

ESTABLISHING A STANDARD SAMPLE SET USED IN QUANTIFYING DENGUE VIRUS LOAD IN PEOPLE WITH DENGUE FEVER

Tran Hoang Long¹, Do Duy Cuong¹, Chu Duc Minh², Nguyen Thuy Linh², Hoang Xuan Su^{2*}

¹Bach Mai Hospital - 78 Giai Phong, Kim Lien Ward, Hanoi City, Vietnam

²Vietnam Military Medical University - 160 Phung Hung, Ha Dong Ward, Hanoi City, Vietnam

Received: 20/09/2025

Revised: 17/10/2025; Accepted: 18/11/2025

ABSTRACT

Objective: To establish and evaluate the performance of an internal standard material for quantification of Dengue viral load in clinical samples.

Subjects and methods: Gene sequences of Dengue virus retrieved from Genbank using for selection of conserved 3'UTR region for standard and designing primers and probe of RT-qPCR. The standard sample was designed to contain inserted fragments of 3'UTR region into plasmid. A total of 250 clinical specimens from patients with suspected dengue infection were enrolled at Bach Mai Hospital were collected, and viral RNA was extracted for quantitative analysis of Dengue virus to evaluate the internal standard panel using qRT-PCR.

Results: The plasmid standard containing the region specific to Dengue virus demonstrated a linear range from 10^3 - 10^{10} copies/mL, with amplification efficiency (E) of 99%, a slope of -3.348, a correlation coefficient $R^2 = 0.99912$, and a limit of detection (LOD) of 522 copies/mL at a 95% confidence interval. The stability of the standard material over 6 months showed coefficient of variation values of 1.36%, 1.07%, and 1.23%, respectively. The mean viral load in NS1-positive patients was $5.93 \pm 1.80 \log_{10}$ copies/mL, significantly higher than in NS1-negative patients ($4.19 \pm 0.77 \log_{10}$ copies/mL ($p < 0.001$)). In addition, viral load during the first 3 days of illness ($7.60 \pm 1.22 \log_{10}$ copies/mL) was significantly higher than that in days 3-5 ($5.43 \pm 1.68 \log_{10}$ copies/mL and day 5 onwards ($4.84 \pm 0.92 \log_{10}$ copies/mL ($p < 0.001$)).

Conclusion: The internal standard panel targeting the 3'UTR region of Dengue virus has successfully established, providing a standard sample for the development and validation of Dengue virus nucleic acid detection kits in Vietnam.

Keywords: Standard sample, RT-qPCR, quantitative, Dengue virus.

*Corresponding author

Email: hoangxuansu@vmmu.edu.vn Phone: (+84) 983603862 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD22.3877>

THIẾT LẬP BỘ MẪU CHUẨN SỬ DỤNG TRONG ĐỊNH LƯỢNG TẢI LƯỢNG VIRUS DENGUE Ở NGƯỜI BỆNH SỐT XUẤT HUYẾT

Trần Hoàng Long¹, Đỗ Duy Cường¹, Chu Đức Minh², Nguyễn Thuỳ Linh², Hoàng Xuân Sủ^{2*}

¹Bệnh viện Bạch Mai - 78 Giải Phóng, P. Kim Liên, Tp. Hà Nội, Việt Nam

²Học viên Quân y - 160 Phùng Hưng, P. Hà Đông, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận: 20/09/2025

Ngày sửa: 17/10/2025; Ngày đăng: 18/11/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thiết lập bộ mẫu chuẩn sử dụng trong định lượng virus Dengue bằng kỹ thuật RT-PCR và đánh giá hiệu quả của bộ mẫu chuẩn trong định lượng virus Dengue trên các mẫu lâm sàng.

Đối tượng và phương pháp: Trình tự gen của 4 serotype Dengue trên thế giới và Việt Nam sử dụng lựa chọn vùng gen đích cho mẫu chuẩn và thiết kế mồi, probe cho RT-PCR. Tổng số 250 người bệnh nghi nhiễm sốt xuất huyết được thu thập tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2022-2023. Mẫu huyết tương được thu thập và tách chiết RNA sử dụng cho xác định tải lượng virus Dengue sử dụng bộ mẫu chuẩn nội bộ. Quy trình xây dựng bộ chuẩn DNA plasmid của virus Dengue được thiết kế bao gồm các bước như sau: (1) Phân lập vùng gen đích của virus Dengue, (2) Tạo dòng plasmid tái tổ hợp chứa vùng gen đích của virus Dengue, (3) Thiết lập bộ mẫu chuẩn DNA plasmid chứa vùng gen đích virus Dengue, và (4) Đánh giá bộ mẫu chuẩn bằng kỹ thuật RT-qPCR.

Kết quả: Bộ mẫu chuẩn DNA plasmid chứa vùng gen 3'UTR đặc hiệu với virus Dengue có phạm vi tuyến tính nằm trong khoảng 103-1010 copies/mL với hiệu suất của phản ứng E = 99%, độ dốc là -3,348, hệ số tương quan R² = 0,99912 và LOD = 522 bản sao/ml với độ tin cậy 95%, độ ổn định trong 6 tháng với hệ số biến thiên lần lượt là 1,36%; 1,07% và 1,23%. Tải lượng virus Dengue trung bình ở nhóm dương tính với NS1 là $5,93 \pm 1,80 \log_{10}$ copies/ml cao hơn so với nhóm NS1 âm tính là $4,19 \pm 0,77 \log_{10}$ copies/ml ($p < 0,001$). Tải lượng virus Dengue trung bình ở người bệnh trong 3 ngày đầu của bệnh đạt $(7,60 \pm 1,22) \log_{10}$ copies/ml, cao hơn so với tải lượng ghi nhận trên người bệnh có số ngày của bệnh từ 3-5 ngày ($5,43 \pm 1,68) \log_{10}$ copies/ml và từ ngày thứ 5 trở đi ($4,84 \pm 0,92) \log_{10}$ copies/ml ($p < 0,001$).

Kết luận: Thiết lập thành công bộ mẫu chuẩn nội bộ định lượng virus Dengue trên vùng gen 3'UTR làm tiền đề cho phát triển và kiểm định kit chẩn đoán axit nucleic của virus Dengue ở Việt Nam.

Từ khóa: Bộ mẫu chuẩn, RT-qPCR, định lượng, virus Dengue.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Dengue thuộc họ Flaviviridae, chi Flavivirus. Bộ gen của virus Dengue (DENV) là RNA sợi đơn dương với kích thước khoảng 11 kb bao gồm một khung đọc mở (open reading frame - ORF) duy nhất, được dịch mã thành một polyprotein hoàn chỉnh, chứa các enzym như RNA helicase hay RNA polymerase phụ thuộc RNA (RdRp) [1]. ORF này được bao quanh bởi hai vùng 5' và 3'UTRs [2]. DENV có 4 kiểu huyết thanh khác nhau đã được xác định (DENV1, DENV2, DENV3 và DENV4), các kiểu huyết thanh Dengue này giống nhau khoảng 60-70% trình tự các acid

amin; và có chung một số quyết định kháng nguyên miễn dịch, do đó có thể xảy ra phản ứng chéo giữa các kiểu huyết thanh [1]. Cả 4 kiểu huyết thanh của DENV là nguyên nhân gây ra hàng loạt mức độ nhiễm Dengue từ nhiễm không triệu chứng, sốt nhẹ đến sốt xuất huyết nặng (DHF) và hội chứng sốc Dengue (DSS) [3]. Mặc dù hiện nay đã có những vắc-xin phòng ngừa bệnh sốt xuất huyết nhưng chưa có phương pháp điều trị kháng virus đặc hiệu. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), ước tính có khoảng 3,6 tỷ người trên thế giới đang đối mặt với nguy cơ với 390

*Tác giả liên hệ

Email: hoangxuansu@vmmu.edu.vn Điện thoại: (+84) 983603862 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD22.3877>

triệu ca nhiễm mỗi năm, trong đó 96 triệu ca có triệu chứng. Trong số 96 triệu ca có triệu chứng, khoảng 2 triệu ca tiến triển thành bệnh cảnh nặng như DHF và DSS, dẫn đến khoảng 21.000 ca tử vong hàng năm trên toàn cầu [4]. Việt Nam cũng là một khu vực ghi nhận số ca bệnh sốt xuất huyết cao nhất trên toàn thế giới, điển hình như số liệu năm 2022 ghi nhận gần 370.000 ca mắc và 140 ca tử vong, cao nhất kể từ khi bệnh được phát hiện tại nước ta [5].

Hiện nay, chẩn đoán nhiễm DENV trên các bệnh nhân chủ yếu dựa vào các kỹ thuật miễn dịch, tuy nhiên độ nhạy hay độ đặc hiệu chưa cao [6]. Mặt khác, các kỹ thuật này không đánh giá được tải lượng virus, trong khi đó kỹ thuật RT-qPCR không những phát hiện chính xác vật liệu di truyền mà còn xác định được số lượng bản sao của DENV trong huyết tương mẫu bệnh phẩm, giúp theo dõi đánh giá kết quả điều trị nhiễm DENV [7]. Hiện tại, nhiều hãng trên thế giới như RealStar Dengue RT-PCR kit (Altona Diagnostics), Tropical Fever Core multiplex PCR (Fast Track Diagnostics) Simplexa Dengue real-time RT-PCR (Focus Diagnostics, Cypress, USA)... đã phát triển các bộ kit sinh học phân tử sử dụng cho chẩn đoán DENV, nhưng với giá thành cao và một số đòi hỏi thiết bị tự động chưa phù hợp với điều kiện tài chính của người bệnh cũng như điều kiện hạ tầng của nhiều bệnh viện. Bộ mẫu chuẩn của WHO cũng như các công ty thương mại đáp ứng đầy đủ các tiêu chí trong việc xác định tải lượng DENV, nhưng còn gặp nhiều vấn đề do nguồn cung không phải luôn sẵn có cũng như giá thành cao. Chính vì vậy, việc phát triển các bộ mẫu chuẩn cơ sở được đánh giá và hiệu chỉnh theo mẫu chuẩn quốc tế hay kit thương mại đã được là một hướng tiếp cận phù hợp để thay thế ở những nơi tiềm lực kinh tế còn hạn chế. Với các lý do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xây dựng bộ mẫu chuẩn DNA tái tổ hợp sử dụng cho xét nghiệm RT-qPCR trong định lượng DENV và đánh giá hiệu quả của bộ mẫu chuẩn trong định lượng DENV trên các mẫu lâm sàng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Trình tự gen của 4 serotype Dengue trên thế giới (GQ 398263.1, NC 001474.1, NC 001477.1, AB189128.1, OP600691.1), Việt Nam (OQ 832615.1, OQ 832623.1, OQ 832616.1, OQ427061.1, JQ045695.1) và trình tự mẫu chuẩn Dengue của WHO (KM204119, KM204118, KU050695, and KR011349) thu được từ ngân hàng gen sử dụng cho thiết kế, lựa chọn cặp mồi và probe cho kỹ thuật RT-qPCR định lượng tải lượng DENV để đánh giá bộ mẫu chuẩn DNA plasmid sử dụng xác định tải lượng virus trên mẫu lâm sàng.

- Mẫu bệnh phẩm: mẫu huyết tương của người bệnh sốt xuất huyết ký hiệu BMVN 329 đã được xét

NGHIỆM DƯƠNG TÍNH VỚI DENV theo qui trình của Lanciotti R.S và cộng sự [8] được sử dụng để khuếch đại vùng gen mục tiêu để tạo bộ mẫu chuẩn DNA plasmid sử dụng định xác định tải lượng DENV.

Tổng số 250 mẫu máu của người bệnh chẩn đoán lâm sàng sốt xuất huyết Dengue được thu thập trong tuần đầu của bệnh tại Bệnh viện Bạch Mai (ký hiệu BMVN) từ năm 2022-2023 bao gồm 234 mẫu có NS1 dương tính và 16 mẫu NS1 âm tính sử dụng test nhanh SD Bioline (Hàn Quốc). Các mẫu huyết tương của người bệnh sốt xuất huyết Dengue được bảo quản trong điều kiện -80°C sử dụng để đánh giá hiệu quả của bộ mẫu chuẩn DNA plasmid định lượng tải lượng DENV bằng kỹ thuật RT-qPCR và các mẫu của người hiến máu khỏe mạnh, mẫu HCV dương tính và mẫu RNA của virus Chikungunya và Zika được lưu trữ ở Phòng Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y được sử dụng để đánh giá độ đặc hiệu của kỹ thuật RT-qPCR.

- Tế bào và vector: tế bào khả biến E.coli DH5α-T1 của hãng Invitrogen, plasmid pJET1.2/Blunt (Thermo Scientific, Mỹ). Hóa chất realtime RT-qPCR dùng trong xác định tải lượng DENV trong mẫu bệnh phẩm là kit Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit. Các hóa chất dùng trong tách chiết RNA, RT-PCR, điện di và các máy móc, thiết bị chuyên dụng tại Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quy trình xây dựng bộ chuẩn DNA plasmid của DENV được thiết kế bao gồm các bước như sau: (1) Phân lập vùng gen đích của DENV, (2) Tạo dòng plasmid tái tổ hợp chứa vùng gen đích của DENV, (3) Thiết lập bộ mẫu chuẩn DNA plasmid chứa vùng gen đích DENV, và (4) Đánh giá bộ mẫu chuẩn bằng kỹ thuật RT-qPCR.

2.2.1. Phân lập vùng gen đích

Dựa trên trình tự gen vùng 3'UTR của DENV, cặp mồi đặc hiệu qDENG-F1 và qDENG-R1 đã được kiểm tra và lựa chọn (trình tự primers được trình bày ở bảng 1).

Mẫu huyết tương của người bệnh sốt xuất huyết ký hiệu BMVN 329 đã được xét nghiệm dương tính với virus theo qui trình của Lanciotti R.S và cộng sự [8]. Tách chiết RNA: RNA-DENV được tách chiết huyết tương sử dụng bộ sinh phẩm QIAamp viral RNA mini kit theo đúng quy trình của nhà sản xuất (Qiagen, Hilden, Đức).

Khuếch đại đoạn gen 3'UTR bằng kỹ thuật Onestep RT-PCR với các thành phần như: QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer* 5x; QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix; dNTPs 10mM; Primer qDENG(F1+R1) (IDT) và điều chỉnh thể tích RNase-free water đủ thể tích 20 µl. Quá trình khuếch đại được thực hiện trên máy PCR Eppendorf Mastercycler proS (Đức) với chu

trình: 50°C/30 phút - 95°C/15 phút - (94°C/30 giây - 52°C/30 giây - 72°C/50 giây) × 35 chu kỳ - 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2% TBE 0,5X, nhuộm ethidium bromide, chụp ảnh và lưu kết quả trên máy UVP Eppendorf.

2.2.2. Tách dòng gen 3'UTR

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ), sau đó chèn sản phẩm đã được tinh sạch gắn vào vector cloning pJET1.2/blunt. Vector tái tổ hợp được đưa vào tế bào E.coli DH5α có khả năng biến nạp thông qua phương pháp sốc nhiệt (ở 42°C trong 45 giây). Các plasmid tái tổ hợp sau đó được kiểm tra bằng các enzyme cắt giới hạn BglII (FastDigest, Thermo Scientific, Mỹ) và được giải trình tự, sử dụng cặp mồi đặc hiệu trên vector pJET1.2_F/R.

Bảng 1. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)
qDENG-F1	GACTAGYGGTTAGAG-GAGACC	168
qDENG-R1	GHRGAGACAGCAG-GATCTCT	168
ProbeD1a	5'-FAM-ACAGCATATT-GACGCTGGGA-RAGACC-TAMRA	
pJET1.2_F	CGACTCACTATAGG-GAGAGCGGC	-
pJET1.2_R	AAGAACATCGATTTTC-CATGGCAG	-

2.2.3. Thiết lập bộ chuẩn cơ sở DNA plasmid

Plasmid tái tổ hợp chứa gen mục tiêu được tinh sạch bằng bộ kit Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit theo quy trình của nhà sản xuất (GeneJET Plasmid Miniprep, Thermo Scientific, Mỹ). Nồng độ plasmid được đo bằng hệ thống NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Mỹ). Nồng độ ng/μl được chuyển đổi thành số bản copies/μl dựa vào hệ số chuyển đổi Avogadro và sự tương quan giữa nồng độ và kích thước của plasmid tái tổ hợp. Kết quả nồng độ mẫu plasmid thu được là $2,8 \times 10^{10}$ copies/μL và có độ tinh sạch (A260/A280) nằm trong khoảng cho phép 1,8-2,0. Từ mẫu plasmid gốc có được, tiến hành pha loãng lần lượt thành 10 dải nồng độ theo cơ số 10 với nước khử ion nhằm khảo sát khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn và xác định LOD của phản ứng RT-qPCR.

2.2.4. Đánh giá bộ mẫu chuẩn bằng kỹ thuật RT-qPCR

Phản ứng RT-qPCR được thực hiện với cặp mồi qDENG (F1+R1) và probe thiết kế dựa trên đoạn

gen 3'UTR không dịch mã của DENV (trình tự mồi và probe được trình bày ở bảng 1). Thành phần phản ứng RT-qPCR: 2X Luna® Universal Probe One-Step Reaction Mix (Biolabs), 20X Luna® WarmStart® RT Enzyme Mix, 5 μM probe qD1a (IDT), 10 μM mồi xuôi và mồi ngược, 5 μl RNA khuôn. Chu trình nhiệt: 55°C/10 phút - 95°C/1 phút - (94°C/10 giây - 58°C/60 giây) × 45 chu kỳ. Sau đó, tiến hành xây dựng đường chuẩn dựa vào phần mềm phân tích trên máy RotorGene Q (Qiagen, Đức).

2.3. Phân tích số liệu

Đánh giá kỹ thuật RT-qPCR sử dụng bộ mẫu chuẩn gồm các chỉ tiêu kháng tuyến tính định lượng, giới hạn phát hiện, độ chính xác. Sử dụng phần mềm SPSS 22.0 và các giá trị $p < 0,05$ được coi như có ý nghĩa thống kê.

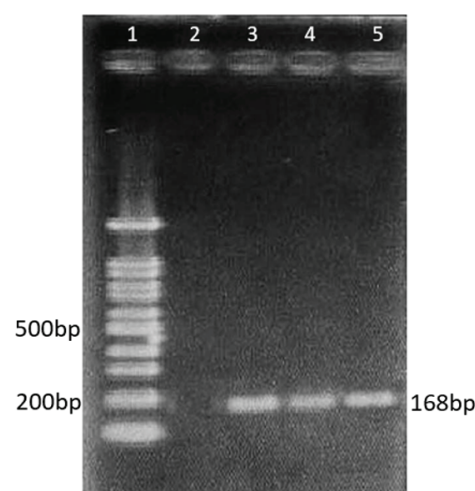
2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức của Bệnh viện Bạch Mai theo Quyết định số 7210/QĐ-BM ngày 31 tháng 12 năm 2024. Số liệu nghiên cứu được Bệnh viện Bạch Mai đồng ý cho công bố. Các tác giả không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu tạo dòng vùng gen 3'UTR

Vùng gen 3'UTR không mã hóa protein và có mức độ bảo tồn cao giữa các serotype được khuếch đại bằng QIAGEN OneStep RT-PCR Kit trong cùng 1 phản ứng hạn chế nguy cơ nhiễm chéo đảm bảo thu được sản phẩm gen đích mong muốn có độ chính xác và đặc hiệu cao, kích thước theo lý thuyết khoảng 168 bp (hình 1).

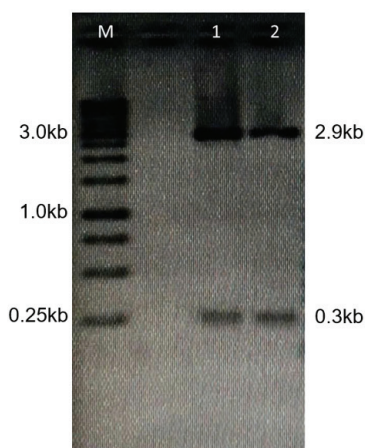


Hình 1. Sản phẩm khuếch đại đoạn gen 3'UTR của DENV

1: Thang ADN chuẩn 100 bp (Thermo Scientific, Mỹ);
2: Đối chứng âm; 3-5: Các mẫu DBM 19, 29, 329.

Kết quả cho thấy, khi cắt plasmid chứa đoạn chèn vùng 3'UTR bằng enzyme giới hạn BglII cho các băng có kích thước như trong tính toán lý thuyết (hình 2).

Kết quả so sánh trình tự plasmid thu được với ngân hàng gen cho thấy mức độ tương đồng cao, qua đó khẳng định rằng đoạn gen 3'UTR của DENV-2 đã được tạo dòng thành công vào vector pJET1.2/blunt.



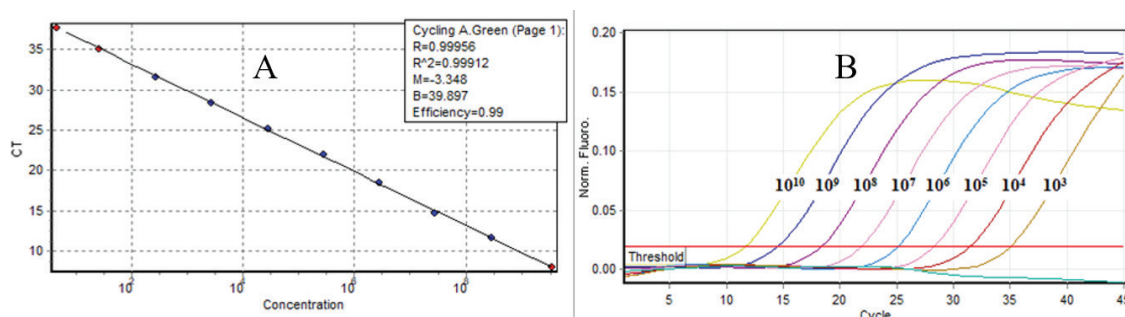
Hình 2. Kiểm tra sản phẩm cắt của plasmid tái tổ hợp chứa gen 3'UTR của DENV

M: Thang ADN chuẩn 1 kb (Thermo Scientific, Mỹ);

1-2: Sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn BglII trên các dòng khuẩn lạc 1-2

3.2. Đánh giá bộ mẫu chuẩn DNA plasmid

Xác định khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn DNA plasmid:



Hình 3. Kết quả xây dựng đường chuẩn trên bộ panel chuẩn DENV từ nồng độ 103-1010 copies/ml bằng kỹ thuật RT-qPCR

A: Biểu đồ đường cong khuếch đại tín hiệu huỳnh quang;

B: Đường cong chuẩn độ xây dựng từ dải nồng độ 103-1010 copies/mL

Trong nghiên cứu này, khoảng định lượng của bộ mẫu chuẩn được khảo sát dải nồng độ từ 100-1011 copies/mL (hình 3). Đường cong khuếch đại cho thấy, tín hiệu huỳnh quang xuất hiện tuyến tính trong dải nồng độ 103-1010 copies/mL của bộ panel (hình 3B). Phạm vi tuyến tính của xét nghiệm nằm trong khoảng 103-1010 copies/mL với độ dốc là $M = -3,348$, hiệu suất của phản ứng $E = 99\%$ và hệ số tương quan $R^2 = 0,99912$ cho thấy các giá trị định lượng thu được rất đáng tin cậy (hình 3A). Như vậy, bước đầu chúng tôi đã xây dựng thành công bộ panel DENV chuẩn cơ sở để định lượng tải lượng DENV với dải nồng độ 103-1010 copies/mL. LOD95% của xét nghiệm là 522 copies/mL.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ chính xác của bộ mẫu chuẩn trong ngày xét nghiệm

Hệ số biến thiên nội phản ứng						
Mẫu	Ct	Ct	Ct	Mean	SD	CV (%)
107	22,83	23,08	23,28	23.06	0,23	0,98
106	26,43	27,01	26,71	26,72	0,29	1,09
105	30,36	30,2	30,24	30,27	0,08	0,28

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ chính xác của bộ mẫu chuẩn giữa các ngày xét nghiệm

Hệ số biến thiên ngoại phản ứng									
Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6	Mean	SD	CV (%)
107	23,70	22,83	23,08	23,28	22,87	22,76	23,09	0,36	1,54
106	26,94	26,43	27,01	26,71	26,88	26,52	26,75	0,24	0,88
105	29,95	30,36	30,2	30,24	29,81	29,69	30,04	0,27	0,88

Ct: chu kỳ ngưỡng, SD: độ lệch chuẩn, Mean: trung bình, CV: hệ số biến thiên.

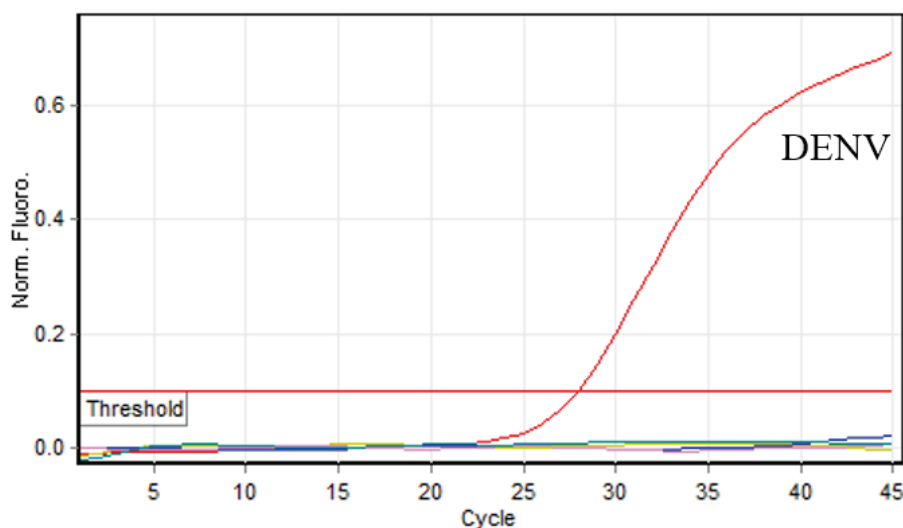
Kết quả đánh giá độ chính xác của bộ mẫu chuẩn cho thấy độ biến thiên nội phản ứng các mẫu chuẩn 105-107 copies/mL lần lượt là 0,28%; 1,09%; 0,98% (CV < 5%) và độ biến thiên liên phản ứng lần lượt là 0,88%; 0,88%; 1,54% (CV < 10%) cho thấy rằng độ chính xác cao của bộ mẫu chuẩn. Độ chính xác được thể hiện qua hệ số biến thiên (coefficient of variation) của các mẫu chuẩn. Sự biến thiên của các giá trị càng nhỏ thì độ chính xác của bộ mẫu chuẩn càng cao.

Bảng 4. Độ ổn định của bộ mẫu chuẩn

Mẫu	Ct						Ct Mean	SD	CV (%)
	T*0	T1	T2	T3	T4	T5			
107	23,53	23,44	23,82	23,02	23,1	23,08	23,33	0,32	1,36
106	26,41	26,44	26,86	26,79	27	27,1	26,77	0,29	1,07
105	29,95	30,05	30,44	30,47	29,79	30,77	30,25	0,37	1,23

Ct là chu kỳ ngưỡng, SD: độ lệch chuẩn, Mean: trung bình, CV: hệ số biến thiên.

Kết quả đánh giá độ ổn định của kit hàng tháng đến thời điểm nghiên cứu thể hiện qua các mẫu chuẩn có hệ số biến thiên lần lượt là 1,36%; 1,07% và 1,23% cho thấy bộ mẫu chuẩn có độ ổn định trong 6 tháng (CV < 5%).

**Hình 4. Kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng RT-qPCR**

Chúng tôi thực hiện phản ứng RT-qPCR với RNA sử dụng được tách chiết từ các virus khác có liên quan chặt chẽ về mặt di truyền với DENV bao gồm CHIKV, ZIKA và HCV. Kết quả cho thấy mẫu âm tính với NTC và RNA của CHIKV, ZIKA và HCV; kết quả dương tính với RNA của DENV. Điều này xác nhận kỹ thuật có độ đặc hiệu với DENV.

Bảng 5. Mối liên quan giữa tải lượng Dengue với ngày của bệnh (n = 250)

Tải lượng		
Ngày của bệnh		p
Trung bình ± SD (log ₁₀ copies/ml)	Min-max (log ₁₀ copies/ml)	
< 3 ngày (n = 45)		
7,60 ± 1,22	3,72-9,29	< 0,001
3-5 ngày (n = 202)		
5,43 ± 1,68	2,74-9,19	< 0,001
> 5 ngày (n = 3)		
4,84 ± 0,92	3,78-5,43	< 0,001

Sử dụng bộ mẫu chuẩn DNA plasmid định lượng tải lượng DENV bằng kỹ thuật RT-qPCR trên 250 mẫu lâm sàng thu được trong tuần đầu tiên của người bệnh sốt xuất huyết Dengue. Kết quả cho thấy tải lượng DENV trung bình ở bệnh nhân vào 3 ngày đầu của bệnh đạt (7,60 $\pm$ 1,22) log₁₀ copies/ml, cao hơn đáng kể so với tải lượng ghi nhận trên bệnh nhân có số ngày của bệnh từ 3-5 ngày (5,43 $\pm$ 1,68) log₁₀ copies/ml và từ ngày thứ 5 trở đi (4,84 $\pm$ 0,92) log₁₀ copies/ml, khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p < 0,001. Trong những ngày đầu khởi phát bệnh, tải lượng virus có xu hướng giảm dần theo thời gian, với mức giảm mạnh nhất từ ngày thứ 5 trở đi với ca mắc có tải lượng cao nhất ghi nhận chỉ ở mức 5,43 log₁₀ copies/ml so với 9,19 và 9,29 log₁₀ copies/ml trong 5 ngày đầu. Như vậy, tải lượng virus cao nhất thường ghi nhận trong ngày đầu tiên của bệnh, sau đó giảm nhanh trong những ngày tiếp theo.

Bảng 6. Mối liên quan giữa tải lượng Dengue với NS1 (n = 250)

Tải lượng		
NS1		p
Trung bình ± SD (log ₁₀ copies/ml)	Min-max (log ₁₀ copies/ml)	
NS1 dương tính (n = 234)		
5,93 ± 1,80	2,74-9,29	< 0,001
NS1 âm tính (n = 16)		
4,19 ± 0,77	3,11-5,55	< 0,001

Thực hiện xác định tải lượng DENV trên 250 mẫu bệnh phẩm đã thực hiện test nhanh với NS1, trong đó có 234 mẫu dương tính và 16 mẫu NS1 âm tính. Tải lượng virus trung bình ở nhóm dương tính với NS1 là 5,93 $\pm$ 1,80 log₁₀ copies/ml cao hơn đáng kể so với nhóm NS1 âm tính là 4,19 $\pm$ 0,77 log₁₀ copies/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,001).

4. BÀN LUẬN

Các bộ mẫu chuẩn quốc tế được sử dụng trong đánh giá sinh phẩm chẩn đoán axit nucleic (NAT) thường được công bố trong danh mục của WHO và Viện Tiêu chuẩn và Kiểm soát Sinh học Quốc gia (NIBSC) [9]. Việc khảo sát các sinh phẩm chẩn đoán trên các pannel mẫu chuẩn được xem là yêu cầu bắt buộc trước khi triển khai đánh giá trên lâm sàng. Mặc dù các bộ mẫu tham chiếu quốc tế được xem là tiêu chuẩn vàng, nhưng việc tiếp cận các panel này còn nhiều hạn chế do chi phí cao, yêu cầu về thời gian vận chuyển và bảo quản. Do đó, việc xây dựng các bộ mẫu chuẩn nội bộ đã và đang trở nên phổ biến với các đơn vị nghiên cứu và phát triển sinh phẩm chẩn đoán. Nguyên tắc thiết lập mẫu chuẩn cần đảm bảo tính đồng nhất, ổn định, tương đồng với mẫu bệnh phẩm thật và có thể được bảo quản trong thời gian dài theo khuyến cáo của WHO và NIBSC [9-11].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập bộ mẫu chuẩn DNA plasmid dựa trên đoạn gen 3'UTR của DENV, sử dụng trong đánh giá xét nghiệm định lượng DENV bằng kỹ thuật RT-qPCR. Từ trình tự của DENV thu được từ ngân hàng gen, chúng tôi sử dụng phần mềm BioEdit để so sánh và tìm vùng bảo tồn của Dengue phục vụ cho thiết kế mồi và probe cho kỹ thuật RT-qPCR. Kết quả lựa chọn được vùng gen 3'UTR của DENV có độ bảo tồn cao phù hợp với hầu hết các nghiên cứu thiết kế kỹ thuật real time PCR chẩn đoán và định lượng DENV trên thế giới [12-14]. Trong nghiên cứu này, mẫu chuẩn là DNA plasmid chứa đoạn gen 3'UTR của DENV đã được thiết lập qua tách dòng cho phép thu được số lượng lớn bản sao mang trình tự đích, đảm bảo tính thuần nhất, độ ổn định cao và dễ dàng chuẩn hóa nồng độ theo đơn vị copies/mL. Khi sử dụng bộ mẫu chuẩn được thiết lập đánh giá kỹ thuật RT-qPCR cho thấy khoảng định lượng tuyến tính 103-1010 copies/mL với hiệu suất của phản ứng E = 99% và hệ số tương quan R² = 0,99912 (hình 1). Dựa trên phân tích hồi quy Probit, giới hạn phát hiện (LOD95%) của kỹ thuật ước tính là 522 copies/ml. Kết quả này tương đương với một nghiên cứu của Kinanti D.R và cộng sự tại West Java, Indonesia cũng sử dụng vùng gen 3'UTR làm vùng mục tiêu trong xét nghiệm Taqman có LOD95% là 482 copies/mL [15]. Kết quả đánh giá độ chính xác và ổn định của bộ mẫu chuẩn cho thấy bộ mẫu chuẩn có độ ổn định trong các lần đánh giá và giữa các lần đánh giá với hệ số biến thiên CV < 5% (bảng 2, 3 và 4).

Tiếp theo, chúng tôi sử dụng bộ mẫu chuẩn để định lượng tải lượng DENV từ mẫu lâm sàng thu được trong tuần đầu của người bệnh sốt xuất huyết. Kết quả phân tích cho thấy tải lượng DENV có xu hướng giảm theo ngày của bệnh, trong đó cao nhất ở bệnh nhân vào 3 ngày đầu (7,6 log₁₀ copies/ml $\pm$ 1,22) và thấp nhất sau ngày thứ 5 của bệnh (4,84 log₁₀ copies/ml $\pm$ 0,92). Khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p < 0,001 (bảng 5). Điều này có thể giải thích

trong những ngày đầu khởi phát bệnh, virus nhân lên và giảm dần theo thời gian khi cơ thể xuất hiện đáp ứng miễn dịch ức chế sự nhân lên của virus [16]. Khi phân tích tải lượng DENV với tình trạng xuất hiện của kháng nguyên NS1 cho thấy nhóm có kháng NS1 dương tính có tải lượng virus cao hơn nhóm có NS1 âm tính (bảng 6). Phân tích chi tiết những trường hợp có NS1 âm tính thấy gặp ở hầu hết người bệnh từ ngày thứ 4 trở đi là giai đoạn tải lượng virus bắt đầu giảm dần, phù hợp với tiến trình đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cơ thể. Các trường hợp khác có thể giải thích ở giai đoạn virus nhân lên nhưng chưa phát hiện được NS1. Thực tế các nghiên cứu cũng chỉ ra kỹ thuật real time PCR có độ nhạy cao hơn xét nghiệm test nhanh phát hiện NS1 trong chẩn đoán sốt xuất huyết Dengue [17-18].

5. KẾT LUẬN

Bộ mẫu chuẩn định lượng nội bộ đã được thiết lập và chế tạo sử dụng định lượng DENV bằng kỹ thuật RT-qPCR. Bộ mẫu chuẩn có khoảng định lượng tuyến tính từ 103-1010 copies/mL, độ chính xác cao thể hiện qua hệ số biến thiên thấp lần lượt là 0,28%; 1,09%; 0,98%, độ ổn định trong 6 tháng. Kết quả đánh giá trên 250 mẫu máu người bệnh cho kết quả tốt. Thành công trong việc tạo ra bộ mẫu chuẩn DNA tái tổ hợp sử dụng cho xét nghiệm RT-qPCR trong định lượng DENV làm tiền đề cho những thử nghiệm lâm sàng và phát triển kit chẩn đoán phân tử DENV ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Murugesan A, Manoharan M. Dengue virus. Emerging and reemerging viral pathogens, 2020, 281-359.
- [2] Nanaware N, Banerjee A et al. Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses. Viruses, 2021, 13 (10), 1967.
- [3] Sinha S, Singh K et al. Dengue virus pathogenesis and host molecular machineries. J Biomed Sci, 2024, 31, 43.
- [4] Murugesan A, Manoharan M. Dengue virus. Emerging and reemerging viral pathogens, 2019, 281.
- [5] Cục Quân y. Toàn quân đã kiểm soát tốt dịch sốt xuất huyết Dengue. <https://www.qdnd.vn>, <<https://www.qdnd.vn/y-te/suc-khoe-tu-van/cuc-quan-y-nam-2022-toan-quan-da-kiem-soat-tot-dich-sot-xuat-huyet-dengue-723616>>, accessed: 07/08/2025.
- [6] Wang S.M, Sekaran S.D. Evaluation of a commercial SD Dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of Dengue virus infection. J Clin Microbiol, 2010, 48 (8), 2793-2797.
- [7] Dayarathna S, Kuruppu H, Silva T et al. Are viral loads in the febrile phase a predictive factor of Dengue disease severity? BMC Infect Dis, 2024, 24 (1), 1248.
- [8] Lanciotti R.S, Calisher C.H, Gubler D.J et al. Rapid detection and typing of Dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 1992, 30 (3), 545-551.
- [9] Bunk D.M. Reference materials and reference measurement procedures: An overview from a National Metrology Institute. Clin Biochem Rev, 2007, 28 (4), 131-137.
- [10] Madej R.M, Davis J, Holden M.J et al. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. J Mol Diagn, 2010, 12 (2), 133-143.
- [11] Barker P.E, Watson M.S, Ticehurst J.R et al. NIST physical standards for DNA-based medical testing. J Clin Lab Anal, 2002, 16 (1), 5-10.
- [12] Leparco-Goffart I, Baragatti M, Temmam S et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of Dengue viruses. J Clin Virol, 2009, 45 (1), 61-66.
- [13] Hue K.D.T, Tuan T.V, Thi H.T.N et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of Dengue virus RNA in plasma. J Virol Methods, 2011, 177 (2), 168-173.
- [14] Pongsiri P, Praianantathavorn K, Theamboonlers A et al. Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and Dengue virus. Asian Pac J Trop Med, 2012, 5 (5), 342-346.
- [15] Kinanti D.R, Ahmad I, Putra R et al. Evaluation of in-house Dengue real-time PCR assays in West Java, Indonesia. PeerJ, 2024, 12, e17758.
- [16] De La Cruz Hernández S.I, Flores-Aguilar H, González-Mateos S et al. Viral load in patients infected with Dengue is modulated by the presence of anti-Dengue IgM antibodies. J Clin Virol, 2013, 58 (1), 258-261.
- [17] Pillay K, Keddie S.H, Fitchett E et al. Evaluating the performance of common reference laboratory tests for acute Dengue diagnosis: a systematic review and meta-analysis of RT-PCR, NS1 ELISA, and IgM ELISA. The Lancet Microbe, 2025, 6 (7), 101088.
- [18] de Oliveira C.M, Takahashi F.Y, Silva R.S et al. Evaluation of the performance of a dengue NS1 assay during the 2024 epidemic in Brazil. Journal of Virological Methods, 2025, 335, 115143.