

PHÁT HIỆN RSV Ở BỆNH NHI DƯỚI 5 TUỔI BẰNG KỸ THUẬT REALTIME RT-PCR VÀ KỸ THUẬT RT-PCR TRUYỀN THỐNG

Lê Văn An, Lê Thị Bảo Chi, Huỳnh Hải Đường, Nguyễn Chiến Thắng
Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: Ứng dụng kỹ thuật realtime RT-PCR và kỹ thuật RT-PCR truyền thống trong chẩn đoán nhiễm trùng hô hấp do RSV. **Phương pháp nghiên cứu:** 110 mẫu nghiệm hô hấp ở bệnh nhi có nhiễm trùng hô hấp, trong đó 72 mẫu âm tính với RSV và 38 mẫu dương tính với RSV được xác định với realtime RT-PCR. **Kết quả:** Bệnh nhi bị nhiễm trùng hô hấp dưới được lấy mẫu nghiệm trong khảo sát này gồm viêm phế quản, viêm tiểu phế quản và viêm phổi, với tuổi trung bình dưới < 2 tuổi, trong đó nhóm bệnh nhi có RSV âm tính là $1,9 \pm 1,7$ tuổi, với nhóm có nhiễm trùng RSV tuổi trung bình là $1,6 \pm 1,4$ tuổi. Thời gian trung bình lấy mẫu nghiệm là 3,3 đến 3,4 ngày tính từ lúc khởi phát bệnh. Xét nghiệm realtime RT-PCR xác định RSV có kết tương ứng với kỹ thuật RT-PCR truyền thống trên các đối tượng khảo sát. **Kết luận:** quy trình realtime RT-PCR chẩn đoán virus RSV cho kết quả nhanh và khép kín, có thể thay thế kỹ thuật RT-PCR truyền thống trong chẩn đoán nhiễm trùng RSV.

Từ khóa: RSV, kỹ thuật realtime RT-PCR, kỹ thuật RT-PCR truyền thống.

Abstract

DETECTION OF RSV IN PEDIATRIC PATIENTS UNDER 5 YEARS OLD BY REALTIME RT-PCR AND CONVENTIONAL RT-PCR

Le Van An, Le Thi Bao Chi, Huynh Hai Duong, Nguyen Chien Thang
Hue University of Medicine and Pharmacy

Objective: Application of realtime RT-PCR and conventional RT-PCR for detection of RSV in viral respiratory infections. **Methods:** Realtime RT-PCR and conventional nested RT-PCR were used to detect RSV on 110 respiratory samples collected from children with viral lower respiratory infections. **Results:** The data from the patients, whose samples were collected, showed that lower respiratory tract infections included bronchitis, bronchiolitis and pneumonia and that the mean of patient age was below 2 year old, among which, the negative RSV group of patients was 1.9 ± 1.7 and the positive RSV group was 1.6 ± 1.4 years of age. The mean of time period from the onset of infections to sample collection was from 3.3 to 3.4 days. Realtime RT-PCR produced the same results as that of conventional RT-PCR. **Conclusion:** Realtime RT-PCR is rapid and closed-tube procedure; it should be used for detection of RSV in acute respiratory infections.

Keywords: RSV, realtime RT-PCR, conventional RT-PCR

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng hô hấp do virus hợp bào đường hô hấp đóng vai trò quan trọng trong các nhiễm trùng hô hấp do virus ở trẻ em nhỏ tuổi. Tỷ lệ nhiễm trùng do RSV lên đến 70% ở trẻ trong năm đầu, phần lớn nhiễm trùng lần đầu thường gây nhiễm trùng hô hấp nhẹ, tuy nhiên nhiều trường hợp gây nhiễm trùng hô hấp dưới, có thể gây viêm phổi và tử vong. Ở trẻ em bị hen phế quản, nhiễm trùng RSV làm cho hen phế quản nặng thêm [1], [2].

Ở Việt Nam, nhiều nhiễm trùng hô hấp do vi khuẩn như *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae* và các vi khuẩn khác có thể xác định được bệnh nguyên vi khuẩn bằng phân lập vi khuẩn. Tuy nhiên, xác định các virus gây nhiễm trùng hô hấp còn rất hạn chế, chỉ được xác định ở các trung tâm lớn có trang bị ở thành phố HCM hay Hà Nội [3], trái lại ở các phòng thí nghiệm bệnh viện tỉnh vì thiếu trang thiết bị và sinh phẩm để chẩn đoán virus học như phân lập virus, xác định kháng nguyên, xác định

- Địa chỉ liên hệ: Lê Văn An, email: levanan.hump@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp.2014.6.2

- Ngày nhận bài: 17/7/2014 * Ngày đồng ý đăng: 24/12/2014 * Ngày xuất bản: 15/1/2015

acid nucleic của virus hay xác định kháng thể trong huyết thanh người bệnh. Các nhiễm trùng hô hấp do các virus vì vậy thường không được xác định đúng mức [3].

Các kỹ thuật khuếch đại gen được đưa vào chẩn đoán các nhiễm trùng virus đường hô hấp từ đầu những năm 1990, trong đó các kỹ thuật khuếch đại gen truyền thống được sử dụng rất sớm [4], [5]. Kỹ thuật khuếch đại gen truyền thống dù rất nhạy nhưng có những hạn chế nhất định khi sử dụng làm xét nghiệm chẩn đoán thường quy vì quy trình thực hiện phải qua nhiều bước tiến hành, thực hiện cần phải được kiểm soát chặt chẽ để tránh sự tạp nhiễm gây nên kết quả dương tính giả, thời gian cho kết quả thường kéo dài [4].

Kỹ thuật realtime RT-PCR dựa vào nguyên lý dùng các chất màu huỳnh quang để theo dõi và xác định sản phẩm khuếch đại, quy trình này giúp loại bỏ bước phân tích bằng điện di và đọc kết quả được thực hiện bằng các chương trình của máy khuếch đại [4]. Kỹ thuật realtime PCR rất hữu ích và thay thế cho các quy trình PCR truyền thống trong chẩn đoán tác nhân nhiễm trùng từ những năm cuối của thập niên 1990 cho đến hiện nay [4], [6].

Nghiên cứu này chúng tôi ứng dụng kỹ thuật realtime RT-PCR và RT-PCR truyền thống (conventional RT-PCR) để chẩn đoán nhiễm trùng do virus RSV ở các trẻ em nhiễm trùng đường hô hấp.

2. ĐỐI TƯỢNG - VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 110 bệnh

phẩm dịch ngoáy ở đường hô hấp thu thập từ trẻ em dưới 5 tuổi nhiễm trùng hô hấp dưới nằm điều trị ở khoa Nhi, Bệnh viện Trung ương Huế từ tháng 3 năm 2010 đến tháng 4 năm 2011, trong đó có 38 mẫu đã xác định dương tính với RSV và 72 mẫu nghiệm âm tính với RSV với kỹ thuật RT-PCR truyền thống [7].

2.2. Vật liệu và phương pháp tiến hành

2.2.1. Mẫu bệnh phẩm và tách chiết RNA từ bệnh phẩm

Mẫu dịch ngoáy họng hoặc tỵ hầu lấy bằng tăm bông vô trùng từ bệnh nhi được chẩn đoán viêm đường hô hấp dưới theo đúng quy định [7], bảo quản ở - 80°C trong ống cryotube chứa 1ml môi trường vận chuyển virus (viral transport medium: VTM, Becton Dickinson, USA) [7]. Sau khi để ở nhiệt độ phòng để tan băng và trộn đều bằng vortex, một thể tích 140µl mẫu nghiệm được tách chiết RNA với bộ sinh phẩm tách RNA của hãng Qiagen (Qiagen, Valencia, USA) theo hướng dẫn của hãng, 60µl dịch chiết trong nước cất 2 lần, dịch chiết này được sử dụng để tiến hành xét nghiệm khuếch đại.

2.2.2. Thực hiện các quy trình khuếch đại xác định RSV

Các cặp mồi và probe sử dụng để thực hiện kỹ thuật realtime RT-PCR do GS. Drosten ở Viện Virus học tại Trường Đại học Bonn, Đức cung cấp, các mồi trong quy trình RT-PCR truyền thống được chọn theo Rohwedder [5] và đã được sử dụng trong bài báo trước đây [8]. Cấu trúc của các mồi và probe được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Cấu trúc các mồi trong kỹ thuật RT-PCR truyền thống và realtime RT-PCR

Tên mồi	Cấu trúc	Kích thước sản phẩm	Tài liệu
Mồi cho kỹ thuật RT-PCR truyền thống			
F1	GTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGC	539 bp	[5], [8]
F2	GTACATAGAGGGGATGTGTG		
F3	TTAACCAGCAAAGTGTTAGA	242 bp	
F4	TTTGTATAGGCATATCATTG		
Mồi và Probe cho kỹ thuật realtime RT-PCR			
RSV-S	GGA AAC ATA CGT GAA CAA GCT TCA		GS.Drosten, Viện virus học, Đại học Bonn, CHLB Đức
RSV- As1	CAT CGT CTT TTT CTA AGA CAT TGT ATT GA		
RSV- As2	TCA TCA TCT TTT TCT AGA ACA TTG TAC TGA		
RSV-P	VIC- TGT GTA TGT GGA GCC TT – MGB NFQ		

Mẫu chứng RSV dương tính do GS Drosten (Viện virus học, Bonn) cung cấp

2.2.3. Thực hiện kỹ thuật RT-PCR truyền thống

Thực hiện kỹ thuật RT-PCR tổ chẩn đoán virus hợp bào đường hô hấp theo quy trình RT-PCR tổ truyền thống (nested conventional RT-PCR) đã được thực hiện tại phòng Thí nghiệm Vi sinh, Trường Đại học Y Dược- Đại học Huế và đã mô tả trước đây [8].

2.2.4. Thực hiện Realtime RT-PCR

Các mẫu nghiệm sau khi tách RNA được sử dụng để thực hiện xét nghiệm realtime RT-PCR theo quy trình 1 bước (one-step) với bộ sinh phẩm RT-PCR của hãng invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Các thành phần của phản ứng gồm 12,5μl master mix, 0,5nM mỗi thuận, 0,25nM cho mỗi mỗi ngược RSV-As1 và As2, 0,5nM cho probe, 0,5μl RT/Taq DNA polymerase và 3μl dung dịch chứa RNA đã tách từ bệnh phẩm, tổng thể tích cho mỗi phản ứng là 20μl. Phản ứng được thực hiện trên máy LightCycler 480 của Roche với chương trình tổng hợp (RT) cDNA ở 50°C trong 30 phút và tiếp theo là khuếch đại với tách DNA khởi đầu thành sợi đơn ở 95°C trong

15 phút, rồi thực hiện 35 chu kỳ với tách DNA ở 95°C trong 15 giây, cặp đôi gen mỗi ở 60°C trong 30 giây đọc kết quả với F1. Các mẫu thử luôn được thực hiện kèm theo mẫu chứng dương tính và chứng âm tính. Kết quả được phân tích với phần mềm 3.5 của máy LighCycler (Lightcyler software version 3.5), kết quả dương tính khi mẫu nghiệm có tín hiệu màu huỳnh quang F1 vượt qua đường cơ bản với chu kỳ < 32, khi tín hiệu huỳnh quang F1 ở chu kỳ ≥ 32 vẫn nằm ở mức đường cơ bản là mẫu âm tính.

2.3. Xử lý số liệu: Số liệu được nhập vào máy tính với phần mềm Excel 2003, tính toán với phần mềm Medcalc - phiên bản 8.0.1.0.

3. KẾT QUẢ

3.1. Tình hình nhiễm trùng hô hấp dưới ở các đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu trên 110 mẫu nghiệm hô hấp lấy ở trẻ em nhiễm trùng hô hấp nhập viện, trong đó 72 trẻ không xác định được RSV và 38 mẫu nghiệm đã xác định RSV dương tính với RT-PCR tổ truyền thống, mẫu thu được ở các trẻ em có nhiễm trùng hô hấp được trình bày ở Bảng 2.

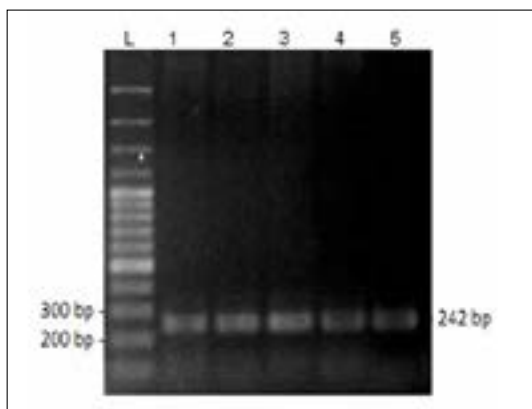
Bảng 2. Tình hình đối tượng trẻ em nhiễm trùng hô hấp và nhiễm RSV

	Mẫu nghiệm RSV âm tính (n=72)	Mẫu nghiệm RSV dương tính (n=38)
Giới (nam/ nữ)	34/38	21/17
Tuổi trung bình	1,9 tuổi ± 1,7	1,6 tuổi ± 1,4
Ngày khởi phát bệnh trung bình đến lấy mẫu nghiệm	3,3 ± 1,4 ngày	3,4 ± 1,3 ngày
Chẩn đoán lâm sàng		
+ Viêm phế quản	11	12
+ Viêm tiểu phế quản	10	07
+ Viêm phổi	51	19

Nhận xét:

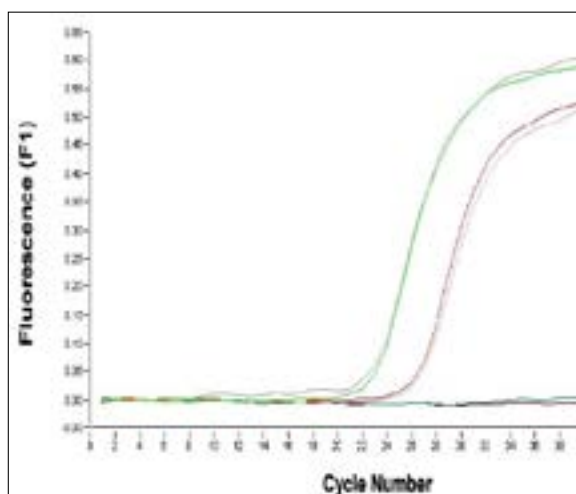
- Tuổi trung bình của bệnh nhi trong cả hai nhóm xấp xỉ nhau 1,9 tuổi và 1,6 tuổi
- Thời gian từ lúc khởi bệnh đến khi lấy mẫu nghiệm trong cả hai nhóm có RSV và RSV âm là 3,3 - 3,4 ngày.

3.2. Kết quả của kỹ thuật realtime RT-PCR và RT-PCR truyền thống

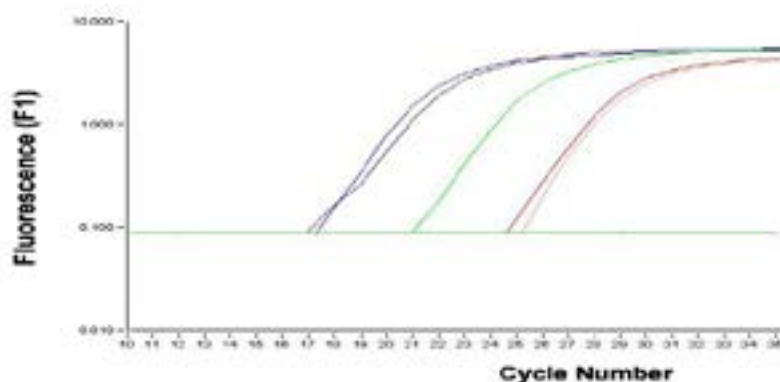


L; Thang DNA 100bp; 1, 2, 3, 4, 5 các mẫu nghiệm dương tính với RSV

Hình 1. Kết quả RT-PCR truyền thống xác định RSV



Biểu đồ 1. Kết quả các mẫu thử khi phân tích



Biểu đồ 2. Phân tích mẫu dương tính

Bảng 3. Kết quả realtime RT-PCR và RT-PCR truyền thống trên mẫu nghiệm

Số mẫu	Realtime RT-PCR	RT-PCR truyền thống
38	+	+
72	-	-

Nhận xét:

Với 38 mẫu có RSV dương tính và 72 mẫu âm tính với RT-PCR truyền thống, khi thực hiện kỹ thuật realtime RT-PCR thì 38 trường hợp này cũng dương tính với realtime RT-PCR và 72 mẫu âm tính không cho thêm mẫu nào dương tính.

4. BÀN LUẬN

4.1. Tình hình nhiễm RSV ở đường hô hấp ở trẻ em dưới 5 tuổi

Trong một bài báo trước đây của chúng tôi,

trong 38 mẫu ngoáy họng dương tính với RSV lấy từ 38 trẻ em có triệu chứng nhiễm trùng hô hấp dưới nhập viện từ tháng 3/2010 đến tháng 4/2011, hầu hết (29 trường hợp) nhiễm RSV xảy ra ở tuổi từ 3 tháng đến 2 tuổi, chỉ có 9 trường hợp xảy ra ở trẻ trên 2 tuổi [7]. Về lâm sàng 19 trường hợp có RSV dương tính là viêm phổi, 12 trường hợp từ viêm phế quản và 7 trường hợp từ viêm tiểu phế quản. Các trường hợp xác định RSV có phân bố rải đều các tháng trong năm [7]. Ở trẻ em nhiễm trùng hô hấp có thể do RSV đơn thuần, nhiều trường hợp còn cho thấy có sự phối hợp nhiễm trùng RSV với các virus khác như virus cúm A, adenovirus và virus á cúm [7].

Số liệu của chúng tôi cho thấy hầu hết bệnh nhân được lấy mẫu nghiệm với thời gian trung bình trong khoảng 3, 3 ngày sau khi bệnh khởi phát các triệu chứng hô hấp, đây là thời gian thích hợp có nhiều virus ở đường hô hấp, đối với RSV

và hMPV thường vị trí nhân lên đầu tiên ở mũi hầu của đường hô hấp trên, các virus này lan xuống đường hô hấp dưới qua các chất tiết hô hấp, và qua các tế bào nhiễm trùng gần kề [9], [10]. Thời gian thải virus ở trong chất tiết hô hấp xảy ra trong quá trình bệnh nhân bị bệnh, khi bệnh nhân hồi phục sự thải virus cũng chấm dứt, tuy nhiên một số trường hợp trẻ em tiếp tục thải virus sau khi đã hồi phục về lâm sàng [10], [11].

4.2. Kỹ thuật realtime RT-PCR và RT-PCR truyền thống xác định RSV

Với những virus hô hấp có hệ gen là RNA như các virus RSV, virus cúm, khi thực hiện realtime RT-PCR với bộ sinh phẩm one step RT-PCR cho phép tất cả các bước chuyển đổi ngược (hay sao chép) từ RNA thành cDNA và bước khuếch đại đều xảy ra trong một ống nghiệm duy nhất, mà không cần phải tách riêng thành hai bước riêng lẻ như trong kỹ thuật RT-PCR truyền thống. Kết quả có thể theo dõi trực tiếp trong thời gian khuếch đại sản phẩm ở trên máy vi tính và đọc kết quả ngay sau khi quy trình realtime RT-PCR chấm dứt mà không cần phải lấy sản phẩm ra để phân tích, nên quy trình này cho kết quả nhanh hơn so với quy trình RT-PCR truyền thống [4], [6]. Quan trọng hơn là các bước của realtime RT-PCR xảy ra trong một quy trình khép kín do vậy tránh được sự nhiễm bẩn acid nucleic ngoại lai nên

hạn chế được kết quả dương tính giả [4].

Kết quả ở bảng 3 cho thấy kỹ thuật realtime RT-PCR xác định RSV phù hợp với kết quả của kỹ thuật RT-PCR tổ truyền thống được sử dụng. Hu và các đồng tác giả dùng realtime RT-PCR kiểu TaqMan để xác định RSV trong mẫu chứa virus được pha loãng từ dịch virus ở nuôi cấy tế bào, quy trình của tác giả có thể xác định lượng RNA rất thấp, tương đương từ 2 đến 9 bản sao RNA [6]. Mentel và các đồng tác giả sử dụng kỹ thuật realtime RT-PCR và kỹ thuật RT-PCR tổ truyền thống để xác định RSV trên 71 mẫu nghiệm lâm sàng cho thấy kỹ thuật realtime RT-PCR có độ nhạy cao hơn RT-PCR truyền thống [12]. Trong quy trình realtime RT-PCR chẩn đoán RSV này, probe đặc hiệu kiểu Taqman, chất màu và thành phần của quy trình đã được hiệu chỉnh để thực hiện với máy realtime PCR của hãng Roche và đã được dùng thường quy để xác định RSV ở phòng thí nghiệm virus học, đại học Bonn (TS. Drosten).

5. KẾT LUẬN:

Kỹ thuật realtime RT-PCR xác định RSV cho kết quả như RT-PCR truyền thống, nó có ưu điểm là thực hiện trong hệ thống kín, tránh được phản ứng dương tính giả do nhiễm chéo, thời gian thực hiện ngắn cho phép xác định nhanh nhiễm trùng RSV trong bệnh phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hall CB (2010) respiratory syncytial virus, in Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors, Mandell, Douglas, Bennett's principles and Practice of Infectious diseases, Philadelphia, Churchill Livingstone> 2207-2221.
2. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P (2009). The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children, N Engl J Med. 360(6):588-98.
3. Yoshida LM, Suzuki M, Yamamoto T, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, Oishi K, Vu TD, Le TH, Le MQ, Yanai H, Kilgore PE, Dang DA, Ariyoshi K (2010), Viral pathogens associated with acute respiratory infections in central Vietnamese children, Pediatr Infect Dis J. ;29(1):75-7
4. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, and Smith TF (2006) Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing, Clin. Microbiol. Rev. 19(1):165-256.
5. Rohwedder A, Keminer O, Forster J, Schneider K, Schneider E and Werchau H (1998) Detection of Respiratory Syncytial Virus RNA in Blood and Neonates by Polymerase chain reaction, J. Med. Virol. 54: 320-327.
6. Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, and Cheng SM (2003) Simultaneous Detection, Subgrouping, and Quantitation of Respiratory Syncytial Virus A and B by Real-Time PCR, J. Clin. Microbiol; 41:149-154.
7. Lê Văn An, Huỳnh Thị Hải Đường, Nguyễn Chiến Thắng, Nguyễn Hoàng Bách, Lê Thị

- Bảo Chi, Phan Thị Bích Chi, Lê Thị Ngọc Việt, Đinh Quang Tuấn, Cappuccinelli Piero (2012), Nghiên cứu về bệnh nguyên virus gây nhiễm trùng hô hấp dưới ở trẻ em nhập viện tại bệnh viện Trung ương Huế từ tháng 3 năm 2010 đến tháng 4 năm 2011, Tạp chí Y Dược học, Đại học Y Dược Huế, số 12: 86- 92.
8. Lê Văn An, Huỳnh Hải Đường, Nguyễn Chiến Thắng, Cappuccinelli P (2011), Chẩn đoán virus hợp bào đường hô hấp gây nhiễm trùng hô hấp dưới bằng kỹ thuật RT-PCR tổ, Tạp chí Y Dược học, Đại học Y Dược Huế, số 3: trg 11-152.
 9. Collins PL, Crowe JE(2008) Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, in Knipe DM, Howley PM, editors, Fields Virology, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1601-1646.
 10. Collins PL, Graham BS (2008) Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis, J. Virol. 82: 2040-2055.
 11. Wight PF, Gruber WC, Peters M et al (2002) Illness severity, viral shedding, and antibody responses in infants hospitalized with bronchiolitis Caused by respiratory syncytial virus, J. Infect. Dis.; 185:1011–8.
 12. Mentel R, Wegner U, Bruns R and Guertler L (2003), Real-time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial virus infection, J. Med. Microbiol. 52:893-896.