

SO SÁNH KỸ THUẬT INOLIPA VÀ KỸ THUẬT SEQUENCING TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH GENOTYPE HCV

Tóm tắt:

Chẩn đoán chính xác tác nhân HCV là mục tiêu quan tâm hàng đầu của các bác sĩ, từ đó tiến hành điều trị, theo dõi diễn tiến và biến chứng của bệnh, phòng ngừa sự lây lan của HCV. Hiện nay trên thế giới có nhiều phương pháp xác định genotype HCV, ở Việt Nam phổ biến hai phương pháp: INOLIPA và SEQUENCING. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu và so sánh việc xác định genotype HCV của hai phương pháp INOLIPA và SEQUENCING. Việc nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp xác định kiểu gen của HCV bằng kỹ thuật lai và kỹ thuật giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR khuếch đại một đoạn DNA trên vùng 5'NC của HCV, sau đó so sánh với bảng dò (phương pháp INOLIPA) và trình tự trong thư viện kiểu gen (phương pháp SEQUENCING) để xác định kiểu gen của HCV. Kết quả thu nhận được cho thấy không có sự khác biệt về việc xác định kiểu gen HCV của hai phương pháp INOLIPA và SEQUENCING. Nghiên cứu các mẫu huyết thanh của các bệnh nhân viêm gan, xơ gan và nghi ngờ nhiễm đang điều trị tại bệnh viện trong khoảng thời gian tháng 02/2006 đến tháng 10/2006. Cho thấy bệnh nhân nhiễm các kiểu gen HCV: 1, 1a, 1b, 2, 2a/2c, 6a. Tuy nhiên, do việc nghiên cứu thực hiện trong thời gian ngắn và phạm vi hẹp nên kết quả chưa phản ánh thật chính xác về kiểu gen cũng như việc ứng dụng trong thực tiễn.

Abstract:

Exact diagnosis of HCV agent is the first goal of physicians so that they can treat, follow up its complications and preventing from the spreading of HCV. Nowadays, there are many methods for confirmation of HCV genotype. In Vietnam, Inolipa and Sequencing are common use for genotyping of HCV. The determination of HCV genotype by both methods was performed by the direct hybridization and the direct sequencing of product targetted the 5'NC of the viral genome by PCR, after that the result was matched with the genotypes in the list (Inolipa method) or compare with the sequencing in the library (Sequencing method). The results of two methods are similar for the main group, but different for the subtype. The result of HCV genotyping from 100 sample among patients with hepatitis or cirrhosis were treated in some hospital of HCM city from 02/2006 to 10/2006 were: HCV genotype 1, 1a, 1b, 2, 2a/2c, 2a, 2c, 6a. Since the study was done in a short time, the result does not inferent from factual knowledges.

Đặt vấn đề:

Viêm gan siêu vi C mạn tính là một bệnh rất nguy hiểm do không được nhận biết sớm mà chỉ được phát hiện khi có những biểu hiện: ung thư gan, xơ gan ... HCV xâm nhập thẳng vào cơ thể qua đường máu, tấn công vào tế bào gan và sinh sôi nảy nở tại đây. Đa số người bị nhiễm virus không có bất kỳ triệu chứng gì sau 6 tháng đầu bị nhiễm. Một điều quan trọng và rất nguy hiểm là đến nay vẫn chưa có vaccin phòng hay thuốc chữa lành hẳn HCV, tuy nhiên bên cạnh đó vẫn có nhiều phương pháp trị liệu được áp dụng làm ức chế sự phát triển của HCV.

Người nhiễm HCV chuyển sang mạn tính chiếm tỷ lệ cao (50% đến 80%), tỷ lệ bệnh nhân mạn tính chuyển sang xơ gan và ung thư gan từ 20% đến 25%. Chính vì thế, việc tiến hành xác định genotype là rất cần thiết và quan trọng trong quá trình điều trị bệnh vì nó quyết định thời gian điều trị bệnh, ngoài ra còn giúp theo dõi diễn tiến và biến chứng của bệnh, phòng ngừa sự lây lan của HCV.

Ngày nay, với sự phát triển công nghệ sinh học, đặc biệt là chuyên ngành công nghệ sinh học phân tử đã cho ra đời các phương pháp xác định kiểu gen của HCV. Trên thế giới hiện nay có nhiều công ty: Bayer, Beckman Coulter, QIAgen, Roche ... đã cho ra đời các bộ kit xác định genotype HCV, tuy nhiên do giá thành khá đắt nên chưa được áp dụng rộng rãi. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu và so sánh độ phù hợp giữa hai phương pháp Inolipa và Sequencing nhằm đáp ứng cho quá trình theo dõi và điều trị cho bệnh nhân nhiễm HCV.

Vật liệu và phương pháp

Đối tượng:

Chúng tôi tiến hành xác định kiểu gen HCV của 100 bệnh phẩm nhiễm virus viêm gan C từ các bệnh viện (Hoàn Mỹ, Nhiệt Đới, Triều An) từ 02/2006 đến 10/2006. Thực hiện tại Phòng Nghiên cứu và Phát triển (Research & Development), Công ty TNHH Sản xuất - Thương mại - Dịch vụ Nam Khoa, 793/58 Trần Xuân Soạn, Quận 7, Tp Hồ Chí Minh.

Phương pháp xét nghiệm:

Đầu tiên, tiến hành ly trích RNA của HCV từ mẫu huyết thanh của bệnh nhân có HCV dương tính; sau đó được phiên mã ngược thành cDNA. cDNA được khuếch đại thành sản phẩm PCR mạch ngoài với cặp mồi đặc hiệu mạch ngoài.

Định type HCV:

Kỹ thuật INOLIPA:

Sản phẩm PCR tiếp tục được khuếch đại một lần nữa với cặp mồi trong mà trong đó có một mồi gắn biotin. Nhờ vậy, sản phẩm cuối cùng trước khi lai sẽ có kích thước 244bp và có một đầu gắn biotin. Lai sản phẩm PCR vòng trong gắn biotin trên các vạch đoạn dò genotype đặc hiệu, nhờ đó phát hiện sản phẩm lai bằng cộng hợp là streptavidin – phosphatase alkaline. Sau đó tiến hành lai sản phẩm PCR đã có với các que (strip) của bộ thuốc thử Lipa. Trên mỗi strip có gắn sẵn các vạch dò (probe) chuyên biệt cho từng genotype của HCV.

Kỹ thuật SEQUENCING:

Tiến hành tinh sạch sản phẩm, loại bỏ primer và tạp chất, chỉ giữ lại sản phẩm PCR product. Sản phẩm lại tiếp tục được khuếch đại lần nữa với đoạn mồi khác. Tiếp theo sản phẩm lại tiếp tục được tinh sạch lần nữa nhằm tạm ngưng phản ứng; loại trừ tất cả các primer và tạp chất còn lại chỉ giữ DNA. Tiến hành giải mã trình tự của đoạn DNA vừa thu được có kích thước 244bp. Từ DNA, thực hiện PCR với các cặp mồi đặc hiệu trên vùng không mã hóa 5' để đặt được sản phẩm khuếch đại ở đoạn đặc hiệu 244 bp. Sau đó tiến hành giải trình tự bằng máy Sequence CEQ 8000 của Beckman Coulter. Dựa vào trình tự đã giải mã, tiến hành so sánh độ tương đồng với các trình tự kiểu gen chuẩn có trong GeneBank để xác định genotype và thông tin. [10]

Kết quả:

100 mẫu HCV được tiến hành định type đồng thời bằng hai phương pháp Inolipa và Sequencing

Bảng 1: Kết quả type chính

Genotype	Inolipa (n=100)	Sequencing (n=100)
1	58	58
2	19	19
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	23	23

Bảng 2: Kết quả subtype

Subtype	Inolipa (n=100)	Sequencing (n=100)
1	10	10
1a	8	8
1b	40	40
2	4	4

2a	?	9
2c	?	6
2a/2c	15	
6a	23	23

Bàn Luận

Việc xác định genotype HCV bằng phương pháp InoLIPA trong chẩn đoán kiểu gen của virus HCV gây viêm gan được tiến hành ở tất cả các phòng thí nghiệm PCR do dễ thực hiện không đòi hỏi máy móc trang thiết bị và kỹ thuật cao. Tuy nhiên, do không xác định được kiểu gen cụ thể và phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn hoá chất nước ngoài nên không chủ động trong việc nghiên cứu.

Việc xác định genotype HCV bằng phương pháp Sequencing trong chẩn đoán kiểu gen của virus HCV gây viêm gan cần có các máy móc trang thiết bị hiện đại và điều kiện kỹ thuật cao nên chủ yếu được thực hiện ở các trung tâm nghiên cứu. Nhưng lại xác định kiểu gen cụ thể, có ý nghĩa trong nghiên cứu sự biến đổi vùng gen mà phương pháp INOLIPA không thực hiện được. Bên cạnh đó có thể chủ động trong việc nghiên cứu.

Kỹ thuật HCV InoLIPA và kỹ thuật HCV Sequencing trong chẩn đoán kiểu gen của virus HCV gây viêm gan hoàn toàn phù hợp về kết quả thu nhận. Tuy nhiên, kỹ thuật Sequencing có nhiều tính ưu việt hơn trong việc xác định kiểu gen: là sự chính xác, tránh được những nhầm lẫn do những quasispecies gây ra trên cùng một type hoặc subtype, chủ động trong công tác nghiên cứu nhằm ứng dụng trong điều trị lâm sàng so với kỹ thuật InoLIPA.

Kỹ thuật Sequencing và kỹ thuật InoLIPA trong chẩn đoán xác định kiểu gen của virus HCV gây viêm gan rất có ý nghĩa trong công tác điều trị và theo dõi bệnh.

Kết quả Inolipa và Sequencing hoàn toàn chính xác với độ tin cậy 100%.

Kết Luận

Chúng tôi đã tiến hành so sánh trên 100 mẫu và xác định được kiểu gen của HCV gây viêm gan bằng các kỹ thuật khác nhau: kỹ thuật InoLIPA và kỹ thuật Sequencing. Tiến hành so sánh độ phù hợp giữa các kỹ thuật và thấy rằng không có sự khác biệt giữa hai phương pháp InoLIPA và Sequencing về kết quả. Nhưng phương pháp Sequencing có tính ưu việt hơn do xác định được kiểu gen cụ thể. Vì vậy phương pháp này có thể được ứng dụng rộng rãi trong quá trình xác định genotype HCV trong công tác nghiên cứu và điều trị bệnh.

Đề Nghị

Đây là những phương pháp còn rất mới trong quá trình tiến hành chẩn đoán và điều trị bệnh, chưa được ứng dụng rộng rãi ở Việt Nam, chỉ đang phổ biến ở các thành phố lớn, nên công tác tiến hành nghiên cứu còn khó khăn nên không tránh khỏi những sai sót. Chúng tôi đề nghị tiếp tục tiến hành nghiên cứu thêm ở phạm vi rộng hơn để có thể cho kết quả chính xác hơn. Đáp ứng được yêu cầu nghiên cứu và điều trị bệnh có hiệu quả hơn.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Hưng Van, *Direct sequencing the PCR product for genotype of HCV*, 2006, Nam Khoa R&D Group, Ho Chi Minh City.
2. Said H.S.A., *Laboratory diagnosis of viral hepatitis C*, 2003, Sultan Qaboos University, Oman.
3. Bruno s. Silini e - Crosignani a; Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: *A prospective study*, *Hepatology*; 1997;25:734 – 758.
4. Bộ Y Tế – Viện Thông Tin Thư Viện Y Học Trung Ương, *Tạp chí thông tin Y Dược số Chuyên đề gan mật*, 2004, Hà Nội.
5. <http://www.bayer.com/inolipa>.
6. Phạm Hưng Van, *RNA extraction using Chomzynski method with RNAPREP kit*, 2002, Nam Khoa R&D Group, Ho Chi Minh City.
7. Hồ Quỳnh Thùy Dương, *Sinh học phân tử*, 2003, NXB Giáo Dục, TP.HCM.
8. Bùi Chí Bửu – Nguyễn Thị Lang, *Di truyền phân tử*, NXB Nông Nghiệp.

9. Lê Đình Lương – Quyền Đình Thi, *Kỹ thuật di truyền và ứng dụng*, 2004, NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội.
10. <http://www.beckmancoulter.com/sequence>