

CHẨN ĐOÁN VIRUS HỢP BÀO ĐƯỜNG HÔ HẤP GÂY NHIỄM TRÙNG HÔ HẤP DƯỚI BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR TỔ

Lê Văn An⁽¹⁾, Huỳnh Hải Đường⁽¹⁾,

Nguyễn Chiến Thắng⁽¹⁾, Piero Cappuccinelli⁽²⁾

(1) Bộ môn Vi sinh, phòng thí nghiệm Carlo Urbani, Đại học Y Dược Huế,

(2) Viện Vi sinh thực nghiệm và lâm sàng, Đại học Sassari

Tóm tắt

Mục tiêu: Phát triển và áp dụng quy trình kỹ thuật RT-PCR tổ để chẩn đoán virus RSV gây nhiễm trùng hô hấp ở bệnh nhân nhi. **Phương pháp và đối tượng nghiên cứu:** Xây dựng và hiệu chỉnh quy trình kỹ thuật RT-PCR tổ (nested RT-PCR) để khuếch đại vùng gen F của genome RSV, thực hiện thực nghiệm với các mẫu chứng và áp dụng để chẩn đoán với các bệnh phẩm lâm sàng. **Kết quả nghiên cứu:** Kết quả thực hiện với các mẫu chứng cho thấy kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu RNA của virus RSV mà không khuếch đại các genome của các tác nhân virus và vi khuẩn gây nhiễm trùng hô hấp thường gặp, ngưỡng xác định của quy trình là 10^2 bản sao. Áp dụng chẩn đoán trên 109 mẫu bệnh phẩm ngoáy họng của bệnh nhi nhiễm trùng hô hấp cho kết quả 27 (tỷ lệ 24,8%) bệnh nhi nhiễm trùng với RSV, trong đó viêm phế quản có 6/30 (20%), viêm tiểu phế quản có 7/26 (27%) và viêm phổi là 14/53 (26,4%). **Kết luận:** Kỹ thuật RT-PCR tổ này là một phương pháp chẩn đoán hữu ích và tin cậy để chẩn đoán nhiễm trùng do virus RSV ở đường hô hấp.

Abstract

DETECTION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV) IN LOWER ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS BY NESTED REVERSE TRANSCRIPTION- POLYMERASE CHAIN REACTION

Le Van An, Huynh Hai Duong,

Nguyen Chien Thang, Cappuccinelli P

Objective: To develop and apply a nested reverse transcription- polymerase chain reaction (nested RT-PCR) for detection of RSV in lower acute respiratory infections.

Materials and methods: A nested reverse transcription- polymerase chain reaction was used to amplify a sequence of the F gene in the RSV genomic RNA, optimized and compared the sensitivity and specificity of this assay with the control samples and then applied this procedure for diagnosing RSV from clinical samples. **Results:** This nested RT-PCR assay amplified the specific target fragment of RSV RNA and did not amplify any sequence of genomes of the tested common viruses and bacteria causing respiratory infections. The minimal level of detection of this procedure was 10^2 copies/ml. Results for detection of RSV on 109 samples of throat swabs or nasopharyngeal swabs from children with lower respiratory infections showed that twenty seven patients were positive with RSV (24.8%), among which six out of 30 (20%) were with bronchitis, seven out of 26 (27%) were with bronchiolitis and fourteen out of 53 (26.4%) were with pneumonia. **Conclusion:** This nested RT-PCR was found to be useful and reliable for detection of RSV in respiratory infections.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng hô hấp do virus RSV rất thường gặp ở trẻ em, virus này gây nhiễm trùng hô hấp trên, rồi lan rộng xuống đường hô hấp dưới. Ở các trẻ em nhiễm trùng virus hô hấp dưới phải nhập viện thì RSV gây viêm tiểu phế quản ở 50 đến 90% trẻ em, viêm phổi từ 5 đến 40% và viêm thanh phế quản từ 10 đến 30% [2]. Trong một nghiên cứu theo dõi ở Hoa Kỳ cho thấy có đến 68,8% trẻ em nhiễm trùng trong năm đầu tiên, và tỷ lệ này đạt đến 82,6% trẻ nhiễm trùng vào năm thứ 2 và đến 3 tuổi thì 100% có nhiễm virus này [1]. RSV cũng là tác nhân virus gây nhiễm trùng xảy ra trong môi trường bệnh viện, nhiễm trùng thường xảy ra trong mùa dịch với tỷ lệ thay đổi từ 20% đến gần 50% [1], [2]. Các nhiễm trùng hô hấp nặng do RSV có thể đưa đến tử vong ở trẻ em nhỏ, nó còn gây nhiều biến chứng khác ở đường hô hấp. Chẩn đoán sớm nguyên nhân cho phép cách ly sớm để tránh lây lan ở trong môi trường bệnh viện.

Các phương pháp chẩn đoán virus học nhiễm trùng RSV gồm phân lập virus trên một số nuôi cấy tế bào đặc hiệu như Mv1Lu, Hep-2, MRC-5, tế bào Vero [1]. Phương pháp này chỉ làm ở những phòng thí nghiệm có trang bị, tỷ lệ dương tính không cao, kết quả thường chậm sau 5-7 ngày hoặc xác định kháng

nguyên virus RSV trong dịch rửa hô hấp [5]. Gần đây nhiều phòng thí nghiệm đã phát triển các kỹ thuật RT-PCR để chẩn đoán virus học RSV ở bệnh phẩm lâm sàng, kỹ thuật này có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trên 90% khi so sánh với nuôi cấy hay xét nghiệm tìm kháng nguyên virus. Hiện nay nhiều quy trình RT-PCR để chẩn đoán RSV được thương mại hóa [1], [5], [9].

Để có được một xét nghiệm về virus học tin cậy để xác định các tác nhân virus gây nhiễm trùng hô hấp chúng tôi thực hiện xây dựng quy trình RT-PCR nhằm chẩn đoán virus RSV và sử dụng nó trong chẩn đoán bệnh phẩm ở lâm sàng. Bài báo này chúng tôi báo cáo kết quả việc áp dụng kỹ thuật này trong chẩn đoán nhiễm trùng RSV ở bệnh nhân nhi có nhiễm trùng hô hấp dưới tại Huế từ tháng 3 năm 2010 đến tháng 1 năm 2011.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu

Các cặp mẫu được chọn nhằm khuếch đại vùng gen F của genome cả hai type virus RSV theo tác giả Rohwedder A và Mentel, theo kỹ thuật RT-PCR tổ (nested RT-PCR) với cấu trúc các mẫu như dưới đây [6], [7].

Bảng 2.1. Cấu trúc các đoạn mẫu được dùng

Tên đoạn mẫu	Cấu trúc đoạn mẫu	Vị trí đoạn mẫu ở vùng gen F	Kích thước vùng khuếch đại
F1	GTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGC	6090–6113	539 bp
F2	GTACATAGAGGGGATGTGTG	6609–6628	
F3	TTAACCAGCAAAGTGTTAGA	6222–6241	242 bp
F4	TTTGTTATAGGCATATCATTG	6443–6463	

Sinh phẩm

Bộ sinh phẩm chuyển đổi ngược từ RNA sang cDNA của hãng Việt Phát, HCM (chứa RT, dNTPs, các mẫu hexamer), Bộ sinh phẩm PCR master mix của hãng promega.

Chủng virus chứng

Các virus cúm A gồm các dưới type H1N1 mới, H1N1 mùa, H3N2, adenovirus, parainfluenza virus; các vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

pyogenes, phế cầu, *Hemophilus influenzae*.
Mẫu chứng RSV dương.

2.2 Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành theo 2 giai đoạn sau

Giai đoạn 1. Tiến hành khảo sát độ nhạy và độ đặc hiệu

- Các mẫu nghiệm chứng RSV dương và các mẫu với virus H1N1 mới, H1N1 mùa, H3N2, adenovirus, parainfluenza virus được tách RNA với sinh phẩm tách RNA của hãng Qiagen.

- Các vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, phế cầu, *Hemophilus influenzae* được nuôi cấy trên môi trường thạch máu và 1-3 khuẩn lạc được cho vào dung dịch TE, ủ 85°C trong 15 phút, ly tâm 2000 vòng/phút. Lấy dịch nổi để tiến hành kỹ thuật khuếch đại gen RT-PCR.

- Với RNA của các virus RSV, virus H1N1 mới, H1N1 mùa, H3N2, parainfluenza virus 3 được chuyển đổi thành cDNA với bộ sinh phẩm chuyển đổi cDNA và quy trình của công ty Việt Á.

- Thực hiện khuếch đại gen tổ (nested PCR) theo tiến trình hai bước như sau

+ Bước 1 khuếch đại vùng gen F có độ dài 539bp với cặp mồi F1 và F2, trong đó 12,5µl master mix, 0,4µM (F1), 0,4µM (F2), 5 µl cDNA và nước cất đủ thể tích 25µl. Chương trình khuếch đại 95°C/15 phút, tiếp theo khuếch đại trong 40 chu kỳ với 95°C/1 phút, cặp đôi 55°C/1 phút, kéo dài 72°C/1 phút.

+ Bước 2 được thực hiện khuếch đại vùng 242bp trong đoạn 539bp trên với cặp mồi F3 và F4, với 12,5µl master mix, 0,4µM (F3), 0,4µM (F4), 3 µl sản phẩm của bước 1 và nước cất đủ thể tích 25µl. Chương trình khuếch đại 95°C/5 phút, tiếp theo khuếch đại trong 40 chu kỳ với 95°C/1 phút, cặp đôi 50°C/1 phút, kéo dài 72°C/2 phút.

Sản phẩm của bước 2 được điện di trên agarose 1,5% và nhuộm màu với EtBr và đọc kết quả ở bàn đọc huỳnh quang.

Độ nhạy của kỹ thuật được kiểm tra với mẫu cDNA chứng dương tính có nồng độ đã biết được pha loãng 10 lần từ 10^6 đến 10^2 , các nồng độ này được dùng trong phản ứng khuếch đại hai bước như trên.

Giai đoạn 2. Tiến hành trên mẫu nghiệm lâm sàng

109 mẫu nghiệm ngoáy họng hoặc tỵ hầu lấy từ bệnh nhân nhi nhiễm trùng hô hấp dưới có sốt, ho có rạn ở phổi hay không, có X quang có biểu hiện hô hấp dưới. Bệnh phẩm lấy được cho vào môi trường vận chuyển virus (VTM), khi đến phòng thí nghiệm 140µl được xử lý tách RNA theo quy trình của Qiagen và tiến hành RT-PCR với quy trình tổ như trên. Các mẫu nghiệm được tiến hành đồng thời với mẫu chứng RSV dương và chứng âm.

3. KẾT QUẢ

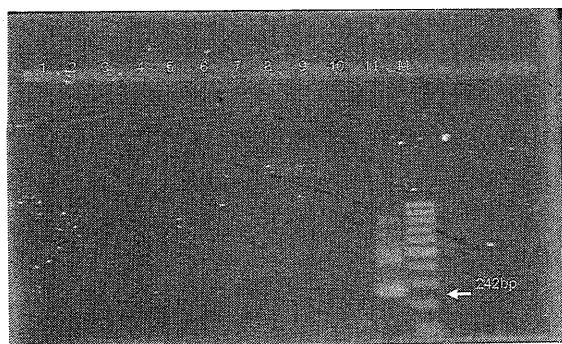
- Thực hiện RT-PCR tổ trên mẫu chứng RSV dương và các tác nhân hô hấp nêu trên kết quả cho thấy các cặp mồi chỉ khuếch đại RNA của virus RSV mà không khuếch đại bất kỳ genome của các virus và vi khuẩn thường gặp khác ở đường hô hấp được thử nghiệm. Kết quả RT-PCR tổ với mẫu chứng RSV dương và các mẫu nghiệm âm như hình 1 và 2.

- Mức xác định của kỹ thuật khuếch đại tổ cho kết quả dương tính đọc được ở nồng độ 10^2 bản sao

- Kết quả chẩn đoán nhiễm RSV trên mẫu nghiệm lâm sàng nhiễm trùng hô hấp dưới cho ở bảng dưới

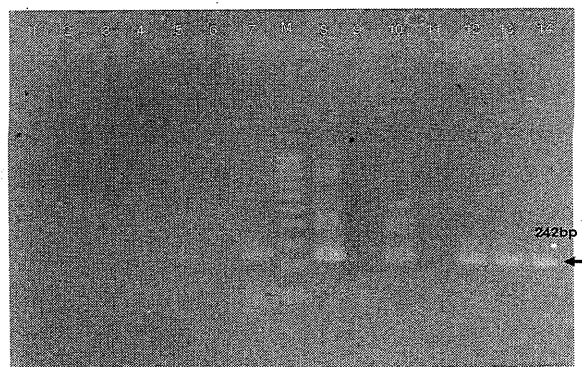
Bảng 3.1. Tỷ lệ nhiễm RSV ở bệnh nhân nhi nhiễm trùng hô hấp dưới

Chẩn đoán	Số bệnh	Số dương tính	Tỷ lệ %
Viêm phế quản	30	6	20
Viêm tiểu phế quản	26	7	27
Viêm phổi	53	14	26.4
Tổng số	109	27	24,8%



1: H1N1 mới; 2: H1N1 mùa; 3: H3N2; 4: Adenovirus; 5: parainfluenza virus 3; 6: *S.aureus*; 7: *Strep. pyogenes*; 8: Phế cầu; 9: *Hemophilus influenza*; 10 chứng âm (H2O); 11: mẫu RSV chứng dương

Hình 1. nested RT-PCR với các mẫu chứng



Mẫu 8 chứng dương, mẫu 9 chứng âm; mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 âm tính; mẫu 7, 10, 12, 13, 14 dương tính

Hình 2. nested RT-PCR trên các mẫu bệnh phẩm

4. BÀN LUẬN

Sự phát triển kỹ thuật RT-PCR tổ chẩn đoán RSV cung cấp một phương pháp chẩn đoán virus học để có thể chẩn đoán được virus RSV gây nhiễm trùng hô hấp do virus thường gặp ở trẻ em, trong khi những phương pháp chẩn đoán virus học khác như phân lập virus và xác định kháng nguyên RSV hiện không hoặc chưa thực hiện được ở các phòng thí nghiệm ở nước ta. Hiện có nhiều phương pháp để chẩn đoán virus học RSV, nhưng không có phương pháp nào có đủ độ nhạy cao để có thể dùng làm phương pháp chẩn đoán tối ưu cho mục đích này ở phòng thí nghiệm.

Trong nghiên cứu này của chúng tôi thiếu điều kiện để có thể kết hợp thêm các xét nghiệm khác như phân lập virus hay xác định kháng nguyên để có thể so sánh và đối chiếu giữa các xét nghiệm. Tuy nhiên một số khảo sát dùng nhiều kỹ thuật chẩn đoán cổ điển khi chưa có PCR gồm phân lập RSV trên tế bào Hep-2 và dùng các kỹ thuật xác định kháng nguyên đồng thời cho thấy tỷ lệ phân lập được virus thấp chỉ đến 40% đến 50% [3], [4]. Trong một nghiên cứu của Mentel và Guertler dùng PCR để chẩn đoán RSV ở 71 mẫu bệnh phẩm hô hấp bằng RT-PCR tổ này

đồng thời với xác định kháng nguyên RSV, các tác giả thấy có 21 bệnh nhân dương tính được xác định với hai kỹ thuật này, thì kháng nguyên RSV dương tính ở 10 bệnh, trong khi đó RT-PCR tổ dương tính ở 19 bệnh nhân như vậy trong nghiên cứu của tác giả này có 2 bệnh nhân có kháng nguyên RSV dương tính nhưng RT-PCR tổ âm tính, ngược lại có đến 11 bệnh nhân có RT-PCR tổ dương tính nhưng kháng nguyên lại âm tính [6].

Nghiên cứu gần đây dùng kết hợp phân lập virus, miễn dịch huỳnh quang xác định kháng nguyên ở hô hấp và khuếch đại realtime để chẩn đoán nhiễm RSV ở 23 bệnh nhân nhiễm trùng hô hấp dưới nặng cho thấy cây chỉ dương tính ở 4 bệnh nhân trên 21 bệnh nhân, và kháng nguyên dương tính ở 7 bệnh nhân trên 22 bệnh nhân thực hiện và khuếch đại realtime dương tính ở 16 bệnh nhân trên 23 bệnh nhân [8].

5. KẾT LUẬN

Sử dụng quy trình nested RT-PCR này trên các mẫu chứng trong phòng thí nghiệm và trên 109 mẫu nghiệm lâm sàng cho thấy quy trình RT-PCR này hữu ích, tin cậy và có thể sử dụng để chẩn đoán nhiễm trùng do virus RSV ở đường hô hấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Collins P.L, Crowe J.E (2007), Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus in Knepe DM, Howley PM (ed), Fields Virology 5th ed, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1601-1646
2. Hall C.B (2001) Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus, N Engl J Med, Vol. 344, No. 25, 1917-1928
3. Halstead, D. C, Todd S., and Fritch G (1990). Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. J. Clin. Microbiol. 28:1021-1025.
4. Johnston S.L.G and Siegel C.S (1990), Evaluation of Direct Immunofluorescence, Enzyme Immunoassay, Centrifugation Culture, and Conventional Culture for the Detection of Respiratory Syncytial Virus, J Clin Microbiol, Nov. 1990, p. 2394-2397.
5. Mahony J.B (2008), Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods, Clin Microbiol Reviews, P. 716-747
6. 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
7. Rohwedder A, Keminer O, Forster J, Schneider K, Schneider E, and Werchau H (1998), Detection of Respiratory Syncytial Virus RNA in Blood of Neonates by Polymerase Chain Reaction, J Med Virol 54:320-327.
8. Van de Pol A.C and other authors (2006), Diagnostic value of real-time polymerase chain reaction to detect viruses in young children admitted to the paediatric intensive care unit with lower respiratory infection. Critica care, 10
9. Zlateva K T, Vijgen L, Dekeersmaeker N, Naranjo C, and M Van Ranst (2007), Subgroup Prevalence and Genotype Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus in Belgium during Ten Successive Epidemic Seasons, J Clin Microbiol, Sept., p. 3022-3030.

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG ĐÌNH CHỈ THAI < 49 NGÀY TUỔI BẰNG MIFEPRISTONE VÀ MISOPROSTOL

Đỗ Thị Kim Ngọc⁽¹⁾, Nguyễn Vũ Quốc Huy⁽²⁾

⁽¹⁾Trung tâm Sức khỏe sinh sản Thành phố Cần Thơ

⁽²⁾Bộ môn Phụ Sản, Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: (1) Đánh giá hiệu quả và tính an toàn của liệu trình đình chỉ thai nghén bằng thuốc Mifepristone và Misoprostol đối với thai <49 ngày tuổi; (2) Đánh giá khả năng chấp nhận và các tác dụng phụ của Mifepristone và Misoprostol trong liệu trình đình chỉ thai nghén <49 ngày tuổi. **Đối tượng và phương pháp:** 169 thai phụ có tuổi thai dưới 7 tuần vô kinh (<49 ngày vô kinh), đến phá thai bằng thuốc tại Trung tâm Chăm sóc SKSS thành phố Cần Thơ sau khi được tư vấn, thu nhận nghiên cứu từ ngày 1/6/2009 đến ngày 30/5/2010. Thai phụ uống 200mg Mifepristone, theo dõi tại chỗ trong 30 phút, sau 48 giờ cho uống tiếp 400 µg Misoprostol. Tái khám sau 2 tuần kể từ ngày uống Mifepristone để đánh giá kết quả. **Kết quả:** Tỷ lệ thành công chấm dứt thai kỳ ở tuổi thai dưới 7 tuần là 95,3%. Thời gian trung bình từ khi sử dụng Mifepristone và Misoprostol đến khi thai ra: $4,3 \pm 3,7$ giờ. Tỷ lệ hài lòng 89,4%. Các tác dụng phụ của Mifepristone bao gồm đau bụng (35,8%), buồn nôn (20,3%), nôn (4,8%); tác dụng phụ của Misoprostol bao gồm đau bụng (86,6%), buồn nôn (33,7%), nôn (8,6%), sốt/ớn lạnh, mệt mỏi và tiêu chảy (7,5%). **Kết luận:** Mifepristone và Misoprostol có hiệu quả và độ an toàn cao để đình chỉ thai kỳ với thai <49 ngày tuổi.

Abstract

TERMINATION OF PREGNANCY LESS THAN 49 DAYS USING MIFEPRISTONE AND MISOPROSTOL

Do Thi Kim Ngoc, Nguyen Vu Quoc Huy

Objectives: 1. To evaluate the effectiveness and safety of Mifepristone and Misoprostol in termination of pregnancy less than 49 days. 2. To evaluate the acceptability and side effects of that treatment scheme. **Materials & Methods:** 169 pregnant women less than <49 days demanding medical abortion at Can Tho Reproductive Health Center during the period of June 1st 2009 to May 30th 2010. Mifepristone 200mg was administered orally, followed by onsite monitoring during 30 minutes; Misoprostol 400 µg were administered orally 48 hours later by th facility at the center. Follow-up visit for 2 weeks was made after using Mifepristone.

Results and Discussion: Rate of successful pregnancy termination was 95.3%. Mean duration between Mifepristone and Misoprostol use and abortion is 4.3 ± 3.7 hours. Satisfaction rate is 89.4%. Observed Mifepristone's side effects include abdominal pain (35.8%), nausea (20.3%), and vomit (4.8%); Misoprostol's side effects include abdominal pain (86.6%), nausea (33.7%), vomit (8.6%), fever/chill, fatigue and diarrhea (7.5%). **Conclusions:** Mifepristone and Misoprostol are safe and highly effective for termination of pregnancy less than 49 days.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), hàng năm trên thế giới có khoảng 80 triệu phụ nữ có thai, trong đó có 20 triệu phụ nữ nạo phá thai

không an toàn, có 68.000 phụ nữ bị chết do nạo hút thai không an toàn [1], [2]. Tại Việt Nam theo báo cáo của Vụ SKSS/BYT năm 2007 cả nước có 292.143 trường hợp phá thai. Riêng