

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SÓT RÉT-KÝ SINH TRUNG-CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

BỘ Y TẾ

-----*-----

HOÀNG XUÂN CƯỜNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG
NGƯỜI BỆNH SÓT XUẤT HUYẾT DENGUE
VÀ CHẾ TẠO KHÁNG NGUYÊN NS1 TÁI TỔ HỢP
GỘP 4 TÝP PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ
KHÁNG VI RÚT DENGUE BẰNG KỸ THUẬT ELISA**

Chuyên ngành: Bệnh Truyền nhiễm và các bệnh
nhiệt đới
Mã số: 972 01 09

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI-2024

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI VIỆN SÓT RÉT
- KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Võ Thị Bích Thủy
2. TS. Trần Tất Thắng

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường

Vào hồi: giờ ngày tháng năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Học viện Quân y

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt xuất huyết Dengue (SXHD) là bệnh truyền nhiễm cấp tính do vi rút Dengue (DENV) gây ra. Vi rút được truyền từ người sang người qua muỗi *Aedes spp.* Hiện nay, thế giới có hơn một phần ba dân số đang sống trong các khu vực có nguy cơ lây nhiễm và SXHD đóng vai trò quan trọng trong gây bệnh và tử vong ở các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới.

Tại Việt Nam, trước năm 2020, tình hình dịch SXHD diễn biến phức tạp theo chu kỳ 4 - 5 năm. Năm 2016, cả nước có 109.399 trường hợp mắc SXHD tại 56 tỉnh thành phố, trong đó có 36 ca tử vong. Năm 2019, có 335.056 ca, trong đó có 55 ca tử vong. Thống kê của Bộ Y tế cho thấy SXHD đứng thứ ba trong số các bệnh truyền nhiễm gây dịch của năm 2020, với 137.470 trường hợp mắc, 29 trường hợp tử vong. Năm 2022 cả nước ghi nhận 367.729 ca SXHD và 140 ca tử vong; tính tới 17/12/2023, cả nước ghi nhận 166.619 ca nhiễm, trong đó có 42 ca tử vong.

Bệnh SXHD được gây ra bởi bốn týp huyết thanh là: DENV1, DENV2, DENV3 và DENV4 của vi rút Dengue, có sự lưu hành khác nhau trong các khu vực mà bệnh SXHD phổ biến. Việc chẩn đoán phân biệt dựa trên các triệu chứng là một thách thức do các triệu chứng không đặc hiệu của bệnh sốt xuất huyết như sốt, đau nhức và mệt mỏi thường trùng lặp với các bệnh nhiễm trùng lưu hành khác.

Các phương pháp truyền thống để chẩn đoán SXHD bao gồm sử dụng phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược (RT-PCR) để phát hiện RNA của vi rút Dengue hoặc phân lập vi rút, và sau đó sử dụng xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA). Cả hai phương pháp này đều hiệu quả trong năm ngày đầu tiên khi bị nhiễm mầm bệnh, nhưng độ nhạy của các xét nghiệm này giảm theo thời gian khi lượng vi rút trong máu giảm dần. Hơn nữa, các phương pháp truyền thống này cần hệ thống phòng thí nghiệm chuyên sâu và kỹ thuật viên giàu kinh nghiệm để thực hiện nên khó triển khai rộng rãi ra cộng

đồng. Một số xét nghiệm kháng nguyên NS1 khác cũng đã được báo cáo là có hiệu quả trong việc phát hiện vi rút Dengue trong quần thể. Điều này đồng nghĩa với việc sử dụng xét nghiệm kháng nguyên NS1 không chỉ cải thiện khả năng chẩn đoán mà còn đóng vai trò quan trọng trong quản lý nguồn bệnh và giám sát véc tơ. Tuy nhiên, chưa có kháng nguyên NS1 gộp đủ cả 4 týp vi rút Dengue nào được sử dụng, điều này có thể bỏ sót một số trường hợp nhiễm vi rút Dengue. Việc có thêm một phương pháp chẩn đoán SXHD vừa đảm bảo độ nhạy, độ chính xác và tiện dụng là rất cần thiết, từ thực tế đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu sau:

1. Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở người bệnh sốt xuất huyết Dengue điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175 năm 2022.

2. Chế tạo kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp và đánh giá kết quả phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue bằng kỹ thuật ELISA.

Những đóng góp mới của luận án:

Một là, mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh SXHD theo nhóm tuổi và giới tính.

Hai là, dựa vào công nghệ tổng hợp gen nhân tạo có thể tạo ra một sản phẩm kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp chung cả 4 týp của vi rút Dengue (DENV 1- 4); cung cấp nguồn nguyên liệu sẵn có để chế tạo các sinh phẩm chẩn đoán sớm bệnh sốt xuất huyết Dengue, góp phần vào nâng cao hiệu quả trong công tác điều trị bệnh.

Ba là, sử dụng kháng nguyên NS1 tái tổ hợp có thể tạo ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu chung cho cả 4 týp của vi rút Dengue, ứng dụng trong chẩn đoán hoặc sản xuất vắc xin phòng bệnh.

Cấu trúc luận án

- Tổng cộng gồm: Luận án có 127 trang. Bao gồm: Phần đặt vấn đề; 4 chương (Chương 1: Tổng quan; Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu; Chương 3: Kết quả nghiên cứu; Chương 4: Bàn luận); Phần kết luận và Kiến nghị.

- Luận án có: 33 bảng, 27 hình, 174 tài liệu tham khảo.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan bệnh sốt xuất huyết Dengue

Sốt xuất huyết Dengue là bệnh truyền nhiễm cấp tính do vi rút Dengue gây nên. Vi rút truyền từ người bệnh sang người lành do muỗi đốt. Muỗi *Aedes aegypti* và *Aedes albopictus* là trung gian truyền bệnh chủ yếu. Bệnh có đặc trưng bởi sốt, xuất huyết và thoát huyết tương có thể dẫn đến sốc và tử vong nếu không được điều trị đúng và kịp thời.

Tại Việt Nam, số mắc tích lũy chỉ trong 8 tháng đầu năm 2020 của thành phố Hồ Chí Minh là 13.322 ca, chiếm tỷ lệ cao nhất cả nước, đứng thứ hai là Phú Yên với 4.898 ca. Hà Nội ở vị trí thứ 10 với 1.993 ca. Giám sát huyết thanh trong 8 tháng đầu năm 2020 cũng cho thấy týp DENV2 chiếm 51%, týp DENV1 chiếm 39% và týp DENV4 chiếm 10%.

1.2. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng sốt xuất huyết Dengue

Bệnh cảnh lâm sàng của nhiễm vi rút Dengue có nhiều dạng khác nhau, từ không biểu hiện triệu chứng đến các biểu hiện của hội chứng nhiễm vi rút, biểu hiện của sốt Dengue, biểu hiện bệnh cảnh của SXHD hay cả của hội chứng sốc Dengue. Tình trạng của bệnh cũng có thể chuyển biến nhanh chóng sang thể SXHD nặng, với các triệu chứng lâm sàng từ dạng nhẹ như sốt cao, đau đầu, đau cơ, phát ban, đến dạng nặng như suy đa tạng hay tình trạng sốc giảm thể tích. Các triệu chứng lâm sàng thường gặp gồm: sốt cao, đau đầu và đau mắt, đau cơ và đau khớp, phát ban và xuất huyết.

Công thức máu của NB SXHD có sự thay đổi chính trong 3 chỉ số bao gồm số lượng bạch cầu, tiểu cầu và tỷ lệ hematocrit. Bạch cầu: Trong giai đoạn khởi phát, biểu hiện sớm nhất là số lượng bạch cầu giảm từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7 của bệnh; Tiểu cầu: Số lượng tiểu cầu giảm dưới 100.000 tế bào/mm³ trong giai đoạn toàn phát của bệnh. Mức độ giảm tiểu cầu có tương quan với mức độ nghiêm trọng của bệnh; Hematocrit: Tỷ lệ Hematocrit có thể bình thường hoặc tăng nhẹ

trong những ngày đầu của bệnh, liên quan với tình trạng sốt cao, chán ăn, nôn mửa. Từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 của bệnh, hiện tượng cô đặc máu có thể xảy ra khi Hematocrit tăng trên 20% so với giá trị ban đầu.

Bệnh sốt xuất huyết Dengue được chia làm 3 mức độ:

- Sốt xuất huyết Dengue
- Sốt xuất huyết Dengue có dấu hiệu cảnh báo
- Sốt xuất huyết Dengue nặng

1.3. Sử dụng kháng nguyên trong chẩn đoán sốt xuất huyết Dengue

1.3.1. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*):

Phương pháp ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) là một kỹ thuật thử nghiệm sinh học được sử dụng để phát hiện và đo lường lượng lớn các chất khác nhau như protein, peptit, hormone, và khá nhiều loại các hợp chất sinh học khác. Có tới 4 loại phương pháp ELISA khác nhau: ELISA trực tiếp (Direct ELISA), ELISA gián tiếp (Indirect ELISA), ELISA sandwich, ELISA cạnh tranh (competitive ELISA)

- Phương pháp ELISA gián tiếp thường được ưa chuộng vì sự linh hoạt và độ chính xác cao của nó trong việc phát hiện và đo lường các chất sinh học trong mẫu. Có độ nhạy cao và có thể phát hiện các chất rất nhỏ. Dùng để đo lường lượng lớn chất khác nhau trong mẫu sinh học, chẳng hạn như protein, peptide, hormone.

- Xét nghiệm IgG-ELISA dựa trên sự có mặt của kháng thể IgG để xác định tình trạng nhiễm trùng trong quá khứ hoặc hiện tại. IgG-ELISA không đặc hiệu trong chẩn đoán các loại tủy huyết thanh Dengue vì có phản ứng chéo với các flaviviruses khác. Nhưng xét nghiệm này có độ nhạy cao, xấp xỉ 82% nên IgG-ELISA sẽ có giá trị trong một số trường hợp nhất định.

- Xét nghiệm tỷ lệ IgM/IgG là xét nghiệm để phân biệt giữa tình trạng nhiễm trùng tiên phát và nhiễm trùng thứ phát. Tỷ lệ IgM/IgG

lớn hơn 1,32 được coi là nhiễm trùng nguyên phát, trong khi tỷ lệ này dưới 1,32 được coi là nhiễm trùng thứ phát.

- Kháng nguyên phi cấu trúc 1 (NS1) đóng vai trò quan trọng trong quá trình sao mã của vi rút vào tế bào chủ. Kháng nguyên này được sản xuất vào máu của NB bị nhiễm bệnh. Vì vậy, NS1 được coi là một dấu ấn sinh học quan trọng để phát hiện nhiễm Flavivirus ở giai đoạn sớm.

1.3.2. Realtime RT-PCR: xác định vi rút sốt xuất huyết bằng realtime RT-PCR cho kết quả chính xác hơn vì tránh được hiện tượng dương tính giả cho kháng thể IgM có thể xảy ra phản ứng chéo với các loại vi rút khác cùng chi Flavivirus. Đây cũng được coi là tiêu chuẩn vàng để phát hiện nhiễm DENV ở giai đoạn nhiễm trùng sớm do độ nhạy cao của nó. Trong realtime RT-PCR, cDNA của vi rút (được tổng hợp từ RNA từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau, bao gồm huyết tương, máu, nước tiểu và huyết thanh của người bệnh. Sau đó, RNA của vi rút được phiên mã ngược thành cDNA) khuếch đại tín hiệu, tín hiệu này được đọc bởi các thiết bị để xác định kết quả là dương tính hay âm tính.

1.4. Tình hình ứng dụng kháng nguyên NS1 trong chẩn đoán xác định kháng thể IgM/IgG sốt xuất huyết Dengue và tiềm năng kết hợp NS1 và IgM trong chẩn đoán nhanh

Việc kết hợp xét nghiệm NS1 và IgM trong chẩn đoán SXHD là một trong những điều kiện tiên quyết để cung cấp thông tin chính xác và toàn diện về bệnh trạng của người bệnh. NS1 là một protein xuất hiện rất sớm trong cơ thể của người nhiễm vi rút Dengue. Việc phát hiện NS1 có thể giúp chẩn đoán nhanh chóng, thậm chí ngay từ giai đoạn sớm của bệnh khi triệu chứng có thể chưa xuất hiện hoặc chưa rõ ràng.

Báo cáo hiệu lực chẩn đoán NS1 của Luvira đã phân tích 86 huyết thanh của người bệnh sốt cấp tính (cả bệnh sốt xuất huyết và bệnh sốt không sốt xuất huyết). Khi so sánh với kết quả bằng phản ứng PCR cho thấy, phát hiện SXHD NS1 bằng xét nghiệm ELISA có độ

nhạy cao nhất là 82,4% (với độ đặc hiệu 94,3%), trong khi NS1 bằng xét nghiệm chẩn đoán nhanh (sử dụng kit test careUS TM Dengue Combo NS1 & IgM/IgG Kit của Hàn Quốc) có độ nhạy là 76,5%. Phát hiện IgM bằng ELISA và kit test nhanh chỉ cho thấy độ nhạy tương ứng là 27,5% và 17,9%. Sự kết hợp giữa NS1 và IgM trong kit test nhanh mang lại độ nhạy 78,4%, độ đặc hiệu 97,1%.

Khi so sánh kết quả của 2 bộ kit test nhanh bằng bộ sinh phẩm SD Bioline Dengue NS1 Antigen, và careUS Dengue IgM/IgG trên những bệnh nhân nghi ngờ SXHD để đánh giá NS1 và IgM tại bệnh viện Nguyễn Tri Phương (TP. HCM, Việt Nam). Kết quả: Xét nghiệm nhanh NS1 có độ nhạy, độ đặc hiệu lần lượt là 51,2%, 92,9, cao nhất vào ngày 4. Xét nghiệm nhanh kháng thể IgM có độ nhạy, độ đặc hiệu, lần lượt là 21,4%, 76,9%, tăng dần và cao nhất vào ngày 5.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu 1: Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở người bệnh sốt xuất huyết Dengue điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175 năm 2022

Đối tượng nghiên cứu

Người bệnh SXHD điều trị nội trú tại Bệnh viện Quân y 103 (BVQY103) và Bệnh viện Quân y 175 (BVQY175) không phân biệt tuổi, giới và điều kiện kinh tế xã hội.

- Tiêu chuẩn lựa chọn: Dựa vào Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị sốt xuất huyết Dengue, ban hành theo Quyết định số 3705/QĐ-BYT ngày 22 tháng 8 năm 2019 của Bộ Y tế.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 01 năm 2022 đến tháng 12 năm 2022,

- Địa điểm nghiên cứu: Tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

Cỡ mẫu nghiên cứu: Tại mỗi bệnh viện, áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho nghiên cứu mô tả, ước lượng một tỷ lệ, sử dụng sai số tuyệt đối.

$$n = Z_{(1-\alpha/2)}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

Với mức ý nghĩa 95% ta có $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$; P: tỷ lệ ước đoán sốt xuất huyết Dengue có dấu hiệu cảnh báo phải nhập viện, chọn P = 31,3% theo nghiên cứu của Bùi Vũ Huy và CS năm 2019 [104], chọn sai số tuyệt đối $d=5\%$, tính được $n = 331/01$ bệnh viện, trên thực tế số mẫu thu thập được là 368 NB tại BVQY103 và 359 NB tại BVQY175

Phương pháp chọn mẫu:

- Sử dụng phương pháp chọn mẫu thuận tiện
- Tất cả người bệnh nhập viện với chẩn đoán SXHD tại hai bệnh viện thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn đều được chọn vào nghiên cứu.
- Tiến hành thu thập thông tin triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm và thu thập mẫu bệnh phẩm.

Nội dung nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở người bệnh SXHD tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175

2.2. Mục tiêu 2: Chế tạo kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp và đánh giá hiệu quả phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue bằng kỹ thuật ELISA.

Đối tượng nghiên cứu

- Trình tự gen NS1 gộp 4 týp đã được thiết kế tối ưu bằng các phần mềm tin sinh và tổng hợp nhân tạo tại công ty Genscript Biotech (Piscataway, New Jersey, Hoa Kỳ) được giữ trong vector pJET1.2 đã được thiết kế có hai vùng nhận biết cắt của enzym giới hạn là NdeI và XhoI, kích thước thiết kế là 471bp.

- Huyết thanh người bệnh được chẩn đoán SXHD tại BVQY103 và BVQY175. Huyết thanh người khỏe mạnh tham gia hiến máu tình nguyện.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 01/2022 đến tháng 7/2023.
- Địa điểm nghiên cứu: Tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm

Cỡ mẫu nghiên cứu:

Áp dụng công thức tính cỡ mẫu để xác định độ nhạy, độ đặc hiệu, sử dụng sai số tuyệt đối:

+ Công thức tính cỡ mẫu để xác định độ nhạy:

$$n = \frac{z^2_{1-\frac{\alpha}{2}} Se(1 - Se)}{d^2 P}$$

+ Công thức tính cỡ mẫu để xác định độ đặc hiệu:

$$n = \frac{z^2_{1-\alpha/2} Sp(1 - Sp)}{d^2 (1 - P)}$$

Với ngưỡng xác suất $\alpha = 0,05$ (độ tin cậy 95%) thì $z_{1-\alpha/2} = 1,96$.

Se (Độ nhạy ước đoán), trong nghiên cứu này chọn Se = 95%;

Sp (Độ đặc hiệu ước đoán), trong nghiên cứu này chọn Sp = 90%;

d (Sai số tuyệt đối của Se, Sp), chọn $d = 5\%$;

P là tỷ lệ dương tính trong số mẫu thử nghiệm, trong nghiên cứu này dự kiến tỷ lệ này là 50% ($p = 0,5$).

Thay số vào các công thức, ta có cỡ mẫu cho ước đoán Se là 146 mẫu, cỡ mẫu ước đoán cho Sp là 277 mẫu. Trên thực tế đã thu thập và tiến hành nghiên cứu đánh giá trên 666 mẫu (trong đó 366 mẫu dương tính và 300 mẫu âm tính). Tiêu chuẩn vàng cho xét nghiệm sử dụng xét nghiệm khẳng định qRT-PCR. Trong đó 366 mẫu dương tính có 180 mẫu tại BVQY103 và 186 mẫu tại BVQY175; 300 mẫu âm tính được lấy từ huyết thanh của người khỏe mạnh tham gia hiến máu tình nguyện tại BVQY103.

Phương pháp chọn mẫu

+ Nhóm chuẩn dương: Các mẫu bệnh phẩm của NB SXHD được chọn ngẫu nhiên, đủ số lượng 366 mẫu.

+ Nhóm chuẩn âm: Thu tuyền theo phương pháp thuận tiện từ người đến hiến máu tình nguyện tại BVQY103, có tiền sử chưa mắc SXHD và hiện tại không có biểu hiện của SXHD. Chọn 300 mẫu đủ tiêu chuẩn.

Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu tách dòng và biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 týp vi rút Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 và Dengue 4 trên vi khuẩn E.coli. Ứng dụng kỹ thuật Western Blot xác định kháng nguyên tái tổ hợp rAgNS1-DENV1-4.

- Đánh giá hiệu quả sử dụng kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp để phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue bằng phương pháp ELISA.

- So sánh kết quả sử dụng kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp để phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue bằng phương pháp ELISA với kỹ thuật sinh học phân tử khác.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Tổng hợp kháng nguyên NS1 tái tổ hợp đặc hiệu của 4 týp huyết thanh vi rút Dengue

- Phương pháp ELISA gián tiếp (Indirect ELISA) sử dụng kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue

- Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược định lượng (qRT-PCR)

2.3. Sai số trong nghiên cứu

Đối tượng chọn vào nghiên cứu chưa chính xác do các thông tin chẩn đoán chưa đầy đủ.

Biện pháp khắc phục: Tập huấn cho các cán bộ, BS điều trị cần chỉ định và thu thập đủ thông tin dịch tễ, lâm sàng và cận lâm sàng, chẩn đoán xác định SXHD cho các người bệnh vào viện.

Sai số đo lường: Một số các chỉ số xét nghiệm có thể sai lệch (mạch, nhiệt độ, ... chỉ số xét nghiệm huyết học, sinh hoá) có thể sai khác do kỹ thuật lấy mẫu và xét nghiệm. Biện pháp khắc phục: Tập huấn cho cán bộ điều dưỡng, KTV xét nghiệm thực hiện đúng quy trình.

Sai số nhớ lại: Các thông tin khai thác từ tiền sử, yếu tố dịch tễ của NB có thể bị sai do nhớ lại không chính xác hoặc bị nhiễu bởi thông tin của người thân. Biện pháp khắc phục: Hỏi bệnh khi NB tỉnh táo, kết hợp thông tin khai thác thêm từ người thân để sử dụng thông tin đúng nhất. Kiểm tra đối chiếu lại thông tin ở các lần thăm khám và hỏi bệnh

2.4. Phân tích số liệu

- Số liệu được nhập và phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0
- Giá trị của các biến số định lượng được trình bày dưới dạng số trung bình, độ lệch chuẩn với phân phối chuẩn, median và tứ phân vị với phân bố không chuẩn.
- Đối với so sánh giá trị trung bình, các biến phân phối không chuẩn sử dụng kiểm định phi tham số, các biến phân phối chuẩn sử dụng kiểm định t-test
- So sánh tỷ lệ sử dụng kiểm định Chi-Square test
- Phân tích tương quan định tính, xác định OR, khoảng CI95% trong nghiên cứu.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng đánh giá đạo đức của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương (Quyết định số 58/CN-VSR ngày 31/12/2021) và được sự đồng ý của hai Bệnh viện (BVQY103 và BVQY175).

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở người bệnh sốt xuất huyết Dengue điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175 năm 2022

Bảng 3.3. Triệu chứng cơ năng ở đối tượng nghiên cứu

Triệu chứng (n=727)	Số lượng	%
Sốt	563	77,4
Đau đầu	508	69,9
Đau người (cơ)	459	63,1
Đau khớp	352	48,4
Đau hố mắt	51	7,0
Đau vùng gan	3	0,4
Buồn nôn	273	37,6
Nôn	132	18,2
Tiêu chảy	87	12,0
Chảy máu cam	49	6,7
Chảy máu chân răng	178	24,5
Rong kinh, rong huyết	30	4,1
Nôn ra máu	4	0,6
Đại tiện ra phân đen	31	4,3
Triệu chứng khác (Tiểu ít)	8	1,1

Trong các triệu chứng cơ năng của đối tượng nghiên cứu, sốt chiếm đa số 77,4%; đau đầu 69,9%; đau mỗi người 63,1%; đau khớp 48,4%; buồn nôn 37,6%, nôn 18,2%. Các triệu chứng của xuất huyết gồm: chảy máu cam 6,7%; chảy máu chân răng 24,5%; rong kinh 4,1%; nôn ra máu 0,6%; đi ngoài phân đen 4,3%.

Bảng 3.6. Đặc điểm sốt từ khi khởi phát bệnh theo giới tính

Đặc điểm		Giới				Tổng	
		Nam		Nữ			
		SL	%	SL	%	SL	%
Mức độ sốt (n=727)	Sốt rất cao (5)	2	0,6	8	2,2	10	1,4
	Sốt cao (4)	112	31,3	115	31,2	227	31,2
	Sốt vừa (3)	105	29,3	128	34,7	233	32,0
	Sốt nhẹ (2)	79	22,1	56	15,2	135	18,6

Đặc điểm		Giới				Tổng	
		Nam		Nữ			
		SL	%	SL	%	SL	%
	Không sốt (1)	60	16,8	62	16,8	122	16,8
	p	0,046					
Thời gian sốt (n=611)	Từ 1-3 ngày	129	42,9	148	47,7	277	45,3
	Từ 4-7 ngày	164	54,5	155	50	319	52,2
	Trên 7 ngày	8	2,7	7	2,3	15	2,5
	p	0,474					
Kiểu khởi phát sốt (n=604)	Đột ngột	213	71,5	223	72,9	436	72,2
	Từ từ	2	0,7	3	1	5	0,8
	Không rõ	83	27,9	80	26,1	163	27,0
	p	0,82					
Sốt nóng (n=600)	Có	259	87,5	254	83,6	513	85,5
	Không	37	12,5	50	16,4	87	14,5
	p	0,17					
Sốt gai rét (n=603)	Có	224	75,4	229	74,8	453	75,1
	Không	73	24,6	77	25,2	150	24,9
	p	0,868					
Sốt rét run (n=600)	Có	4	1,4	17	5,6	21	3,5
	Không	292	98,6	287	94,4	579	96,5
	p	0,005					

Tỷ lệ người bệnh bị sốt cao và rất cao 32,6%; 16,8% nhập viện đã hết giai đoạn sốt, sự khác biệt về mức độ sốt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Thời gian sốt đa phần dưới 7 ngày, có 2,5% có sốt kéo dài trên 7 ngày. Kiểu khởi phát sốt đa phần khởi phát đột ngột 72,2%;

sốt nóng 85,5%, gai rét 75,1% và có rét run 3,5%. Mức độ sốt cao và rất cao gặp ở nữ giới nhiều hơn nam giới. Thời gian kéo dài cơn sốt, kiểu khởi phát, tình trạng sốt nóng và sốt rét run, nhưng không khác biệt giữa nam và nữ với $p > 0,05$.

Bảng 3.9. Đặc điểm xuất huyết theo giới tính (n=727)

Đặc điểm		Giới				Tổng	
		Nam		Nữ			
		SL	%	SL	%	SL	%
Chấm xuất huyết	Có	159	44,4	155	42,0	314	43,2
	Không	199	55,6	214	58,0	413	56,8
	p	0,512					
Mảng xuất huyết	Có	43	12,0	44	11,9	87	12,0
	Không	315	88,0	325	88,1	640	88,0
	p	0,971					
Xuất huyết niêm mạc	Có	132	36,9	128	34,7	260	35,8
	Không	226	63,1	241	65,3	467	64,2
	p	0,539					
Xuất huyết nội tạng	Có	5	1,4	5	1,4	10	1,4
	Không	353	98,6	364	98,6	717	98,6
	p	0,962					

Tỷ lệ xuất huyết giữa nam và nữ tương đương nhau; có xuất huyết nam 44,4%; nữ 42%. Xuất huyết dưới da của nam 12%, nữ 11,9%; xuất huyết niêm mạc của nam 36,9%, nữ 34,7%; xuất huyết nội tạng nam và nữ 1,4%. Không có sự khác biệt về tình trạng xuất huyết giữa nam và nữ với $p > 0,05$.

Bảng 3.14. Xét nghiệm công thức máu theo giới tính

Kết quả trong Bảng 3.14 cho thấy số lượng tiểu trung bình 44,8 G/l, tỷ lệ người bệnh có tiểu cầu giảm mạnh 71,6%, trong đó giới nam 75,7%) có tỷ lệ giảm cao hơn nữ (67,6%); hematocrit trung bình 0,44

Đặc điểm		Giới				Tổng	
		Nam		Nữ			
		SL	%	SL	%	SL	%
Số lượng TC (G/l) (n=718)	Giảm mạnh (<50)	268	75,7	246	67,6	514	71,6
	Giảm nhẹ (50-149)	74	20,9	103	28,3	177	24,7
	Bình thường	12	3,4	15	4,1	27	3,8
	p	0,053					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min – Max)	44,8 ± 49,0 (3-350)					
Hematocrit (l/l) (n=718)	Tăng (>0,47)	177	50	39	10,7	216	30,1
	Giảm (<0,4)	16	4,5	82	22,5	98	13,6
	Bình thường	161	45,5	243	66,8	404	56,3
	p	<0,001					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min – Max)	0,44 ± 0,06 (0,211-0,850)					
Huyết sắc tố (g/l) (n=717)	Tăng (>160)	135	38,2	25	6,9	160	22,3
	Giảm (<130)	11	3,1	65	17,9	76	10,6
	Bình thường	207	58,6	274	75,3	481	67,1
	p	<0,001					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min – Max)	145,7 ± 18,8 (71-210)					
Số lượng HC (T/l) (n=719)	Tăng (>5,4)	27	7,6	10	2,7	37	5,1
	Giảm (<4,2)	47	13,2	121	33,2	168	23,4
	Bình thường	281	79,2	233	64	514	71,5
	p	<0,001					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min – Max)	4,4 ± 0,59 (2,4-6,7)					
Số lượng BC (G/l) (n=718)	Tăng (>10,0)	60	16,9	35	9,6	95	13,2
	Giảm (<4,0)	21	5,9	46	12,6	67	9,3
	Bình thường	273	77,1	283	77,7	556	77,4
	p	<0,001					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min – Max)	7,2 ± 3,3 (1,5-22,1)					

g/l, tỷ lệ tăng hematocrit 30,1%, trong đó giới nam (50%) có tỷ lệ tăng cao hơn giới nữ (10,7%) có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; lượng

huyết sắc tố trung bình 145,7 g/l, tỷ lệ bất thường về huyết sắc tố 32,9% trong đó giới nam (41,3%) có tỷ lệ bất thường cao hơn giới nữ (24,8%) có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; trung bình số lượng hồng cầu 4,4 T/L, tỷ lệ bất thường về số lượng hồng cầu chiếm 28,5%, giới nam (20,8%) có tỷ lệ bất thường thấp hơn giới nữ (35,9%) có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$; số lượng bạch cầu trung bình 7,2 G/L, tỷ lệ bất thường bạch cầu 22,5%, trong đó tỷ lệ tăng bạch cầu giới nam (16,9%) cao hơn giới nữ (9,6%) có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

Bảng 3.17. Xét nghiệm chức năng gan theo giới tính

Đặc điểm		Giới				Tổng	
		Nam		Nữ			
		SL	%	SL	%	SL	%
AST (U/l) (n=669)	Tăng cao	9	2,8	4	1,2	13	1,9
	Tăng vừa	24	7,4	31	9,0	55	8,2
	Tăng nhẹ	267	81,8	255	74,3	522	78,1
	Bình thường	26	8,0	53	15,5	79	11,8
	p	<0,008					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min - Max)	209 ± 353,8 (12,8 - 5677,4)					
ALT (U/l) (n=673)	Tăng cao	5	1,5	2	0,6	7	1,0
	Tăng vừa	16	4,9	14	4,1	30	4,5
	Tăng nhẹ	232	70,5	228	66,2	460	68,3
	Bình thường	76	23,1	100	29,1	176	26,2
	p	<0,222					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min - Max)	130,8 ± 192,7 (3,1 - 2427,9)					
Bilirubin TT ($\mu\text{mol/L}$) (n=390)	Tăng (>5)	51	26,2	17	8,7	68	17,4
	Bình thường (0-5)	144	73,8	178	91,3	322	82,6
	p	<0,001					
	$\bar{X} \pm SD$ (Min - Max)	4,3 ± 10,3 (0 - 171)					
Bilirubin TP	Tăng	34	13,6	6	2,3	40	7,9
	Bình thường	216	86,4	252	97,7	468	92,1

(μmol/L) (n=508)	p	<0,001
	$\bar{X} \pm SD$ (Min - Max)	12,8 ± 15,9 (1,2 - 287,8)

Tỷ lệ tăng AST mức độ vừa và cao là 10,1%, giới nam và nữ là 10,2%. Tỷ lệ tăng ALT mức độ vừa và cao 6,5%, giới nam 6,4%, nữ 4,7%; tỷ lệ tăng bilirubin TT 17,4%, giá trị trung bình 12,8 μmol/l, giới nam 26,2%, nữ 8,7%; tỷ lệ tăng bilirubin TP 7,9%, giá trị trung bình 4,3 μmol/l giới nam 13,6%, nữ 2,3%. Có sự khác biệt giữa các mức độ AST, CPT, bilirubin TT, bilirubin TP với giới tính có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3.23. Môi liên quan giữa tiền sử bệnh và mức độ bệnh sốt xuất huyết Dengue

Tiền sử bệnh		Mức độ bệnh			OR 95% CI	P
		SXHD và SXHD có DHCB	SXHD nặng	Tổng		
Sốt xuất huyết	Có	7	1	8	3,5 (0,41 - 29,6)	0,246
	Không	691	28	719		
	Tổng	698	29	727		
Tăng huyết áp	Có	33	1	34	0,71 (0,09 - 5,45)	0,750
	Không	665	28	693		
	Tổng	698	29	727		
Viêm dạ dày	Có	85	5	90	1,5 (0,55 - 4,04)	0,420
	Không	613	24	637		
	Tổng	698	29	727		
Viêm gan	Có	45	4	49	2,32 (0,77 - 6,96)	0,133
	Không	653	25	678		
	Tổng	698	29	727		
Đái tháo đường	Có	23	2	25	2,17 (0,48 - 9,69)	0,309
	Không	675	27	702		
	Tổng	698	29	727		
Bệnh lý mạn tính	Có	103	6	109	1,5 (0,59 -	0,384
	Không	595	23	618		

Tiền sử bệnh		Mức độ bệnh			OR 95% CI	P
		SXHD và SXHD có DHCB	SXHD nặng	Tổng		
khác	Tổng	698	29	727	3,79)	

Đa phần người có tiền sử mắc bệnh mạn tính đều có nguy cơ tăng nặng tình trạng sốt xuất huyết, tuy nhiên sự kết hợp này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$

3.2. Chế tạo kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp và đánh giá hiệu quả phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue bằng kỹ thuật ELISA.

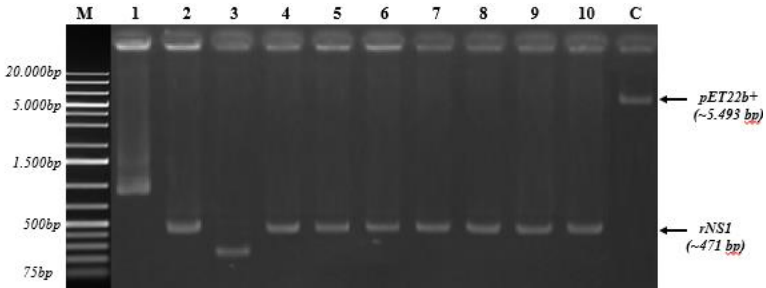
3.2.2. Tách dòng và biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 týp vi rút Dengue 1, 2, 3 và 4 trên vi khuẩn *E.coli*

3.2.2.1. Biến nạp pET22b+ – NS1 vào tế bào *E.coli* BL21

Trình tự protein tái tổ hợp sau khi được chuyển sang trình tự nucleotide được tổng hợp nhân tạo tại công ty Genscript Biotech (Piscataway, New Jersey, Hoa Kỳ) có hai loại enzym cắt giới hạn là *NdeI* và *XhoI* ở 2 đầu. Gen *NS1* nhân tạo được giữ trong vector giữ dòng pJET1.2. Khi xử lý cắt bằng 2 enzym giới hạn trên cho ra 2 băng đúng kích thước, băng trên là vector giữ dòng pJET1.2 có kích thước 2.974 bp và đoạn gen *NS1* có kích thước 471 bp

Cắt đoạn gen *NS1* trên gel agarose để thôi gel và tinh sạch bằng GenJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Sau đó nối đoạn gen *NS1* được cắt ra từ plasmid vào vector pET22b+ (đã được mở vòng) bằng T4 ligase. Hỗn hợp nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* BL21. Kiểm tra khuẩn lạc bằng PCR với cặp

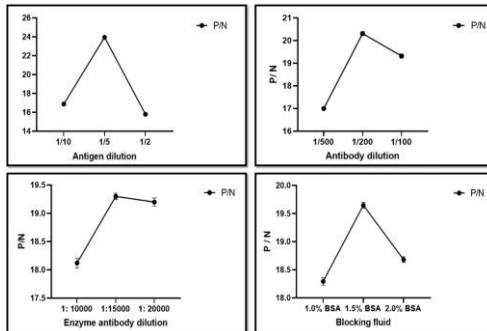
mồi NS1 Fw/Rv. Theo lý thuyết, sản phẩm PCR thu được bằng có kích thước khoảng 471 bp. Kết quả sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%



Hình 3.8. Sàng lọc tế bào *E.coli* BL21 sau biến nạp

Khuẩn lạc C (Hình 3.8) là vector pET22b+ không mang gen biến nạp (kích thước khoảng 5.493 bp). Các khuẩn lạc 2; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 có xuất hiện một băng với kích thước khoảng 471 bp đúng với tính toán lý thuyết. Từ kết quả trên, có thể thấy *E. coli* BL21 mang vector pET22b+-NS1 đã được thu nhận.

3.2.3.2. Kết quả tối ưu phản ứng ELISA NS1



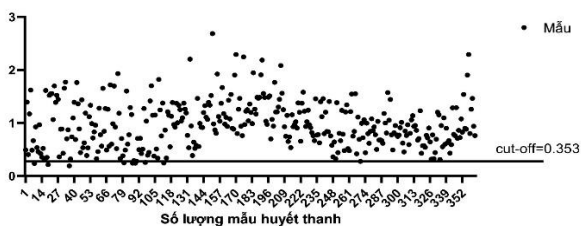
Hình 3.15. Tối ưu hóa ELISA gián tiếp sử dụng protein tái tổ hợp NS1 mang các điểm epitop nhận biết bốn týp huyết thanh DENV1-4.

(A) Tối ưu kháng nguyên tái tổ hợp rAgNS1-DENV1-4. (B) Tối ưu kháng thể kháng lại vi rút SXHD. (c) Tối ưu kháng thể cộng hợp HPR. (D) Tối ưu nồng độ blocking

Kết quả tối ưu của phản ứng ELISA gián tiếp cho thấy: kháng nguyên tái tổ hợp rAgNS1-DENV1-4 pha loãng ở tỉ lệ 1/5 (200 µg/ml), kháng thể cộng hợp pha loãng ở 1/5000 (1µl kháng thể cộng hợp trên tổng 5 ml buffer), khóa màng ở BSA 1,5% cho khả năng phản ứng tối ưu và tiết kiệm nhất (Hình 3.15).

3.2.3.3. Kết quả phát hiện kháng thể IgG và IgM trong mẫu huyết thanh người bệnh bằng kháng nguyên tái tổ hợp NS1

Từ các kết quả tối ưu ở trên, kháng nguyên tái tổ hợp phát hiện IgG/ IgM trong máu NB SXHD bằng phương pháp ELISA được áp dụng với các mẫu thu được từ hai bệnh viện (BVQY103 là 180 mẫu - Miền Bắc và BVQY175 là 186 mẫu - Miền Nam). Để xác định giá trị ngưỡng của các mẫu dương tính và âm tính, 300 mẫu huyết thanh người khỏe mạnh không có kháng nguyên và kháng thể kháng NS1 của DENV 1-4, đã được xác định bằng phản ứng realtime PCR. Kết quả cho thấy giá trị trung bình của các giá trị $OD_{450} \bar{X} = 0,284$, độ lệch chuẩn $SD = 0,07778$. Theo công thức đã trình bày ở trên giá trị ngưỡng cut-off value được xác định là 0,353 (Hình 3.16). Do đó, có thể xác định các mẫu huyết thanh dương tính kháng thể kháng NS1 của DENV 1-4 nếu giá trị OD_{450} từ 0,353 trở lên; nếu không, các mẫu có thể được xác định là âm tính.



Hình 3.16. Kết quả ELISA xác định mẫu dương tính sốt xuất huyết Dengue trong 2 nhóm nghiên cứu. Giá trị cut-off = 0,353.

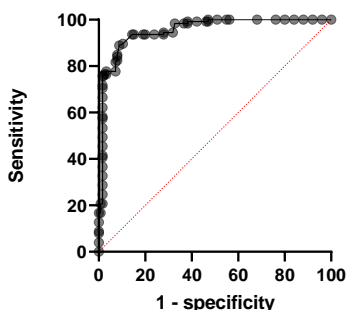
Xét nghiệm phát hiện kháng thể kháng NS1 của DENV 1-4 bằng ELISA cho kết quả ở mẫu Miền Bắc có 169/ 180 mẫu dương, 11/180 mẫu âm tính; Miền Nam kết quả có sự khác biệt so với Miền Bắc, cụ thể số mẫu dương tính là 182/186 mẫu dương, 4/186 mẫu âm tính. Như vậy, kết quả đánh giá bằng phương pháp ELISA cho thấy có tổng 351 mẫu dương tính thật và 15 trường hợp âm tính giả (Bảng 3.31). Trong 300 mẫu chứng âm, khi làm xét nghiệm miễn dịch ELISA gián tiếp xuất hiện 2 mẫu dương tính giả và 298 âm tính thật.

Bảng 3.29. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể kháng NS1 bằng rAgNS1-DENV1-4

ELISA	Realtime RT-PCR		Tổng
	(+)	(-)	
(+)	351	2	ELISA (+) = 353
(-)	15	298	ELISA (-) = 313
Tổng	366	300	666
Se (%)	95,90		

Sp (%)	99,33
PPV (%)	99,43
NPV (%)	95,21

Áp dụng theo công thức tính độ nhạy, độ đặc hiệu, dự đoán dương, và dự đoán âm theo công thức ở phần phương pháp cho thấy bộ xét nghiệm định tính ELISA gián tiếp cho độ nhạy 95,9% và độ đặc hiệu 99,33% với ngưỡng cut-off 0,353. Giá trị tiên đoán âm tính là 95,21%, trong khi giá trị tiên đoán dương tính là 99,43 %.



Hình 3.17. Đường cong ROC đánh giá độ tin cậy của kháng nguyên tái tổ hợp NS1 trong xét nghiệm ELISA

Biểu đồ ROC (receiver operating characteristic) có trục tung Y là tỉ lệ dương tính thật, và trục hoành X là tỉ lệ dương tính giả (1 – độ đặc hiệu) so sánh giữa các điểm cut off của kết quả ELISA gián tiếp sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 tít với kết quả từ tiêu chuẩn vàng realtime RT-PCR cho mỗi người bệnh. Các điểm trên tọa độ đại diện cho một ngưỡng cắt giới hạn phân loại, nhiều điểm như thế tạo thành một đường cong có xu hướng tiến sát về điểm tiệm cận 1. Đường cong

này luôn hướng lên phía trên, nếu nó vòng xuống chứng tỏ kết quả đang sai và phần xử lý kết quả chưa thỏa đáng. Đường biểu diễn càng lệch về phía bên trên và bên trái thì sự phân biệt giữa 2 trạng thái (mắc sốt xuất huyết dengue hoặc không) càng rõ. Để đánh giá độ tin cậy của một bộ dữ liệu, quan sát số liệu từ diện tích dưới đường cong AUC (Area Under the Curve), diện tích càng lớn, độ chính xác càng cao. Phần mềm GraphPad Prism 9.0.0 hiển thị diện tích dưới đường cong AUC là 0,9541 với giá trị P value < 0.0001 (Hình 3.17). Với ngưỡng AUC Điều này chứng tỏ kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 chủng Dengue đạt ngưỡng giá trị tốt trong phát hiện IgG/IgM trên NB SXHD.

Chương 4 **BÀN LUẬN**

4.1. Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở người bệnh sốt xuất huyết Dengue điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175 năm 2022.

Nghiên cứu này được tiến hành tại hai Bệnh viện Quân đội (BVQY103 và BVQY175), đây là hai Bệnh viện được đặt tại miền Bắc và miền Nam Việt Nam và đều tham gia cấp cứu và điều trị cho cả bộ đội và nhân dân. 727 người bệnh nhập viện được xét nghiệm, chẩn đoán và điều trị SXHD, tuổi trung bình của đối tượng nghiên cứu là 36,8 tuổi, trong đó nhỏ nhất là 8 tuổi và lớn nhất là 80 tuổi; đa phần phân bố tuổi tập trung từ 18 đến dưới 60 tuổi chiếm 91,1%.

Triệu chứng cơ năng của các đối tượng nghiên cứu, sốt chiếm đa số 77,4%; đau đầu 69,9%; đau mỏi cơ 63,1%; đau khớp 48,4%; buồn nôn 37,6%, nôn 18,2%; Các triệu chứng của dấu hiệu cảnh báo SXHD gồm: chảy máu cam 6,7%; chảy máu chân răng 24,5%; rong kinh 4,1%; nôn ra máu 0,6%; đi ngoài phân đen 4,3%; tiểu ít 1,1%. Các triệu chứng cơ năng của đối tượng tham gia nghiên cứu gồm các nhóm triệu chứng toàn thân, triệu chứng biểu hiện của nhiễm vi rút,

triệu chứng trên hệ tiêu hóa và các triệu chứng liên quan đến xuất huyết, tỷ lệ sốt 74,7% thấp hơn các nghiên cứu khác (96,9%), tuy nhiên vì đối tượng thu tuyển là các NB nhập viện, chính vì thế tình trạng sốt khi nhập viện sẽ giảm dần và người bệnh vào điều trị ở giai đoạn nguy hiểm của SXHD. Các triệu chứng của nhiễm vi rút xuất hiện với tỷ lệ từ 7% đến 63,1% bao gồm đau người, đau cơ khớp và đau hốc mắt; các tỷ lệ này cao hơn so với nghiên cứu ở vụ dịch năm 2019. Các triệu chứng về tiêu hóa có tỷ lệ từ 0,4% đến 36,7% với các triệu chứng đau vùng gan, buồn nôn, nôn và đi ngoài phân lỏng, so với vụ dịch 2019 kết quả của luận án thấp hơn, chỉ duy nhất tỷ lệ buồn nôn cao hơn, cụ thể ở vụ dịch 2019 tỷ lệ các triệu chứng tiêu hóa nằm trong khoảng từ 2,1% đến 29,7%. Các biểu hiện xuất huyết có tỷ lệ từ 0,6% đến 24,5%; trong đó các biểu hiện nôn ra máu, đi ngoài phân đen với tỷ lệ 0,6 và 4,3%, nghiên cứu này cho kết quả thấp hơn của năm 2017 (10,1%) nhưng cao hơn năm 2019 (2,7%) trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Trường và CS đánh giá trên hai vụ dịch SXHD năm 2017 và 2019.

Tỷ lệ sốt trước khi nhập viện ở giới nam là 77,4%; giới nữ là 77,5%; Tỷ lệ NB bị sốt cao và rất cao 32,6%; 16,8% nhập viện đã hết giai đoạn sốt. Sự khác biệt về mức độ sốt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Thời gian sốt đa phần dưới 7 ngày, có 2,5% có sốt kéo dài trên 7 ngày. Kiểu khởi phát sốt: đa phần khởi phát đột ngột 72,2%; sốt kèm theo có sốt nóng 85,5%, gai rét 75,1% và có rét run 3,5%. Tỷ lệ sốt vừa và sốt cao trong nghiên cứu này thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Tú (2022), với tỷ lệ sốt vừa và sốt cao 99,2% đánh giá ở năm 2016; 94,4% đánh giá năm 2017, lý giải cho điều này có thể do cách chọn đối tượng nghiên cứu trong luận án là những NB nhập viện có dấu hiệu cảnh báo, đối với SXHD đặc điểm chung sẽ giảm sốt sau 3 ngày vì thế làm cho tỷ lệ sốt bị giảm đi. Số NB có ngày sốt kéo dài trên 4 ngày trong nghiên cứu này là 54,7% thấp hơn nhiều so với nghiên cứu Nguyễn Thị Thanh Tú (2022) 93,8%.

Tỷ lệ chàm xuất huyết giữa nam và nữ tương đương nhau; xuất huyết nam 44,4%; nữ 42%. Mảng xuất huyết của nam 12%, nữ 11,9%; xuất huyết niêm mạc của nam 36,9%, nữ 34,7%; xuất huyết nội tạng nam và nữ 1,4%. Khi so sánh với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Tú ở hai giai đoạn năm 2016 và 2017 cho thấy kết quả của nghiên cứu này thấp hơn, cụ thể năm 2016 là 83% và năm 2017 là 84,4%; nhưng xuất huyết niêm mạc cao hơn (35,8%) khi tính tổng hợp của hai năm 2016 và 2017 là 32,6%; Tỷ lệ xuất huyết nội tạng trong nghiên cứu (1,4%) thấp hơn nhiều so với nghiên cứu này 17,4%. Lý giải cho tỷ lệ thấp hơn có thể do sự bùng nổ dịch SXHD năm 2016-2017 dẫn đến tỷ lệ được nhập viện điều trị thường ưu tiên NB có biểu hiện nặng hơn, chính vì thế các triệu chứng của NB thường nặng hơn so với những năm dịch lẻ tẻ.

Số lượng tiểu cầu trung bình 44,8 G/L, tỷ lệ NB có tiểu cầu giảm mạnh 71,6% , trong đó giới nam 75,7%) có tỷ lệ giảm cao hơn nữ (67,6%); hematocrit trung bình 0,44 g/l, tỷ lệ tăng hematocrit 30,1%, trong đó giới nam (50%) có tỷ lệ tăng cao hơn giới nữ (10,7%) có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; lượng huyết sắc tố trung bình 145,7 g/l, tỷ lệ bất thường về huyết sắc tố 32,9% trong đó giới nam (41,3%) có tỷ lệ bất thường cao hơn giới nữ (24,8%) có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; trung bình số lượng hồng cầu 4,4 T/L, tỷ lệ bất thường về số lượng hồng cầu chiếm 28,5%, giới nam (20,8%) có tỷ lệ bất thường thấp hơn giới nữ (35,9%) có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$; số lượng bạch cầu trung bình 7,2 G/L, tỷ lệ bất thường bạch cầu 22,5%, trong đó tỷ lệ tăng bạch cầu giới nam (16,9%) cao hơn giới nữ (9,6%) có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nghiên cứu này có một số chỉ số cũng tương đồng với nghiên cứu của Arshad và CS năm 2022 về các chỉ số như huyết sắc tố 137,2 g/L; hematocrit 0,41 L/L, số lượng bạch cầu trung bình 6,86 G/L, tuy nhiên số lượng tiểu cầu lại cao hơn 145,23 G/L. Khi so sánh với nghiên cứu của Nguyễn Văn Trường và CS năm 2020 cho thấy các giá trị của hồng cầu, hematocrit tương tự như nghiên cứu

này, tuy nhiên số lượng tiêu cầu trong nghiên cứu này thấp hơn, nhưng số lượng bạch cầu lại cho giá trị cao hơn.

Tỷ lệ tăng AST mức độ vừa và nặng 10,1% ở giới nam và khoảng 10,2% ở nữ. Tỷ lệ tăng ALT mức độ vừa và nặng 6,5%, giới nam 6,4%, nữ 4,7%; tỷ lệ tăng bilirubin TT 17,4%, giá trị trung bình 12,8 $\mu\text{mol/l}$, giới nam 26,2%, nữ 8,7%; tỷ lệ tăng bilirubin TP 7,9%, giá trị trung bình 4,3 $\mu\text{mol/l}$ giới nam 13,6%, nữ 2,3%. Có sự khác biệt giữa các mức độ AST, CPT, bilirubin TT, bilirubin TP với giới tính có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Chỉ số enzyme AST và ALT và bilirubin TP trong nghiên cứu của luận án cao hơn nhiều so với nghiên cứu của Akash Khetpal và CS (2021) trong đó AST, ALT và bilirubin TP lần lượt là 54 U/L, 28,5 U/L và 9,5 g/L. Tỷ lệ tổn thương gan cao hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Văn Trường và CS năm 2017 và 2019 với tỷ lệ 77,9% và 75,53%. Nghiên cứu này cho kết quả AST và ALT tương đương Ren và CS (2022) 94,0 U/L và 110 U/L.

Đa phần người có tiền sử mắc bệnh mạn tính đều có nguy cơ tăng nặng tình trạng SXHD, tuy nhiên sự kết hợp này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Tiền sử NB đã từng bị SXHD, viêm gan, đái tháo đường đều có nguy cơ tăng nặng tình trạng SXH với OR > 2 lần, tuy nhiên trong nghiên cứu này sự kết hợp này không có ý nghĩa thống kê. Trong thực hành lâm sàng những NB có tiền sử như vậy cần lưu ý trong quá trình chăm sóc điều trị đối với những NB nhóm này. Nghiên cứu này cũng cho kết quả tương tự nghiên cứu của Trần Thị Vân Anh, chưa có sự kết hợp có ý nghĩa giữa người có bệnh nền và không bệnh nền với tình trạng tăng nặng SXHD.

4.2. Chế tạo kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp và đánh giá hiệu quả phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue bằng kỹ thuật ELISA.

Trong nghiên cứu của Das và CS năm 2019, nhóm nghiên cứu đã mô tả một phương pháp đơn giản và hiệu quả để biểu hiện NS1 ở

E.coli, phương pháp này có khả năng được sử dụng để phát triển các kháng thể đơn dòng và đặc hiệu kép cho chẩn đoán điểm chăm sóc. Gen NS1 tổng hợp có chiều dài đầy đủ, tối ưu hóa của E. coli thuộc tít huyết thanh 1 (DENV-1) đã được nhân bản thành công và biểu hiện ở mức độ rất cao dưới dạng thể vùi. Protein NS1 đã được tinh chế và tái gấp lại thành công bằng ái lực dưới dạng protein NS1 (rNS1) tái tổ hợp ở E. coli và hiệu suất nuôi cấy vi khuẩn là 230-250 mg/L. Protein rNS1 được sử dụng để tạo miễn dịch cho chuột phát triển tế bào lai.

Như vậy có thể thấy E. coli có tiềm năng rất tốt để tách dòng và biểu hiện gen NS1 đặc trưng cho cả 4 tít huyết thanh vi rút Dengue. Do đó, trong nghiên cứu này, E. coli đã được chọn để biểu hiện và tách dòng gen NS1 đặc trưng cho cả 4 tít huyết thanh vi rút Dengue đã thiết kế được.

Quá trình biến nạp DNA plasmid vào tế bào E. coli đã được thực hiện bằng phương pháp sốc nhiệt, trong đó, trước khi sốc nhiệt, tế bào đã được làm lỏng màng trong dung dịch CaCl₂ để tăng khả năng tiếp nhận DNA plasmid. Sử dụng chủng vi khuẩn E. coli BL21, nghiên cứu này đã thành công biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp pET-22b(+)/NS1-DENV1-4 vào tế bào. Các tế bào biến nạp được lựa chọn dương tính trên môi trường agar có kháng sinh ampicilin. Thông qua kiểm tra PCR với cặp mồi T7 F và T7 R và giải trình tự Sanger đoạn gen thu được và kiểm tra trình tự đó với trình tự gen đã thiết kế, kết quả Hình 3.7 và 3.8 với kích thước sản phẩm đoạn gen nhân lên khoảng 471bp và trình tự hoàn toàn trùng khớp với trình tự đoạn gen NS1 đã được thiết kế. Những kết quả này chứng tỏ rằng đã thiết lập thành công cấu trúc biểu hiện gen NS1-DENV1-4 trong tế bào E. coli BL21.

Cho đến nay, realtime RT-PCR đã được công nhận là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán và định tít huyết thanh DENV, tuy nhiên vẫn có một số nhược điểm, bao gồm cả kết quả âm tính giả và dương tính giả và đặc biệt là cần trang bị máy móc đắt tiền cũng như phòng thí

nghiệm kèm theo rất chuyên sâu và một đội ngũ kỹ thuật viên được đào tạo sâu về kỹ thuật sinh học phân tử. Điều này gây khó khăn cho việc triển khai ở tuyến cơ sở cũng như trong cộng đồng nhất là tại các vùng dịch phức tạp. Do đó, rất cần có một công cụ đơn giản để triển khai để công tác chẩn đoán được nhanh hơn từ đó kiểm soát dịch sốt xuất huyết được tốt hơn..

Đánh giá sơ bộ cho thấy sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp rAg-NS1-DENV1-4 cho thấy sự tương đồng cao với với 2 kit test nhanh thương mại để xét nghiệm IgM/IgG. Khi trên 20 ngày mắc bệnh, độ nhạy vẫn đạt ngưỡng 89% nhưng giai đoạn này sẽ dễ nhầm với các kháng thể IgG của các bệnh khác trong chi flavivirus (Zika, Chikungunya, viêm não Nhật Bản,...). Do đó với những ca bệnh được xác định thời gian khởi phát đã lâu, nên kết hợp nhiều phương pháp xét nghiệm cùng với các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng để kết luận bệnh.

Trong y văn, tỷ lệ xét nghiệm NS1 dương tính giả chỉ cho phép nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2,0%. Kết quả nghiên cứu này cho thấy thông qua kỹ thuật ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp rAgNS1-DENV1-4 có độ nhạy, độ đặc hiệu, dự đoán dương và dự đoán âm từ 95,21 - 99,43, thấp hơn so với giá trị xác định khi sử dụng phương pháp RT-PCR.

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở người bệnh sốt xuất huyết Dengue điều trị nội trú tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175 năm 2022.

Nghiên cứu 727 người bệnh sốt xuất huyết Dengue được nhập viện điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175 trong thời gian từ tháng 01/2022 đến tháng 12/2022, cho thấy:

- Về lâm sàng
- + Sốt xuất huyết Dengue mức độ nặng chiếm tỷ lệ 3,98%; tỷ lệ người bệnh bị sốc sốt xuất huyết Dengue là 1,3%.

+ Đặc điểm sốt: khi nhập viện có 77,4% sốt; sốt cao và rất cao chiếm 32,6%; sốt nóng 85,5%; sốt gai rét: 75,1%; sốt rét run : 3,5%. Thời gian sốt từ 1-3 ngày: 45,3%, sốt 4-7: ngày 52,2%, sốt trên 7 ngày: 2,5%.

+ Đặc điểm xuất huyết: Chấm xuất huyết chiếm tỷ lệ 43,2%, mảng xuất huyết 12,0%; xuất huyết niêm mạc 35,8% và xuất huyết nội tạng 1,4%.

+ Triệu chứng đau đầu: 69,9%; đau người (cơ): 63,1%; đau khớp: 48,4%; đau hồ mắt: 7,0%; buồn nôn: 37,6%; nôn: 18,2%; nôn ra máu: 0,6%; đại tiện phân đen: 4,3%; tiêu chảy: 12%.

+ Tuổi cao trên 60 tuổi có nguy cơ tăng mức độ nặng sốt xuất huyết Dengue. Một số yếu tố nguy cơ như đã từng bị sốt xuất huyết Dengue, viêm gan, đái tháo đường có nguy cơ tăng nặng tình trạng sốt xuất huyết Dengue, tuy nhiên sự kết hợp chưa có ý nghĩa thống kê.

- Về cận lâm sàng

+ Tỷ lệ giảm tiểu cầu chiếm 96,3%; Hematocrit tăng là 30,1%; Tỷ lệ tăng AST và ALT là 88,2% và 73,8%; tăng Bilirubin TT và Bilirubin TP là 17,4% và 7,9%.

+ Tỷ lệ bất thường về Albumin chiếm 27,3%; Glucose là 52,8%; Ure và Creatinin 16,8%; CRP là 25,6%.

+ Định danh týp huyết thanh bằng qRT-PCR xác định được cả 4 týp, phân bố đều ở 2 bệnh viện (BVQY103 và BVQY175), trong đó DENV 1 và 2 phổ biến nhất, trong khi DENV 3 và 4 ít phổ biến hơn ở các mẫu nghiên cứu

2. Chế tạo kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp 4 týp và đánh giá hiệu quả phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue bằng kỹ thuật ELISA.

Đã tổng hợp được kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp chung cho 4 týp vi rút Dengue trên tế bào E.coli có độ tinh sạch $\geq 95\%$, hàm lượng 0,347mg/ml và có hoạt tính kháng nguyên khi kiểm tra bằng phương pháp Western blot.

Sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 týp để phát hiện kháng thể kháng NS1 của vi rút Dengue bằng kỹ thuật ELISA gián tiếp ở quy mô phòng thí nghiệm có độ nhạy 95,9%, độ đặc hiệu 99,33%, dự đoán dương 95,21% và dự đoán âm 99,43%.

KHUYẾN NGHỊ

1. Cần tiến hành biểu hiện protein NS1 tái tổ hợp ở các hệ thống biểu hiện khác nhau để tạo được protein có độ tinh sạch và hoạt tính cao nhất.

2. Cần tiếp tục triển khai nghiên cứu về tính ổn định của kháng nguyên tái tổ hợp gộp 4 týp vi rút Dengue.

CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ

1. Hoàng Xuân Cường, Đỗ Như Bình, Vũ Minh Thương, Bùi Thùy Linh, Nguyễn Thị Thanh Thảo, Trương Công Định, Bùi Minh Trường, Bùi Thế Ngọc, Lâm Thảo Nguyên, Võ Thị Bích Thủy (2023), “Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên tái tổ hợp NS1 chung bốn chủng vi rút Dengue trong vi khuẩn *Escherichia Coli*”. *Tạp chí Y dược học quân sự*, Tập 48, tháng 6/2023 (số 6), tr: 16-23 .

2. Hoàng Xuân Cường, Đỗ Như Bình, Vũ Tùng Sơn, Đào Đức Tiến, Võ Thị Bích Thủy (2023), “Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue điều trị nội trú tại một số bệnh viện quân đội năm 2022”. *Tạp chí Y dược lâm sàng 108*, Tập 18, tháng 8/2023 (số 8), tr: 27-33.

3. Hoang Xuan Cuong, Vu Minh Thuong, Do Nhu Binh, Dao Duc Tien, Bui Thuy Linh, Vo Thi Bich Thuy (2023), “Prediction of conservative epitopes in the NS1 sequences of all four Dengue virus serotypes”. *Tạp chí công nghệ sinh học*, Tập 21, tháng 9/2023 (số 3), tr: 443-454.

4. Hoàng Xuân Cường, Đỗ Như Bình, Vũ Tùng Sơn, Nguyễn Thái Quỳnh Anh, Vũ Minh Thương, Võ Thị Bích Thủy (2024), “Ứng dụng kháng nguyên NS1 tái tổ hợp gộp bốn týp vi rút Dengue để phát hiện kháng thể IgM/IgG trong máu người bệnh mắc sốt xuất huyết Dengue”. *Tạp chí Y dược học quân sự*, Tập 49, tháng 3/2024 (số 3), tr: 53-62.