

PHÁT HIỆN VIRUT VIÊM GAN C TRÊN BỆNH NHÂN VIÊM GAN CẤP TÍNH BẰNG PHẢN ỨNG RT-PCR

*Lê Thanh Hà**

*Hoàng Quang**

*Lê Thanh Hòa***

TÓM TẮT

Từ 7 mẫu huyết thanh của bệnh nhân (BN) được chẩn đoán viêm gan, sử dụng phản ứng RT-PCR phát hiện hệ gen HCV và xác định 3 mẫu huyết thanh anti-HCV dương tính cho kết quả có ARN-HCV. Trong 7 mẫu huyết thanh BN viêm gan cấp tính, 3 mẫu xác định có virus viêm gan C thuộc nhóm Hepacivirus trong họ Flaviviridae và 4 mẫu còn lại không chứa ARN-HCV. Qua đó cho thấy, ARN-HCV tồn tại trong huyết thanh cung cấp nguồn gen làm khuôn cho phản ứng pháp RT-PCR, có thể sử dụng chẩn đoán sớm và phát hiện tái nhiễm.

* Từ khoá: RT-PCR; Virus viêm gan C; ARN-HCV; Anti-HCV; Viêm gan cấp tính.

DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS IN PATIENTS WITH ACUTE HEPATITIS BY RT-PCR

Le Thanh Ha

Hoang Quang

Le Thanh Hoa

SUMMARY

Of 7 plasma samples of patients with hepatitis, RNA-HCV were detected 3 positive anti-HCV plasma samples by RT-PCR and 4 samples were not. HCV in plasma samples belongs to Hepacivirus group of the family Flaviviridae. This finding showed that RNA-HCV exists in serum providing the RNA genomic source for RT-PCR to detect HCV for early diagnosis and re-infection of HCV.

* *Key words: RT-PCR; Hepatitis C virus; RNA-HCV; Anti-HCV; Acute hepatitis.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm virus viêm gan C (HCV) là một trong những nguyên nhân quan trọng dẫn đến viêm gan mạn tính, xơ gan và ung thư tế bào gan nguyên phát trên thế giới. Tỷ lệ

nhiễm HCV ở Việt Nam có xu hướng ngày càng tăng, do hệ thống sàng lọc máu còn lạc hậu và số người tiêm chích ma túy dùng chung bơm kim tiêm ngày càng gia tăng [1, 2].

* Bệnh viện 103

** Viện Công nghệ Sinh học

Phản biện khoa học: GS. TS. Nguyễn Văn Mùi

Hiện nay, nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng để chẩn đoán HCV

nh- ng độ đặc hiệu ch- a cao và chỉ phát hiện đ- ọc bệnh ở giai đoạn muộn. Phản ứng RT-PCR đã giúp phát hiện HCV ở giai đoạn sớm, chính xác và đặc hiệu. Do hệ gen HCV là ARN, nên tr- ớc đó cần có phản ứng chuyển đổi ARN thành ADN gọi là sao chép ng- ọc (RT), sau đó mới nhân vùng gen cần nghiên cứu bằng phản ứng PCR. Đây là một kỹ thuật xét nghiệm sử dụng sinh học phân tử nhạy và đặc hiệu, hỗ trợ đắc lực cho việc tiên l- ợng và đánh giá quá trình điều trị viêm gan C [3].

Ph- ơng pháp sinh học phân tử đã đ- ọc sử dụng phổ biến ở nhiều n- ớc trên thế giới để phát hiện virus viêm gan nói chung và viêm gan C nói riêng [5, 6]. Ở Việt Nam, việc áp dụng sinh học phân tử vào chẩn đoán bệnh viêm gan do virus còn rất hạn chế. Từ nhu cầu thực tiễn trên, đặc biệt đối với HCV, chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu sử dụng phản ứng RT-PCR phát hiện HCV trên BN viêm gan cấp tính.

Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu kết quả thực hiện RT-PCR sử dụng vùng gen 5'UTR (untranscribed region), phát hiện HCV từ ARN-HCV tồn tại trong mẫu huyết thanh và khẳng định đây là một kỹ thuật xét nghiệm phân tử chính xác, có thể ứng dụng trong sàng lọc HCV ở các mẫu máu/huyết thanh.

ĐỐI T- ỢNG VÀ PH- ƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối t- ợng nghiên cứu.

ARN-HCV đ- ọc tách từ 7 mẫu huyết thanh của 7 BN viêm gan cấp tính.

2. Ph- ơng pháp nghiên cứu.

*** Ph- ơng pháp tách ARN tổng số:**

Tách chiết ARN tổng số các mẫu bệnh phẩm virus viêm gan C có sử dụng bộ QiaAmp Viral Kit của hãng QIAGEN (Mỹ). Tách chiết ARN tổng số bằng bộ kit này ở nhiệt độ phòng 15 - 25°C.

*** Ph- ơng pháp tiến hành phản ứng RT-PCR:**

Phản ứng RT-PCR đ- ọc sử dụng là phản ứng một b- ớc (one-step RT-PCR) của hãng QIAGEN [4], với mỗi xuôi ký hiệu CC1F, là 5'-CAGAAAGCGTCTAGCCATGG-3', bao gồm 20 nucleotid, vị trí 69-88 ở phần đầu của hệ gen HCV; và mỗi ng- ọc CC2R là 5'-GAGGTTTAGGATTCGTGCTC-3', bao gồm 20 nucleotid, vị trí 363-344 ở phần đầu của hệ gen HCV. Sản phẩm đoạn ADN của vùng giao gen 5' UTR và gen C của HCV có độ dài 295 bp.

Nguyên liệu phản ứng RT-PCR.

Dung môi phản ứng (2x reaction mix): 12,5µl; enzym sao chép ng- ọc (RT-platinum): 1µl; mỗi xuôi (10pmol/µl): 1,5µl; mỗi ng- ọc (10pmol/µl): 1,5µl; n- ớc: 6,5µl; khuôn (ARN tổng số): 2µl

Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR, bao gồm:

B- ớc 1: 50°C trong 45 phút: 1 chu kỳ.

B- ớc 2: 94°C trong 15 phút: 1 chu kỳ.

Các b- ớc 3, 4, 5 thực hiện lặp đi lặp lại

trong 45 chu kỳ:

B- óc 3: 94°C trong 1 phút.

B- óc 4: 54°C trong 45 giây.

B- óc 5: 72°C trong 1 phút.

B- óc 6: 72°C trong 7 phút: 1 chu kỳ.

Sau đó bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ lạnh 4°C.

Sản phẩm của phản ứng RT-PCR đ- ọc phát hiện khi cho điện di trên thạch agarose 0,8%.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả thu thập mẫu.

Thu thập 7 mẫu máu tách huyết thanh của BN viêm gan virus cấp tại Khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện 103 và Khoa Vi sinh vật, Viện Vệ sinh Phòng dịch Quân đội. Tất cả các BN này đều nhập viện với chẩn đoán là viêm gan cấp tính. Các mẫu huyết thanh đ- ọc ký hiệu HC1, HC2, HC3, HC4, HC5, HC6, HC7.

Bảng 1: Kết quả xác định các marker virus.

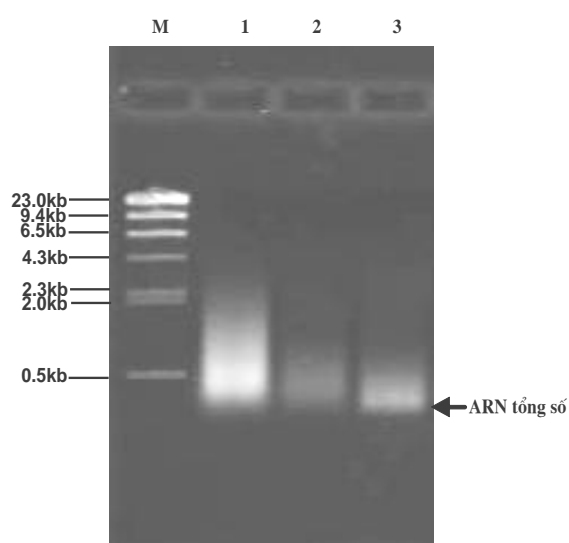
	HC1	HC2	HC3	HC4	HC5	HC6	HC7
Anti-HAV	-	-	-	-	-	-	-
HBsAg	-	-	-	-	-	-	-
Anti-HCV	+	+	+	-	-	-	-

* Chỉ có 3 mẫu cho kết quả d- ơng tính.

2. Kết quả tách ARN tổng số từ huyết thanh BN.

Lấy 3 mẫu HC1, HC2, HC3 có kết quả anti-HCV (+), tiến hành tách ARN tổng

số. ARN tổng số là hỗn hợp các loại ARN, trong đó có thể có cả ARN của hệ gen HCV và sau khi tách đ- ọc kiểm tra trên thạch agarose 0,8% (*hình 1*). Kết quả cho thấy cả 3 mẫu huyết thanh này đều chứa ARN tổng số, có thể sử dụng làm khuôn để tiến hành phản ứng RT-PCR.



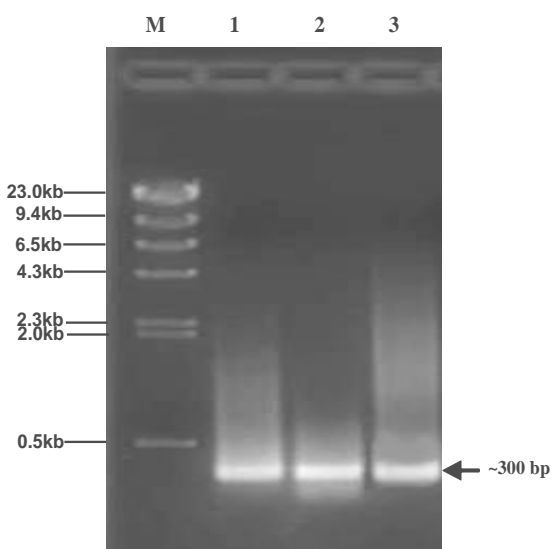
Hình 1: Kết quả điện di ARN tổng số trên thạch agarose 0,8%.

M: Chỉ thị ADN (sử dụng hệ gen của thực khuẩn thể Lambda (λ) cắt bằng enzym giới hạn HindIII). Đ- ồng chạy 1-3: 3 mẫu ARN tổng số lần l- ợt tách từ huyết thanh của các BN HC1, HC2, HC3.

3. Kết quả thực hiện RT-PCR.

Để xác định chuỗi ARN của HCV, chúng tôi sử dụng cặp mồi đặc hiệu là CC1F và CC2R. Tính đặc hiệu và độ nhạy của cặp mồi khi thực hiện phản ứng RT-PCR đ- ọc Caudai và CS (1998) chứng minh rất cao [4]. Điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR cho thấy, 3 băng ADN có độ dài khoảng 300 bp hiển thị rõ trên

thạch (hình 2), độ dài sản phẩm đúng như dự đoán.



Hình 2: Kết quả phản ứng PCR của đoạn gen HCV.

M: Chỉ thị ADN (sử dụng hệ gen Lambda (λ) cắt bằng enzym giới hạn HindIII); Dòng chạy 1-3: Các sản phẩm RT-PCR có độ dài khoảng 300 bp.

Với kết quả thu nhận được sau khi thực hiện phản ứng RT-PCR, chúng tôi cho rằng toàn bộ quy trình kỹ thuật của phản ứng RT-PCR được thực hiện với ARN tổng số làm khuôn từ 3 mẫu trên (thành phần phản ứng, trình tự nucleotid của mỗi CC1F, CC2R và chu trình nhiệt) hoàn toàn đặc hiệu với HCV và cho kết quả chính xác.

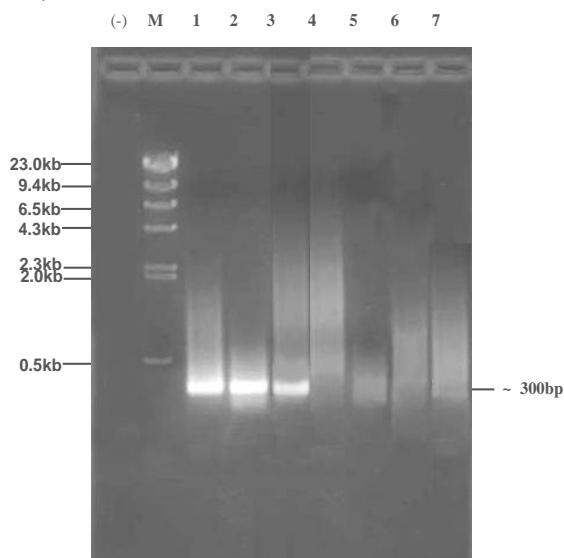
4. Kết quả giải trình trình tự.

Toàn bộ chuỗi nucleotid của đoạn ADN thu nhận từ các mẫu HC1, HC2, HC3 được giải trình trình tự bằng máy đọc trình tự ABI Avant 3100 Genetic Analyzer (Mỹ)

tại Viện Công nghệ Sinh học. Với kết quả truy cập Ngân hàng gen, ARN của virus gây bệnh viêm gan có trong 3 mẫu huyết thanh thu tại Hà Nội chính thức được xác định là HCV thuộc nhóm Hepacivirus trong họ Flaviviridae.

5. Ứng dụng RT-PCR phát hiện HCV trên một số mẫu huyết thanh BN viêm gan cấp tính.

Sau khi xác định được quy trình kỹ thuật phát hiện virus HCV bằng sinh học phân tử trên 3 mẫu đại diện, thực hiện phản ứng RT-PCR trên 4 mẫu huyết thanh BN còn lại cùng với đối chứng âm tính (-) (khuôn ARN được thay bằng nước tinh khiết) và đối chứng dương tính (+) (3 mẫu đã xác định có chứa ARN-HCV). Kết quả điện di trên thạch agarose 0,8% cho thấy 4 mẫu còn lại không cho sản phẩm RT-PCR. Như vậy, 4 mẫu huyết thanh có phản ứng anti-HCV âm tính đều không có ARN của virus HCV, do vậy không phát hiện được bằng phản ứng RT-PCR (hình 3). Điều đó cho thấy có sự tồn tại cùng lúc của ARN-HCV và kháng thể anti-HCV trong huyết thanh dương tính. Phản ứng RT-PCR sử dụng nguồn khuôn ARN-HCV trong huyết thanh có lợi để chẩn đoán sớm và phát hiện tái nhiễm HCV.



RT-PCR trong nghiên cứu này để xây dựng kit chẩn đoán phân tử HCV từ khuôn HCV-ARN có trong huyết thanh BN một cách chính xác và đặc hiệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Trần Thanh D-ong*. Dịch tễ học phân tử nhiễm HCV tại Thành phố Hà Nội, Luận án Tiến sỹ Y học, Hà Nội, 2004.
2. *Bùi Đại*. Viêm gan virus B và D. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2002, tr. 12-269.
3. *Lê Thanh Hòa*. Sinh học phân tử: Nguyên lý và ứng dụng. Tài liệu giảng dạy sau Đại học. Viện Công nghệ Sinh học, 2003, tr. 72-82.
4. *Caudai C, Padula MG, Bettini V, Valensin PE*. Detection of HCV and GBV-C/HGV infection by multiplex PCR in plasma samples of transfused subjects, *J. Virological Methods*, 1998, 70: 79–83.
5. *Blum HE, Moradpour D, Cerny A, Markus H, Heim MH*. *Hepatitis C: An update*. *Swiss Med WKLY*, 2001, 131: 291–298.
6. *Liang T, Leonard B, Hoofnagle JH, et al*. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann. Inter. Med.*, 2000, 132. 4: 296-305.

Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR của các mẫu huyết thanh bệnh phẩm.

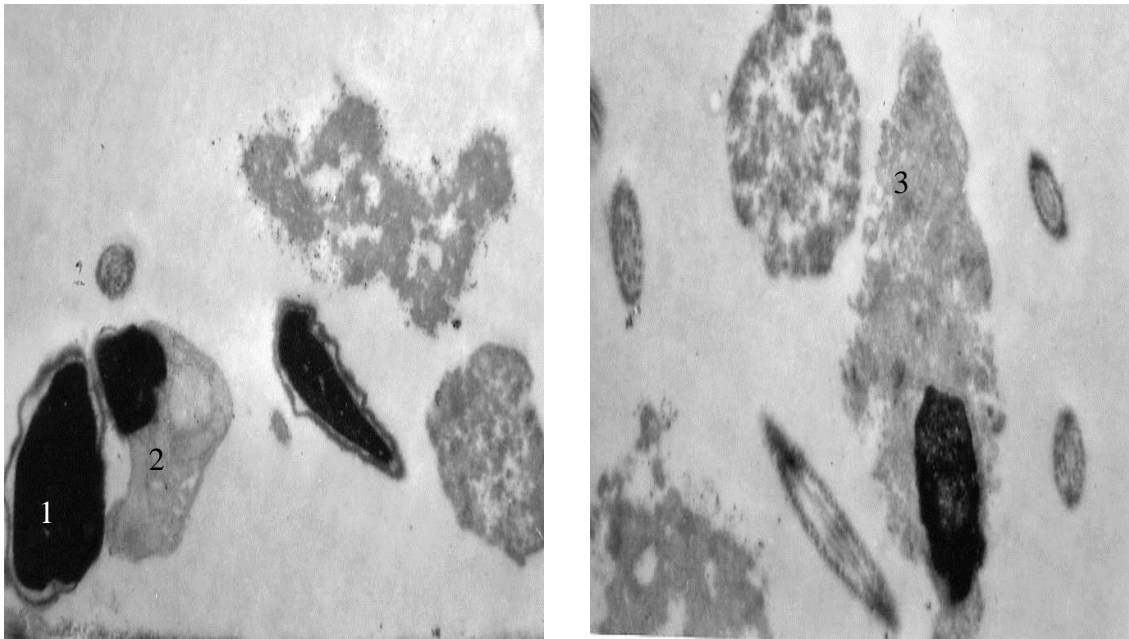
(-): Đối chứng âm; M: chỉ thị phân tử AND (sử dụng hệ gen Lamda (λ) cắt bằng enzym giới hạn HindIII); Đ-ờng chạy 1-3: Đối chứng d-ong; Đ-ờng chạy 4-7: Kiểm tra sản phẩm RT-PCR đối với HCV của 4 mẫu HC4, HC5, HC6, HC7.

KẾT LUẬN

- Trong 7 mẫu huyết thanh của BN viêm gan cấp tính ở khu vực Hà Nội có 3 mẫu (HC1, HC2, HC3) chứa virus (thuộc nhóm Hepacivirus trong họ Flaviviridae).

- Có thể sử dụng cặp môi CC1F-CC2R, cho sản phẩm khoảng 300 bp, thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng

Quan sát siêu cấu trúc qua kính hiển vi điện tử tinh trùng ng-ời, thấy nhiều tinh trùng dị dạng. Đặc biệt dị dạng ở đầu (*ảnh 3, 4*). Đầu tinh trùng có hai nhân, màng tế bào nhăn nhúm (*ảnh 3*), còn nhiều bào t-ong (*ảnh 4*).



*Ảnh 3, 4: Siêu cấu trúc đầu tinh trùng ng-ời có hình dạng bất th-ờng.
Đầu có nhân (1) chia thùy, bào t-ơng rộng (2, 3) x 10.000.*

Nh- vậy, bức xạ siêu cao tần có thể làm ảnh h- ưởng đến số l- ượng và chất l- ượng tinh trùng cả trên động vật thực nghiệm và ng- ời. Bức xạ siêu cao tần tác động đến quá trình sinh tinh trùng bằng cơ chế trực tiếp qua tác dụng nhiệt hoặc cơ chế gián tiếp thông qua tuyến yên, gây rối loạn quá trình sản xuất hormon LH, FSH, các hormon này tác dụng lên các tế bào dòng tinh [5].

4.3. Thăm dò tác dụng của thuốc mediphamin đến sự hồi phục số l- ượng và chất l- ượng tinh trùng ng- ời:

Những công nhân tiếp xúc với sóng siêu cao tần có số l- ượng và chất l- ượng kém, điều trị bằng mediphamin với liều 0,25g x 2viên/ngày, uống liên tục 30 ngày, sau đó xét nghiệm lại tinh dịch đồ.