70 °C cho đến khi tiến hành phân tích.

2.6. Nguyên liệu và thiết bị sử dụng

2.6.1. Hóa chất

Kit tách chiết RNA của RiboPrep.

Kit One-step RT-PCR của Invitrogen.

Hóa chất đo nồng độ RNA trên thiết bị Qubit.

Ethanol (96 - 100%), nuclease free water.

2.6.2. Thiết bị

Các trang thiết bị thường quy của xét nghiệm sinh học phân tử: Tủ an toàn sinh học cấp 2, máy ly tâm HermLer, Heitteich, máy phân tích real-time PCR Biorad CFX96, Qiaquant 95, máy minispin và vortex F24 (Bioson), pipet điện tử (Mettler Toledo).

2.7. Phương pháp

RNA tổng số được tách chiết từ 100µL mẫu huyết thanh sử dụng sinh phẩm RiboPrep (Liên Bang Nga), quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, cho 50µL dung dịch chứa RNA được thu hồi vào bảo quản ở -70°C phục vụ nghiên cứu.

Primer và probe được thiết kế dựa trên trình tự hướng dẫn của Bộ Y tế, trình tự primer và probe như sau:

Bảng 1. Trình tự các cặp Primer và probe chẩn đoán ZIKV

Primer và probe		Trình tự (5'-3')	Nồng độ
Mỗi nhóm chung	Zika1087	CCG CTG CCC AAC ACA AG	100µM
	Zika1163c	CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT	100µM
	Zika1108FAM	FAM -AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A-BHQ1	10µM
Mỗi nhóm Asian	Zika4481	CTG TGG CAT GAA CCCAAT AG	100µM
	Zika4552c	ATC CCA TAG AGC ACC ACT CC	100µM

Primer và probe		Trình tự (5'-3')	Nồng độ
Mỗi nhóm Asian	Zika4507c	FAM-CCA CGC TCC AGC TGC AAA GG-BHQ1	10µM

Ghi chú: Độ nhạy của primers phát hiện zika được tính là không được bắt cặp với DENV1- 4, virus Tây sông Nile (WNV), viêm não [13].

Để xác định RNA virus Zika trong mẫu nghiên cứu, RNA tổng số được phiên mã ngược trong quy

trình realtime RT-PCR một bước, bao gồm các thành phần như sau:

Bảng 2. Thành phần pha sinh phẩm cho phản ứng realtime RT-PCT

Thành phần	Thể tích, µL
PCR - mix-1	12.5
SuperScript IV	0.5
Primer F	0.2
Primer R	0.2
Probe	0.25
Khuôn RNA	5
Tổng thể tích	25

phẩm. Chương trình nhiệt của phản ứng 50°C - 30 phút, 95°C - 2 phút, 45 chu kỳ của 95°C - 15 giây, 60°C - 1 phút, tín hiệu huỳnh quang xác định sau mỗi chu kỳ ở 60°C tại kênh FAM. Những mẫu có giá trị Ct nhỏ hơn 45 được xác định là dương tính.

2.7.1. Xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu được nhập liệu và phân tích bằng phần mềm Excel.

2.7.2. Đạo đức nghiên cứu

Đối tượng được cung cấp thông tin về mục đích và ý nghĩa của nghiên cứu. Đối tượng hoàn toàn tự nguyện tham gia nghiên cứu, và có thể từ chối bất kì câu hỏi nào và ngừng tham gia nghiên cứu ở mọi thời điểm.

Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị và chia đều vào mỗi ống PCR (0.2 mL) 20µL, trong mỗi phản ứng bổ sung 5µL khuôn RNA, mẫu đối chứng âm sử dụng 5µL nước khử ion, đối chứng kèm theo bộ sinh

3. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm của các ca bệnh

Bảng 3. Đặc điểm của các ca bệnh

Địa điểm nghiên cứu	Số lượng mẫu	Giới tính		Lứa tuổi		
		Nam	Nữ	Dưới 15T	Từ 15 đến 60T	Trên 60T
Huyện Tân Châu	355	174	181	179	119	58
Huyện Tân Biên	129	65	64	61	58	10
Tổng số mẫu	484	239	245	239	177	68

Nhận xét: Trong 484 người bệnh tham gia nghiên cứu, có 49.38% (239/484) là nam giới, nữ giới chiếm 50.62% (245/484).

3.2. Tỷ lệ mẫu dương tính với virus Zika

Bảng 4. Tỷ lệ mẫu dương tính Virus Zika

Địa điểm lấy mẫu	Mẫu dương tính		Giới tính		Lứa tuổi		
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Nam	Nữ	Dưới 15T	Từ 15 đến 60T	Trên 60T
Huyện Tân Châu	77	21.69	41	36	27	41	9

Địa điểm lấy mẫu	Mẫu dương tính		Giới tính		Lứa tuổi		
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Nam	Nữ	Dưới 15T	Từ 15 đến 60T	Trên 60T
Huyện Tân Biên	13	10.08	6	7	7	5	1
Tổng số mẫu	90	31.77	47	43	34	46	10

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu: Trong số 484 người bệnh tham gia nghiên cứu, có 90/484 người bệnh dương tính với virus ZIKV, chiếm tỷ lệ 31.77%. Trong đó, huyện Tân Châu có số người bệnh dương tính chiếm 21.69% (77/355), huyện Tân Biên chiếm 10.08% (13/129).

Trong 90 ca bệnh dương tính, nam giới chiếm 52.22% (47/90) nữ giới chiếm 47.78% (43/90). Đa số người bệnh dương tính được phân bố nhiều nhất ở độ tuổi từ 15 - 60 chiếm 51.11%, các độ tuổi dưới 15 và trên 60 tuổi chiếm tỷ lệ tương ứng là 37.78% và 11.11%.

3.3. Tỷ lệ mẫu dương tính virus Zika theo địa phương

Bảng 5. Mẫu dương tính với virus Zika ở từng xã thuộc huyện Tân Châu

STT	Xã	ZIKV	Tỷ lệ (%)
1	Suối Dây	4	1.13
2	Suối Ngô	9	2.54
3	Tân Đông	13	3.66
4	Tân Hà	4	1.13
5	Tân Hiệp	3	0.85
6	Tân Hòa	3	0.85
7	Tân Hội	5	1.4
8	Tân Hưng	2	0.56
9	Tân Phú	6	1.69
10	Tân Thành	5	1.41
11	Thanh Đông	12	3.38
12	Thị trấn Tân Châu	11	3.10
Tổng mẫu		77	21.69

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm virus ZIKV có sự phân bố khác nhau giữa các địa phương của huyện Tân Châu. Số ca nhiễm ZIKV có sự phân bố cao ở xã Thanh Đông, Tân Đông, thị trấn Tân Châu.

Bảng 6. Mẫu dương tính với virus Zika ở từng xã thuộc huyện Tân Biên

STT	Xã	ZIKV	Tỷ lệ (%)
1	Hòa Hiệp	1	0.78
2	Mỏ Công	0	00
3	Tân Bình	1	0.78
4	Tân Lập	2	1.55

STT	Xã	ZIKV	Tỷ lệ (%)
5	Tân Phong	0	00
6	Thạnh Bình	2	1.55
7	Thạnh Tây	2	1.55
8	Thị trấn Tân Biên	5	3.88
Tổng mẫu		13	10.08

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm virus ZIKV có sự phân bố khác nhau giữa các địa phương của huyện Tân Biên. Số ca nhiễm ZIKV có sự phân bố cao ở thị trấn Tân Biên và Tân Lập. Không ghi nhận ca mắc ở xã Mỹ Công và Tân Phong.

4. BÀN LUẬN

Tại Việt Nam, trong số các ca bệnh sốt xuất huyết Dengue, có rất nhiều ca bệnh sốt chưa rõ nguyên nhân. Trong đó các virus *Arbo* khác như ZIKV có cùng vecto truyền bệnh là muỗi *Aedes*, gây ra nhiều biểu hiện lâm sàng giống như nhiễm DENV, đặc biệt, những năm gần đây đã và đang có xu hướng lan rộng ra nhiều quốc gia. Để tăng khả năng phát hiện virus ZIKV trên mẫu bệnh phẩm, nghiên cứu này đã áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử real-time RT-PCR. Kỹ thuật này đã phát hiện được 90/484 mẫu được thu thập tại tỉnh Tây Ninh. Ứng phó với bùng phát dịch Zika tại các quốc gia Nam Mỹ năm 2015, việc giám sát virus *Arbo* lưu hành trên muỗi tại Việt Nam được tăng cường và đã phát hiện thấy muỗi *Aedes aegypti* nhiễm virus Zika tại các tỉnh miền Nam năm 2016 [14]. Các nghiên cứu về nhiễm *Arbovirus* tại Việt Nam về virus Zika còn khá ít. Theo dõi sự lưu hành của virus Zika là những hoạt động tiên quyết để chủ động xây dựng và triển khai các chương trình phòng chống dịch hiệu quả. Với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, kỹ thuật real-time RT-PCR đã phát hiện

được các tác nhân cần nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các nhóm tuổi đều có thể bị nhiễm virus Zika nhưng nhìn chung ở Bảng 4, lứa tuổi 15 - 60 vẫn có tỷ lệ nhiễm virus Zika cao hơn nhóm tuổi khác. Nghiên cứu có kết quả tương đương khảo sát huyết thanh học virus Zika do Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh thực hiện năm 2017 ghi nhận trong 400 người tham gia nghiên cứu có 26 người lớn (6.5%) và trẻ em (3.5%) nhiễm virus Zika. Tổ chức Y tế thế giới cũng cho rằng 90% ca sốt nhiễm virus là ở người trẻ tuổi. Về phân bố ca nhiễm theo địa phương, kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm virus Zika xảy ra nhiều hơn ở huyện Tân Châu 21.69% (77/355). Nguyên nhân có thể do huyện Tân Châu tập trung dân số đông, phía Bắc giáp với biên giới Campuchia.

5. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu trên 484 đối tượng sốt chưa rõ nguyên nhân tại tỉnh Tây Ninh năm 2023. Chúng tôi ghi nhận kết quả như sau: Số ca mắc virus Zika ghi nhận nhiều nhất ở huyện Tân Châu 21.69%, trong đó nhiều nhất ở xã Thanh Đông, Tân Đông, thị trấn Tân Châu lần lượt là 3.38%, 3.66%, 3.10%. Huyện Tân Biên 20.08%, trong đó nhiều nhất ở thị trấn Tân Biên chiếm 3.88%. Độ tuổi nhiễm virus Zika được phân bố chủ yếu từ 15-60 tuổi với tỷ lệ 51.11%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Brasil, P., et al. "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro," *N Engl J Med*. 375(24), pp. 2321-2334, 2016.

[2] De Araújo, T. V. B., et al., "Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study," *Lancet Infect Dis*. 18(3), pp. 328-336, 2018.

[3] França, T. L. B., et al., "Growth and Development of Children with Microcephaly Associated with Congenital Zika Virus Syndrome in Brazil," *Int J Environ Res Public Health*. 15(9), 2018.

[4] Noronha, Ld, et al., "Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism," *Mem Inst Oswaldo*

Cruz. 111(5), pp. 287-93, 2016.

[5] Ferraris, P., Yssel, H., and Missé, D. "Zika virus infection: an update" *Microbes Infect.* 21(8-9), pp. 353-360, 2019.

[6] Petersen, L. R., et al., "Zika Virus" *N Engl J Med.* 374(16), pp. 1552-63, 2016.

[7] Musso, D., et al., "Potential sexual transmission of Zika virus" *Emerg Infect Dis.* 21(2), pp. 359-61, 2015.

[8] Cao-Lormeau, V. M., et al., "Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study" *Lancet.* 387(10027), pp. 1531-1539, 2016.

[9] Rubin, E. J., Greene, M. F., and Baden, L. R., "Zika Virus and Microcephaly" *N Engl J Med.* 374(10), pp. 984-5, 2016.

[10] Tang, H., et al., "Zika Virus Infects Human

Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth" *Cell Stem Cell.* 18(5), pp. 587-90, 2016.

[11] Lan, P. T., et al., "Fetal Zika Virus Infection in Vietnam" *PLoS Curr.* 9, 2017.

[12] Bộ Y tế, *Nâng mức cảnh báo đối với phòng chống dịch bệnh do vi rút Zika tại Việt Nam*, accessed 18/04/2023, from <https://vncdc.gov.vn/nang-muc-can-bao-doi-voi-phong-chong-dich-benh-do-vi-rut-zika-tai-viet-nam-nd14307.html>, 2016.

[13] St. Louis, sốt vàng (YFV), Powassan virus, Semliki forest virus, o'nyong-nyong virus, chikungunya virus, và Spondweni virus., 2008.

[14] La Hoàng Huy, Lê Nguyễn Thùy Duy, Phạm thị Thúy Ngọc, Ngô Minh Danh, Lê Thanh Tùng, Lý Huỳnh Kim Khánh, Phan Trọng Lâm, "Tỉ lệ nhiễm virus Dengue và zika trên muỗi Aedes Aegypti ở khu vực phía nam Việt Nam," *Tạp chí Y học dự phòng*, 27(11), 75-80, 2017.

Zika RNA virus testing in samples from patients with dengue fever in Tay Ninh province

Nguyen Ha Thuy Diem, Nguyen Thi Dung, Luong Thi Mo, Nguyen Thi Nga and Le Thi Hong

ABSTRACT

The Zika virus fever is an acute viral infection transmitted through the bites of Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes. Currently, Zika virus infection is no longer considered a global public health emergency of international concern, but the consequences of Zika virus infection continue to pose a community health challenge. This study was conducted to assess the circulation of Zika virus in patients with undifferentiated fever attending consultation and treatment at Tay Ninh provincial hospital in 2022 - 2023. A total of 484 were analyzed using real-time RT-PCR method with SuperScript IV RT enzyme. The positive control samples were ZIKV virus strains that had been inactivated. Primers and Probes were used according to Ministry of Health procedures. The study results showed that the highest Zika virus infection rate was concentrated in the age group 15 - 60, accounting for 55.11% (46/90). Tan Chau district accounts for a higher positive rate with 21.69%.

Keywords: Zika virus, real-time RT-PCR, Aedes mosquitos, Tay Ninh

Received: 10/02/2024

Revised: 10/03/2024

Accepted for publication: 11/03/2024