

## ỨNG DỤNG KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG mAbNS1-DENV1-4 PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN NS1 CỦA CÁC TÝP VIRUS DENGUE BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA

Đỗ Như Bình<sup>1</sup>, Hoàng Xuân Cường<sup>1,2</sup>, Trần Thị Hồng Thịnh<sup>3</sup>  
Võ Thị Bích Thủy<sup>3</sup>, Trịnh Thế Sơn<sup>1</sup>, Phạm Hùng Tiến<sup>2,4\*</sup>

### Tóm tắt

**Mục tiêu:** Sử dụng kỹ thuật ELISA với thành phần là kháng thể đơn dòng được tạo ra từ kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp bốn tít DENV1-4 để phát hiện căn nguyên gây bệnh sốt xuất huyết. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm labo, kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV đặc hiệu kháng NS1 của 4 tít virus Dengue được sử dụng để phát triển và tối ưu hóa xét nghiệm ELISA gián tiếp, cho phép phát hiện chính xác DENV1-4 trong huyết thanh bệnh nhân (BN). So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu với phương pháp real-time PCR. **Kết quả:** Kỹ thuật ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 có độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 97,75%, giá trị dự đoán dương 98,37% và giá trị dự đoán âm 100%. Hơn nữa, xét nghiệm này đặc biệt phát hiện cả kháng nguyên NS1 DENV-4 trong nhóm mẫu nghi ngờ (9/63). **Kết luận:** Kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 có giá trị ứng dụng chẩn đoán nhanh các tít DENV với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

**Từ khóa:** Sốt xuất huyết Dengue; Kháng thể đơn dòng; Độ nhạy; Độ đặc hiệu.

## APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY mAbNS1-DENV1-4 TO DETECT NS1 ANTIGEN OF FOUR TYPES OF DENGUE VIRUS BY ELISA METHODS

### Abstract

**Objectives:** Using the ELISA technique with monoclonal antibodies made from recombinant NS1 antigen of four types DENV1-4 to detect Dengue Hemorrhagic Fever disease. **Methods:** A laboratory experimental study monoclonal antibody mAbNS1-DENV

---

<sup>1</sup>Học viện Quân y

<sup>2</sup>Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Trường Đại học Y tế Công cộng

\*Tác giả liên hệ: Phạm Hùng Tiến (pht@huph.edu.vn)

Ngày nhận bài: 31/8/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 28/9/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i2.490>

specific to NS1 of four Dengue virus types was used to develop and optimize the indirect ELISA test, allowing accurate detection of DENV1-4 in patient sera. Comparison of sensitivity and specificity with real-time PCR. **Results:** ELISA technique using monoclonal antibody mAbNS1-DENV1-4 has 100% sensitivity, 97.75% specificity, 98.37% positive and 100% negative predictions. Furthermore, this assay specifically detects the NS1 antigen of DENV-4 in the group of suspected samples (9/63). **Conclusion:** The monoclonal antibody mABNS1-DENV1-4 is valuable for rapidly diagnosing DENV types with high sensitivity and specificity.

**Keywords:** Dengue Hemorrhagic Fever; Monoclonal antibodies; Sensitivity; Specificity.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Dengue là căn nguyên gây bệnh sốt xuất huyết Dengue, lây truyền qua muỗi *Aedes* spp. [1]. Tại Việt Nam, sốt xuất huyết Dengue đã trở thành dịch hàng năm và cả 4 týp virus Dengue đã được xác định đang lưu hành, phân bố khắp cả nước [2]. Biểu hiện lâm sàng chủ yếu của bệnh là sốt cấp diễn và xuất huyết với nhiều dạng khác nhau, đặc biệt có thể tử vong do giảm lượng máu lưu hành dẫn đến tình trạng sốc [1, 2].

Hiện nay, chẩn đoán chính xác nhiễm virus Dengue chủ yếu dựa vào các xét nghiệm như sinh học phân tử (RT-PCR, realtime RT-PCR) tìm RNA của virus lưu hành trong máu hoặc xét nghiệm miễn dịch phát hiện kháng nguyên NS1 đặc hiệu của virus hoặc kháng thể (IgG, IgM) kháng lại kháng nguyên

virus [1, 2, 3]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy vai trò quan trọng của kháng nguyên NS1 và là một dấu ấn sinh học quan trọng để chẩn đoán sớm bệnh sốt xuất huyết Dengue [1, 3]. Tuy nhiên, kháng nguyên NS1 khác nhau ở mỗi một týp virus Dengue, không có phản ứng chéo và không thể xác định đồng thời trong một lần xét nghiệm. Để góp phần vào việc chẩn đoán sớm bệnh và rút ngắn thời gian xác định các týp, đặc biệt là týp virus nguy hiểm như DENV 2, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm ứng dụng: *Kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 được tạo ra từ kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp bốn týp Dengue 1-4 để phát triển và tối ưu hóa xét nghiệm ELISA gián tiếp nhằm xác định kháng nguyên NS1 của cả bốn týp Dengue trong huyết thanh BN mắc sốt xuất huyết.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

\* *Đối tượng nghiên cứu:*

Kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho protein của bốn týp virus Dengue (sản phẩm của đề tài khoa học công nghệ cấp Thành phố Hà Nội, mã số 01C-08/01-2020-03), được tinh sạch được bảo quản tại -80°C.

Mẫu huyết thanh BN sốt xuất huyết Dengue và người khỏe mạnh hiến máu được thu thập từ 3 bệnh viện: Bệnh viện E (quận Cầu Giấy), Bệnh viện Đống Đa (quận Đống Đa) và Bệnh viện Thanh Nhàn (quận Hai Bà Trưng), thành phố Hà Nội. Các mẫu bệnh phẩm được bảo quản ở -20°C cho đến khi thực hiện các thí nghiệm. Tổng số 210 mẫu huyết thanh được chia thành 3 nhóm:

- Nhóm bệnh: 114 mẫu của BN sốt xuất huyết Dengue (xét nghiệm NS1 dương tính);

- Nhóm nghi ngờ: 63 mẫu thu thập thời điểm ngày 2 - 4 sau sốt (có đặc điểm lâm sàng sốt xuất huyết Dengue nhưng xét nghiệm nhanh NS1 âm tính);

- Nhóm chứng: 33 mẫu huyết thanh của người khỏe mạnh hiến máu.

\* *Vật liệu và trang thiết bị nghiên cứu:*

- Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu: Kháng thể đơn dòng thương mại Human IgG Anti-Dengue Virus NS1; Human Dengue Virus NS1 Antigen ELISA Kit, (NativeAntigen, UK); Bộ kit Sacace™ Dengue Real-TM genotype (Italia); kit tách chiết RNA virus (QIAGEN, USA); dung dịch PBS + 0.05% Tween 20; Goat anti-mouse IgG (H + L) secondary antibody HRP (Invitrogen, Hoa Kỳ); dung dịch blocking buffer (1,0% BSA, 1,5% BSA, 2,0% BSA); cơ chất TMB (Life Science Technology, Hoa Kỳ); đầu tip có lọc vô trùng; giếng ELISA (Costar Assay Plate, 96 Well, Corning, Hoa Kỳ); ống hoặc strip PCR dùng 1 lần; khay đựng ống; găng tay không bột dùng 1 lần...

- Trang thiết bị: Máy real-time PCR; Máy ly tâm để bàn cho ống 1,5/2mL; máy vortex; pipette đơn kênh và đa kênh; tủ mát, tủ âm; thùng chứa chất thải sinh học...

### 2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu thực nghiệm labo.

\* *Nội dung nghiên cứu và kỹ thuật sử dụng:*

- Tối ưu phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên NS1 gộp bốn týp DENV bằng các kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4.

## CHÀO MỪNG 75 NĂM NGÀY TRUYỀN THỐNG HỌC VIỆN QUÂN Y

Các bước tối ưu được thực hiện với từng loại nguyên liệu trong phản ứng. Cụ thể: Kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp bốn týp DENV (rAgNS1-DENV1-4, viết tắt là rAg) được pha loãng theo tỷ lệ 1/2, 1/5, và 1/10; kháng thể đơn dòng NS1 (mAbNS1-DENV1-4, viết tắt là mAb) được pha loãng 1/100, 1/200, 1/500. Hai sản phẩm rAgNS1-DENV1-4 và mAbNS1-DENV1-4 được nghiên cứu, chế tạo và thông qua Hội đồng Khoa học tại Viện Nghiên cứu hệ gen; các nồng độ pha loãng của kháng thể cộng hợp 1/10.000, 1/15.000 và 1/20.000 (Goat anti-mouse IgG (H + L) secondary antibody HRP, Invitrogen, Hoa Kỳ); các nồng độ BSA trong dung dịch blocking lần lượt là 1,0% BSA; 1,5% BSA; 2,0% BSA (Albumin, Biosesang, Hàn Quốc).

Các bước thực hiện tối ưu phản ứng ELISA được mô tả chi tiết như sau:

- Cố định 50 $\mu$ L rAg (pha loãng 1/10, 1/5, và 1/2 trong coating buffer pH 9.4) tại các vị trí trên bề mặt giếng ELISA (Costar Assay Plate, 96 Well, Corning, Hoa Kỳ) theo thứ tự thiết kế. Ủ 4 $^{\circ}$ C qua đêm;

- Loại bỏ rAg thừa: Rửa các giếng bằng cách thêm 200  $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần);

- Blocking bằng 100  $\mu$ L/giếng dung dịch blocking buffer (1,0% BSA; 1,5% BSA; 2,0% BSA) theo thứ tự thiết kế, ủ tại 37 $^{\circ}$ C/1 giờ;

- Loại bỏ blocking buffer thừa: Rửa các giếng bằng cách thêm 200 $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần);

- Bổ sung 50 $\mu$ L mAb (pha loãng 1/500, 1/200, và 1/100 trong blocking buffer chứa 1,5%BSA) vào các giếng theo thứ tự. Ủ đĩa 37 $^{\circ}$ C/1 giờ;

- Loại bỏ kháng thể đơn dòng thừa: Rửa các giếng bằng cách thêm 200  $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần);

- Bổ sung 50 $\mu$ L kháng thể cộng hợp (pha loãng 1/20.000, 1/15000, và 1/10000 trong blocking buffer chứa 1,5%BSA) vào giếng theo thứ tự. Ủ tại 37 $^{\circ}$ C/1 giờ;

- Loại bỏ kháng thể cộng hợp thừa: Rửa các giếng bằng cách thêm 200  $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần);

- Bổ sung 50 $\mu$ L cơ chất (TMB substrate, Life Science Technology, Hoa Kỳ), ủ trong tối 10 phút. TMB đã được đặt ổn định nhiệt độ phòng trước 30 phút;

- Dừng phản ứng bằng 50 $\mu$ L dung dịch HCl 1M. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA (Biotek ELX808 ELISA plate reader, Biotek, Hoa Kỳ) ở bước sóng 450nm.

Thực hiện phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên NS1 trong mẫu huyết thanh bằng kháng thể đơn dòng (mAbNS1-DENV1-4) được mô tả chi tiết như sau:

- Cố định huyết thanh tại các vị trí trên bề mặt giếng ELISA: 50 $\mu$ L huyết thanh pha loãng (10 $\mu$ L huyết thanh + 40 $\mu$ L coating buffer pH 9.4). Ủ 4°C qua đêm;

- Loại bỏ huyết thanh thừa: Rửa các giếng bằng cách thêm 200  $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần);

- Blocking bằng 100  $\mu$ L/giếng dung dịch 0,5% BSA, ủ tại 37°C/1 giờ;

- Loại bỏ dung dịch BSA 0,5% blocking: Rửa các giếng bằng cách thêm 200  $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần). Bổ sung 50 $\mu$ L kháng thể đơn dòng đặc hiệu vào các giếng theo thứ tự. Ủ đĩa 37°C/1 giờ;

- Loại bỏ kháng thể đơn dòng thừa: Rửa các giếng bằng cách thêm 200  $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần);

- Bổ sung 50 $\mu$ L kháng thể cộng hợp (pha loãng 1:10000 trong PBS 1X) vào mỗi giếng. Ủ tại 37°C/1 giờ;

- Loại bỏ kháng thể cộng hợp thừa: Rửa các giếng bằng cách thêm 200 $\mu$ L/giếng dung dịch PBS + 0,05% Tween 20 (lặp lại 3 lần);

- Bổ sung 50 $\mu$ L cơ chất (TMB), ủ trong tối 10 phút;

- Dừng phản ứng bằng 50 $\mu$ L dung dịch HCl 1M. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450nm.

Xác định giá trị cut-off: Giá trị OD<sub>450</sub> của 33 mẫu huyết thanh người khỏe mạnh đi hiến máu được xác định bằng phương pháp ELISA gián tiếp và thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các mẫu đo ở bước sóng 450nm đã được xử lý bằng Graphpad Prism 9 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Tổng giá trị OD<sub>450</sub> trung bình với 3 lần độ lệch chuẩn được sử dụng làm giá trị ngưỡng để xác định xét nghiệm ELISA gián tiếp [4]. Đối với những mẫu huyết thanh có giá trị OD<sub>450</sub> trên đường giá trị cut-off được coi là mẫu dương tính và ngược lại.

Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm

- Độ chính xác xét nghiệm phát hiện kháng nguyên NS1 trong mẫu huyết

thanh sử dụng kháng thể đơn dòng (mAbNS1-DENV1-4) bằng kỹ thuật ELISA được đánh giá tương ứng với chẩn đoán lâm sàng, cận lâm sàng BN là dương tính hay âm tính với DENV và xét nghiệm real-time PCR (tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán sốt xuất huyết).

- Kết quả được tính toán bằng cách sử dụng các công thức xét nghiệm chẩn đoán độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính và giá trị tiên đoán âm tính như sau (Praewpilai và CS - 2011): Độ nhạy:  $a/a + c \times 100\%$ ; độ đặc hiệu:  $d/d + b \times 100\%$ ; giá trị dự đoán âm:  $d/d + c \times 100\%$ ; giá trị dự đoán dương:  $a/a + b \times 100\%$ ; trong đó: a = số lượng kết quả dương tính thật, b = số lượng kết quả dương tính giả, c = số lượng kết quả âm tính giả và d = số lượng kết quả âm tính thực.

\* *Địa điểm và thời gian nghiên cứu:* Các xét nghiệm real-time PCR, phân tích và tối ưu ELISA để xác định kháng nguyên NS1 được thực hiện tại trung tâm xét nghiệm của trường Đại học Y tế Công cộng (Bộ Y tế) và Viện Nghiên cứu hệ gen (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) trong thời gian từ tháng 8/2022 - 7/2023.

\* *Xử lý số liệu:* Phân tích dữ liệu thống kê được thực hiện bằng SPSS V.18 (SPSS Inc., Chicago, IL).

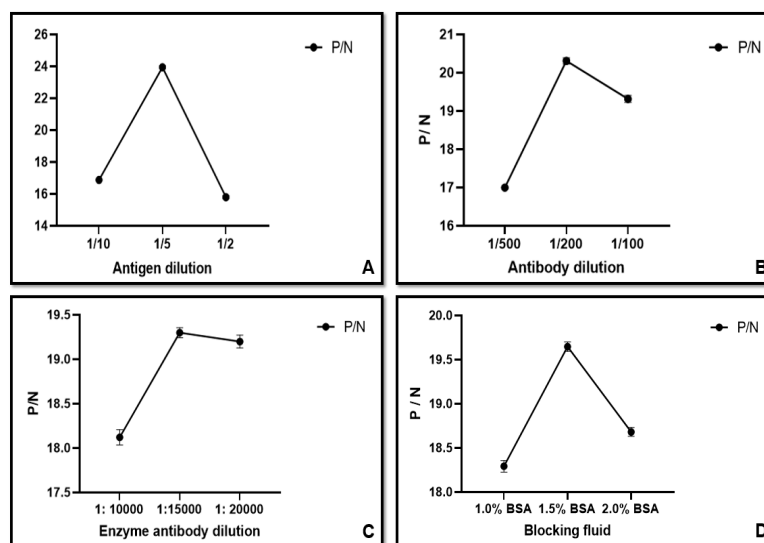
### 3. Đạo đức nghiên cứu

Quy trình nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng Đánh giá Đạo đức Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương và tuân thủ theo các tiêu chuẩn đạo đức của Tuyên bố Helsinki năm 1975. Các mẫu huyết thanh được thu thập ẩn danh bằng cách sử dụng số mã hóa, không sử dụng tên, tên viết tắt hoặc mã số nhập viện của BN. Thông tin của BN được bảo mật nghiêm ngặt theo các hướng dẫn đạo đức quốc tế và sử dụng riêng cho nghiên cứu học thuật.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Kết quả tối ưu các điều kiện chuẩn của phản ứng ELISA

Để tối ưu hóa điều kiện xét nghiệm, điều quan trọng là phải cung cấp đủ kháng thể để bắt giữ kháng nguyên nhưng tránh nền không đặc hiệu cao. Tỷ lệ OD450nm mẫu dương tính/OD450nm mẫu âm tính (P/N) cao nhất được xem là yếu tố xác định điều kiện tối ưu của phản ứng ELISA gián tiếp. Điều kiện phản ứng được tối ưu hóa như sau: 100ng mỗi giếng cho kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4, độ pha loãng mẫu 1:100 và độ pha loãng cộng hợp 1:64.000. Công thức này đã được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 1.** Tối ưu hóa ELISA gián tiếp sử dụng protein tái tổ hợp NS1 gộp bốn týp DENV1-4.

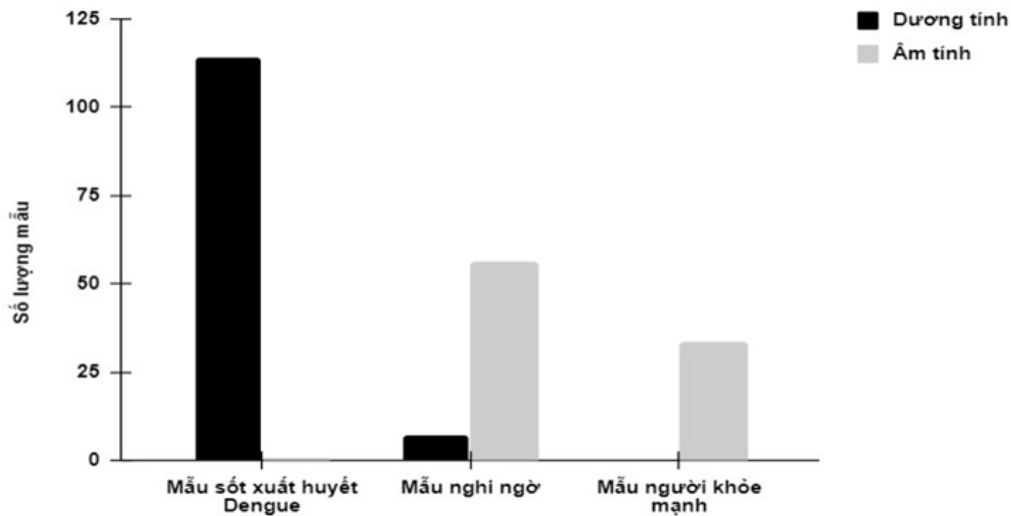
- (A) Tối ưu kháng nguyên tái tổ hợp rAgNS1-DENV1-4.
- (B) Tối ưu kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4.
- (C) Tối ưu kháng thể cộng hợp HPR.
- (D) Tối ưu nồng độ BSA trong dung dịch blocking. P/N: Tỷ lệ positive/negative.

Kết quả tối ưu của kỹ thuật ELISA thu được như sau: Pha loãng 5 lần với kháng nguyên tái tổ hợp rAgNS1-DENV1-4; pha loãng 200 lần với kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4; pha loãng 15.000 lần với kháng thể cộng hợp HPR; và 1,5% BSA trong đệm blocking (Hình 1).

## 2. Giá trị giới hạn và đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ xét nghiệm ELISA trên mẫu lâm sàng

Từ các kết quả tối ưu ở trên, bộ xét nghiệm ELISA được áp dụng với các mẫu thu được từ ba bệnh viện. Dựa

trên chu kỳ ngưỡng (Ct) của mỗi phản ứng real-time PCR để đánh giá kết quả. Đối với Ct từ 1 đến 37, mẫu được coi là dương tính; giá trị nằm ngoài ngưỡng được coi là âm tính. Giá trị Ct của các mẫu dương của thí nghiệm này nằm trong khoảng 5,1 đến 27 (kết quả không thể hiện ở đây). Xét nghiệm định lượng real-time PCR cho kết quả 121 trường hợp dương tính (bao gồm 114 mẫu của BN sốt xuất huyết Dengue và 7 mẫu/63 mẫu nghi ngờ) và 89 trường hợp âm tính (bao gồm, 56 mẫu trong nhóm nghi ngờ và 33 mẫu người khỏe mạnh) (Hình 2).



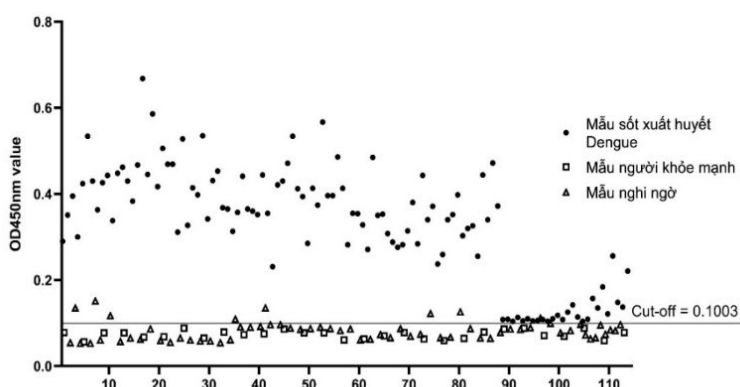
**Hình 2.** Kết quả real-time PCR xác định mẫu dương tính sốt xuất huyết Dengue trong 3 nhóm nghiên cứu. Mẫu dương: Giá trị Ct từ 1 đến 37, mẫu âm: Ct < 1 hoặc Ct > 37.

**Bảng 1.** So sánh kết quả xác định các typ DENV giữa real-time PCR và ELISA.

Kết quả	Mẫu SXHD (n = 114)				Mẫu nghi ngờ (n = 63)	Tổng
	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	DENV 4	
Real-time PCR	23	34	32	25	7	121
ELISA	23	34	32	25	9	123

Qua kết quả bảng 1 và hình 3 cho thấy, phương pháp ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 phát hiện được kháng nguyên NS1 của cả 4 typ. Đặc biệt, trong số 63 mẫu nghi ngờ mắc sốt huyết Dengue, khi xét nghiệm với real-time PCR phát hiện được 7/63 mẫu dương tính DENV 4, còn phương pháp ELISA xác định được 9/63 mẫu dương tính DENV 4, nhiều hơn 2 mẫu so với phương pháp real-timePCR. Dựa trên kết quả ELISA 33 mẫu huyết thanh người khỏe mạnh hiến máu, chúng tôi tính được giá trị cut-off của phản ứng ELISA = 0,1003.





**Hình 3.** Kết quả ELISA xác định mẫu dương tính sốt xuất huyết Dengue trong 2 nhóm nghiên cứu và giá trị cut-off trên mẫu huyết thanh người khỏe mạnh.

Như vậy, số lượng mẫu được sử dụng để so sánh đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu với phương pháp ELISA là 121 mẫu dương tính thật và 89 mẫu âm tính thật.

**Bảng 2.** Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự đoán dương, giá trị dự đoán âm của bộ xét nghiệm ELISA phát hiện kháng nguyên NS1 bằng kháng thể đơn dòng.

	Kết quả	Real-time PCR		Tổng
		Dương tính (n = 121)	Âm tính (n = 89)	
ELISA	Dương tính	121	2	123
	Âm tính	0	87	87
	Tổng	121	89	
ELISA	Độ nhạy (%)	100		
	Độ đặc hiệu (%)		97,75	
	Dự đoán dương (%)	98,37		
	Dự đoán âm (%)		100	

Kết quả bảng 2 đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu theo công thức ở phần phương pháp cho thấy bộ xét nghiệm định tính ELISA gián tiếp cho độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 97,75% với ngưỡng cut-off 0,1003. Giá trị tiên đoán dương tính là 98,37%, trong khi giá trị tiên đoán âm tính là 100%.

### BÀN LUẬN

Cho đến nay, real-time PCR đã được công nhận là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán và định týp DENV, tuy nhiên vẫn có một số nhược điểm, bao gồm cả kết quả âm tính giả và dương tính giả [1, 5]. Trong y văn, tỷ lệ xét nghiệm NS1 dương tính giả chỉ cho phép nằm trong khoảng từ 0,5 - 2,0% [6, 7].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy xét nghiệm ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng tự sản xuất mAbNS1-DENV1-4 vẫn phát hiện được 2 mẫu dương tính trong tổng 89 mẫu âm tính được khẳng định bởi xét nghiệm chuẩn vàng real-time PCR. Kết quả cho thấy sự khác biệt trong ba xét nghiệm, trong đó xét nghiệm bằng test nhanh cho kết quả 114 mẫu dương, 96 mẫu âm, khi xét nghiệm bằng real-time PCR cho kết quả 121 mẫu dương và 89 mẫu âm, kết quả lặp lại với xét nghiệm ELISA bằng kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 kháng NS1 cho số mẫu dương tính tăng lên 123 mẫu và âm tính là 87 mẫu xét nghiệm. Bước đầu đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu xét nghiệm ELISA xác định kháng nguyên NS1 bằng kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 có độ nhạy lên đến 100%, độ đặc hiệu xấp xỉ 98%, đây là một giá trị ngưỡng cao so với

yêu cầu của một sản phẩm kháng thể đơn dòng tự sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, kết quả chênh lệch giữa các phương pháp có thể có mối tương quan cao với tải lượng virus, các triệu chứng và thời gian xét nghiệm liên quan đến thời điểm khởi phát bệnh, do vậy cần thực hiện trên cỡ mẫu lớn hơn, có yếu tố thời gian mắc bệnh, yếu tố dịch tễ vùng đa dạng để đánh giá chính xác độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự đoán dương và dự đoán âm của xét nghiệm ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 phát hiện NS1 của 4 týp virus Dengue. Cho đến nay, một số bộ xét nghiệm thương mại phát hiện kháng nguyên NS1 của DENV đã được phát triển bởi nhiều nhà sản xuất từ nhiều quốc gia và được các nhà nghiên cứu đánh giá độc lập đều cho thấy xét nghiệm ELISA phát hiện kháng nguyên NS1 của virus Dengue có thể ứng dụng rộng rãi để chẩn đoán sớm sốt xuất huyết Dengue [8, 9, 10].

Một trong những điểm mạnh của nghiên cứu này là được thực hiện trong điều kiện tiêu chuẩn, kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV1-4 được tạo ra từ kháng nguyên tái tổ hợp gộp 4 týp của DENV1-4, và có so sánh thử nghiệm với kháng nguyên, kháng thể thương mại (phần vật liệu nghiên cứu).

Xét nghiệm ELISA này có thể hữu ích ở những nơi không có xét nghiệm định lượng real-time PCR, giúp sàng lọc trên diện rộng, số lượng mẫu nhiều trên một lần xét nghiệm, và có thể trả lời những mẫu dương tính đang nhiễm một trong bốn týp DENV, thay vì phải thực hiện xét nghiệm với từng týp riêng rẽ. Điều này giúp tiếp cận cộng đồng nhanh, sẽ làm giảm nhu cầu về cơ sở vật chất phòng thí nghiệm vốn đòi hỏi nhiều nhân lực và chi phí. Thử nghiệm này cũng có thể có lợi khi so sánh với các thử nghiệm định lượng tốn nhiều thời gian hơn trong phòng thí nghiệm. Việc sử dụng xét nghiệm định tính có thể giảm bớt gánh nặng cho BN âm tính thật hoặc dương tính giả tại bệnh viện chuyên tuyến, số lượng nhập viện ít hơn, có khả năng tiết kiệm chi phí chăm sóc sức khỏe và giảm tình trạng quá tải ở các khoa cấp cứu và bệnh viện.

Vì vậy, các nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu phù hợp có thể củng cố hơn nữa kết quả nghiên cứu của chúng tôi và xác định liệu việc chẩn đoán, phát hiện sớm NS1-DENV bằng kháng thể đơn dòng có tạo điều kiện thuận lợi cho việc bắt đầu điều trị nhanh chóng và qua đó giúp cải thiện tình trạng của BN hay không.

## KẾT LUẬN

Qua các kết quả nghiên cứu cho thấy kỹ thuật ELISA được phát triển trong nghiên cứu này sử dụng kháng thể đơn dòng mAbNS1-DENV 1-4 có độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 97,75%, giá trị dự đoán dương 98,37% và giá trị dự đoán âm 100% trong phát hiện kháng nguyên NS1. Hơn nữa, xét nghiệm này đặc biệt phát hiện các kháng nguyên NS1 trong cả nhóm mẫu nghi ngờ hoặc có kết quả real-time PCR âm tính.

**Lời cảm ơn:** Công trình sử dụng kinh phí đề tài cấp Thành phố Hà Nội, mã số 01C-08/01-2020-3 và trang thiết bị của Trung tâm xét nghiệm, Trường Đại học Y tế Công cộng; Viện Công nghệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học vs Công nghệ Việt Nam. Chúng tôi cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization. *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control (new edition)*. 2009:147.
2. Bộ Y tế. Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị sốt xuất huyết Dengue (Ban hành kèm theo Quyết định số 2760/QĐ-BYT, ngày 04 tháng 7 năm 2023 của Bộ trưởng Bộ Y tế). 2023.

3. Palanichamy Kala M, St John AL, Rathore APS. Dengue: Update on Clinically Relevant Therapeutic Strategies and Vaccines. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2023; 15(2):27-52. DOI: 10.1007/s40506-023-00263-w.
4. Thamir AA, Sherif AE-K, Ahmed MT, Sayed SS, Arwa AF, Ahmed MH, Tagreed LA, Norah AO, Esam IA. Development and Optimization of In-house ELISA for Detection of Human IgG Antibody to SARS-CoV-2 Full Length Spike Protein. *Pathogens.* 2020; 9:803.
5. Chong ZL, Sekaran SD, Soe HJ, Peramalah D, Rampal S, Ng CW. Diagnostic accuracy and utility of three dengue diagnostic tests for the diagnosis of acute dengue infection in Malaysia. *BMC Infect Dis.* 2020; 20:210.
6. Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, Te V, Y B, Try PL, Buchy P. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6:e1993.
7. Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hung le Q, Binh TQ, Nam NV, Groen J, de Vries PJ. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63:372-378.
8. Praewpilai T, Piyathida P, Chittima T, Apiradee T, Nuantip K, Yong P. Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-Dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of Dengue virus Southeast Asian. *J Trop Med Public Health.* 2011; 42.
9. Wang SM, Sekaran SD. 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; 48:2793-2797.
10. Tontulawat P, Pongsiri P, Thongmee C, Theamboonlers A, Kamolvarin N, Poovorawan Y. Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011 May; 42(3):570-578. PMID: 21706935.