

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, HÓA SINH VÀ LIÊN QUAN CỦA CHÚNG TRONG TIÊU CHẢY CẤP TRẺ EM

NGUYỄN LĨNH TOÀN - Học viện Quân y

### TÓM TẮT

Tiêu chảy cấp (TCC) trẻ em là bệnh lý hay gặp trong đó rotavirus là căn nguyên hàng đầu gây TCC, nhất là ở trẻ em dưới 5 tuổi. Tỷ lệ TCC do rotavirus xảy ra từ 40 đến 60% và gây tử vong hàng nghìn ca ở các nước đang phát triển và Việt Nam. Bằng kỹ thuật RT-PCR đa môi phát hiện rotavirus-RNA tỷ lệ 78/95 (82%) trong phân trẻ em TCC. Lứa tuổi mắc TCC dưới 3 tuổi chiếm 93/95 (97%) trong đó dưới 1,5 tuổi chiếm 76/95 (78%). Trẻ nam giới mắc TCC chiếm 65% so với nữ 35%. Phân tích liên quan một số chỉ số điện giải và máu giữa nhóm TCC có rotavirus-RNA(+) so với rotavirus-RNA(-) cho thấy không có sự khác biệt về các chỉ tiêu điện giải và máu giữa các nhóm ( $p>0,05$ ). Tóm lại, TCC trẻ em thường gặp ở trẻ dưới 3 tuổi và nguyên nhân chính là do rotavirus.

### SUMMARY

Acute diarrhea (AD) in children is a common disease world-wide in which rotavirus is mainly cause of AD especial the children under 5 year old. Prevalence of AD caused rotavirus reached from 40 to 60% and an annual thousands cases death from AD in developing countries and Viet Nam. By using multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction has detected rotavirus-RNA in 78 of 95 (82%) stool samples of children AD. The children AD age of under 3 year olds were in 93/95 (97%), in which

under 1,5 year olds were predominant found in 78%. The genders with AD shown predominant in young boys of 65% in comparison to those of 35% in young girls with AD. There were no significant difference in plasma electrolyses and blood indexes between rotavirus-RNA(+) and rotavirus-RNA(-) groups ( $p>0,05$ ). In summary, the acute diarrhea in children was the common disease in children under 3 year olds and rotavirus was mainly caused of the disease.

**Keywords:** rotavirus, diarrhea, RT-PCR

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chảy cấp (TCC) trẻ em là bệnh lí thường gặp, mỗi năm có khoảng 111 triệu trẻ em mắc TCC, trong đó có tới 25 triệu trường hợp phải can thiệp y tế, 2 triệu trẻ em phải nhập viện và từ 400.000 đến 600.000 trường hợp tử vong trên thế giới, hơn 80% xảy ra ở các nước nghèo (Parashar và CS, 2003; Rinsho N và CS, 2008; Estes, 2001; Gentsch et al., 2005). Rotavirus là nguyên nhân hàng đầu gây TCC, chiếm tỷ lệ từ 40 đến 60% ở các nước đang phát triển, đặc biệt là trẻ em dưới 5 tuổi. Mỗi năm hàng trăm nghìn ca tử vong do rotavirus trên thế giới (Gray và cs, 2008). Theo số liệu khảo sát trên 16.173 trẻ TCC nhập viện từ 33 trung tâm y tế khác nhau ở 8 nước Châu á và Việt Nam từ năm 2001 đến 2002 cho thấy, trong 71% tổng số mẫu phân được xét nghiệm thì có tới 45% mẫu phân dương

tính với *rotavirus* và tỷ lệ TCC do *rotavirus* giữa các nước giao động từ 24 đến 67%, trong đó Việt Nam có tỷ lệ cao nhất (59%) và thấp nhất là Hong Kong (28%) (Nelson và CS, 2008). Nghiên cứu của Fang ZY và CS (2005) trên 3149 trẻ TCC nhập viện tại 6 bệnh viện Quân sự Trung Quốc có tới 50% dương tính với *rotavirus*. Hong Kong là nơi có tỷ lệ mắc *rotavirus* thấp nhất nhưng cũng có tới 30% trường hợp dương tính với *rotavirus* khi khảo sát trên 7390 trẻ TCC nhập viện. Tại Malaysia, trong 14.000 trường hợp nhập viện vì bệnh viêm dạ dày ruột thì có tới 50% là do *rotavirus*. Một tỷ lệ tương đương cũng quan sát thấy ở Myanmar, TCC do virus này chiếm 53%. Trong khi đó tại Đài Loan và Thái Lan tỷ lệ dương tính với virus này tương đương 43% (Nelson và CS, 2008).

Ở nước ta, phát hiện được *rotavirus* là căn nguyên gây TCC trẻ em từ những năm 1980. Theo Đặng Đức Anh và CS (2005) nghiên cứu trên 5768 trường hợp giai đoạn từ 1988 đến 2003, bằng kỹ thuật ELSA đã phát hiện tỷ lệ *rotavirus* (+) từ 55% đến 56% trong các trường hợp TCC nhập viện. Trong nghiên cứu cũng cho tỷ lệ dương tính với *rotavirus* tương tự (59%) các trẻ TCC nhập viện giai đoạn 1998-2003 (N. Van Man và CS, 2005). TCC do *Rotavirus* ở Miền Bắc nước ta thường xuất hiện vào thời điểm giao mùa giữa mùa thu và đông, mùa đông và mùa xuân. Thời tiết khô, lạnh là điều kiện thích hợp để bệnh tiêu chảy do *Rotavirus* phát triển. Trong khi đó ở miền Nam không có mùa đông rõ rệt, nên tiêu chảy do *Rotavirus* xảy ra quanh năm. TCC trẻ em do *Rotavirus* ở nước ta vẫn chiếm tỷ lệ cao và đang trong tình trạng rất đáng quan tâm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm ở TCC trẻ em liên quan nhiễm *Rotavirus*.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**1. Bệnh nhân:** 95 bệnh nhân trẻ em TCC dưới 5 tuổi nhập viện tại bệnh viện đa khoa Hà Tây, Hà đông và bệnh viện Quân y 103 tham gia vào nghiên cứu này. Chẩn đoán xác định TCC và phân loại mất nước theo Tổ chức y tế Thế giới (1995). Các bệnh nhi được chia thành 3 nhóm:

Nhóm I. Mất nước mức độ nhẹ (độ A): 31 bệnh nhi

Nhóm II. Mất nước mức độ vừa (độ B): 34 bệnh nhi

Nhóm III. Mất nước mức độ nặng (độ C): 30 bệnh nhi

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân: Trẻ em dưới 5 tuổi vào viện được chẩn đoán xác định TCC theo tiêu chuẩn của Tổ chức y tế Thế giới (WHO): số lần đi đại tiện trên 3 lần/ngày và tính chất phân thay đổi: phân loãng, nhiều nước. Mức độ TCC được phân loại thành 03 nhóm mất nước mức độ nhẹ vừa và nặng (Duggan C và CS (1995), Chu Văn Tường (1999); Tổ chức y tế Thế giới (1995)).

Bảng 1. Phân loại mức độ mất nước theo biểu hiện lâm sàng

Mức độ	Mức độ nhẹ (độ A; mất <3% TLCT)	Mức độ vừa (độ B; (mất 3- 9% TLCT)	Mất nước mức độ nặng (Độ C; mất >9% TLCT)
Toàn trạng	Tốt, tỉnh táo	Vật vã kích thích	Li bì, hôn mê
Mất nước	Bình thường	Trũng	Rất trũng
Mắt	Có	Giảm	Không có khi khóc
Nước mắt	Ướt	Khô	Rất khô

Miệng lưỡi Khát	Không khát nước. Uống bình thường	Khát nước nhiều. Uống nhiều nước Nước tiểu giảm khối lượng	Uống kém, hoặc không thể uống nước Nước tiểu ít
Chân tay	Ấm	Mát	Lạnh; tím tái
Test véo da	Nếp véo da mất nhanh	Nếp véo da mất chậm, Da mất đàn hồi	Nếp véo da mất rất chậm. Da mất đàn hồi rất chậm >2 giây; Thóp lõm
HA, Mạch, Hô hấp	Mạch hơi nhanh, Huyết áp và hô hấp bình thường	Mạch nhanh nhỏ Huyết áp hạ, thở sâu, nhanh hơn bình thường	Mạch nhanh nhỏ hoặc không bắt được, Huyết áp tụt, thở nhanh sâu
Lượng nước tiểu	Bình thường đến giảm ít	Giảm	Rất ít

## 2. Bệnh phẩm.

- Mẫu phân bệnh nhi được thu thập theo đúng qui trình riêng rẽ từng bệnh nhân tránh nhiễm chéo qua dụng cụ lấy mẫu. Phân được pha loãng trong nước khử ion tỷ lệ 1:9 ly tâm 6000 vòng/phút ở 4 °C, 30 phút. Dịch nổi phân 10% được bảo quản -80°C cho đến khi sử dụng.

- Máu: máu tĩnh được lấy vừa đủ dùng phân tích điện giải chống đông heparin và huyết học chống đông EDTA.

**3. Tách RNA:** 140 µl dung dịch dịch nổi phân được dùng tách RNA virus. Kit tách RNA sử dụng bộ kit "QIAamp viral RNA" của hãng QIAGEN, Germany. Qui trình tách RNA virus theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm RNA sau khi tách được bảo quản ở -70 °C.

**4. Bộ mồi (Primers):** Các bộ primer dùng chẩn đoán nhiễm *rotavirus* và phân biệt kiểu gen của *rotavirus* mô tả chi tiết trong nghiên cứu gần đây (Gentsch và cs, 1992; Gouvea và cs, 1990; Iturriza-Gómara và cs, 2004, NL Toàn 2011). Hỗn hợp mồi chỉ pha đủ cho một lần chạy đồng tan chỉ một lần không dùng lại cho lần sau.

**5. Phản ứng multiplex RT-PCR:** *Rotavirus-RNA* trong mẫu bệnh phẩm được phát hiện bằng kỹ thuật PCR bán lồng (seminested -PCR) sử dụng kit RNA một bước (One step RT-PCR kit, QIAGEN). Phản ứng PCR lồng được thực hiện để chẩn đoán và phân biệt kiểu gen G của *Rotavirus*. Chu trình nhiệt của các phản ứng PCR như sau: Vòng PCR thứ nhất: sau 1 chu kì tổng hợp cDNA 45 °C x 30 phút và 95 °C x 5 phút, thực hiện 35 chu kì 94 °C x 1 phút, 46 °C x 2 phút và 72 °C x 1 phút. Vòng PCR thứ hai: cũng gồm 35 chu kì 94 °C x 1 phút, 55 °C x 2 phút và 72 °C x 1 phút.

Sản phẩm cDNA của phản ứng PCR thứ 2 được điện di trên gel Agarose 1,5% với Ethidium Bromide (0.5 mg%) trong đệm 1x TBE, 110 Vôn, dòng 80 mA, trong 45 phút, quan sát và chụp ảnh bằng máy soi Gel-Dolphil.

**6. Xét nghiệm máu và điện giải:** Lấy 2 ml máu tĩnh mạch chống đông EDTA hoặc Heparin dùng phân tích các chỉ số máu và điện giải. Sau khi lấy máu các chỉ số huyết học và điện giải được phân tích trong ngày. Kỹ thuật tiến hành trên máy phân tích

huyết học tự động và điện giải tại trung tâm y dược – Học viện Quân y.

**7. Phân tích và xử lý số liệu:** Số liệu nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sử dụng phần mềm STAT 7.0 (www.stata.com) và STAVIEW 4.57 (www.statview.com).

## KẾT QUẢ

### 1. Đặc điểm tuổi và giới.

- Tỷ lệ bệnh nhi tiêu chảy cấp nhập viện theo tuổi.

Bảng 2. Phân bố bệnh nhi mắc TCC theo lứa tuổi

Tuổi	Số lượng	%
0-1,5	74	78
1,5-3	18	19
3-5	2	3
Cộng	95	100

Đa số bệnh nhi tiêu chảy cấp nhập viện ở độ tuổi nhỏ hơn 18 tháng, chiếm tỷ lệ 78%, độ tuổi 1,5 – 3 là 19% và 3-5 tuổi là 3%. So sánh các số liệu lâm sàng và cận lâm sàng cho thấy không có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh nhi (Bảng 1, Hình 1).

- Phân bố theo giới tính:

Bảng 3. Phân bố về giới bệnh nhi mắc TCC theo lứa tuổi

Giới	Số lượng	%
Nam	62	65
Nữ	33	35
Cộng	95	100

Kết quả cho thấy tỷ lệ bệnh nhi nam chiếm chủ yếu 65% so với bệnh nhi nữ 35%. Tuy nhiên, không thấy sự khác biệt về lâm sàng, và điện giải và tẩn suất nhiễm Rotavirus cũng như kiểu gen của hai giới.

### 2. Liên quan mức độ mất nước và số lần đi ngoài.

Bảng 4. Liên quan mức độ mất nước và số lần đi ngoài trong ngày.

Nhóm nghiên cứu	≤5 lần	6-10 lần	>10 lần	Tổng số
Nhóm I: mất nước nhẹ (A)	15	14	2	31
Nhóm II: mất nước vừa (B)	12	13	9	34
Nhóm III: mất nước nặng (C)	6	11	13	30
Tổng số	34	38	24	95

Kết quả nghiên cứu cho thấy số lần đi ngoài trong ngày và mức độ mất nước có liên quan với nhau. Số lần tiêu chảy trên 10 lần chủ yếu dẫn đến mất nước độ B và độ C với tỷ lệ 87,5% (21/24) và số lần tiêu chảy dưới 5 lần ít gây nên tình trạng mất nước nặng (mức độ C) với tỷ lệ 8,3% (2/24 trường hợp). Bệnh nhi tiêu chảy trên 10 lần trong ngày thường gặp nhất ở nhóm C là 43% (13/30), nhóm B là 26,5% (9/34) và nhóm A là 6,5% (2/31). So sánh số lần đi ngoài với mức độ nặng của TCC giữa các nhóm cho thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa nhóm A so với nhóm B và C theo thứ tự  $P = 0,03$ ;  $\text{Chi}^2(1) = 4,62$  và  $P < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2(1) = 11,2$ . Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa số lần tiêu chảy và mức độ mất nước giữa nhóm B và C ( $p > 0,05$ ).

### 3. Kết quả phát hiện rotavirus trong phân bằng kỹ thuật RT-PCR đa môi.

Tất cả các mẫu phân được tách RNA và thực hiện phản ứng RT-PCR hai vòng (nested-RT-PCR) để xác định *rotavirus-RNA* trong phân bệnh nhi. Kết quả

cho thấy tỷ lệ *rotavirus-RNA* dương tính trong phân trẻ em mắc TCC là 78/95 (82%)

### 3.4. Mối liên quan giữa lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhi TCC.

Nghiên cứu sự liên quan của một số đặc điểm lâm sàng và điện giải của TCC do *rotavirus* với nguyên nhân TCC bằng phương pháp phân tích tương quan đa chiều giữa TCC có *rotavirus* dương tính và *rotavirus* âm tính với mức độ mất nước, điện giải, tỷ lệ hematocrite, % bạch cầu đa nhân trung tính, bạch cầu lympho... cũng như liên quan với genotype của *rotavirus*. Kết quả cho thấy không thấy có sự liên quan rõ rệt nào giữa TCC có rotavirus (+) và (-), kiểu gen của *rotavirus* với mức độ mất nước, điện giải, % hematocrit ... của bệnh nhi mắc TCC ( $P > 0,05$ ).

## BÀN LUẬN

### Đặc điểm lâm sàng TCC và tỷ lệ bệnh nhi TCC do rotavirus.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đa số bệnh nhi tiêu chảy cấp nhập viện ở độ tuổi nhỏ hơn 18 tháng, chiếm tỷ lệ 78%, độ tuổi 1,5 – 3 là 19% và 3-5 tuổi là 3%. So sánh các số liệu lâm sàng và cận lâm sàng cho thấy không có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh nhi mắc TCC phân loại theo mức độ mất nước. Phân bố theo giới chủ yếu là trẻ nam mắc TCC nhiều hơn trẻ nữ. Tỷ lệ phát hiện nguyên nhân TCC cho thấy có 78/95 (82%) mẫu phân dương tính với *rotavirus-RNA* cho thấy TCC trẻ em chủ yếu do *rotavirus*. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố gần đây như của Doan TL, Phung và CS (2003) trên trẻ em mắc TCC ở TP Hồ Chí Minh cho tỷ lệ *Rotavirus* (+) là 65,6%. Nghiên cứu Nguyễn Văn Mẫn và cộng sự (2005) cho tỷ lệ nhiễm *Rotavirus* ở các trẻ em TCC nhập viện là 50-70%. Có sự giao động về tỷ lệ mắc giữa các nghiên cứu có thể do nhiều nguyên nhân như khu vực địa lý, tuổi, phương pháp phát hiện cũng như thời gian lấy mẫu bệnh phẩm. Trong nghiên cứu của Doan và cs (2003) cho thấy tỷ lệ TCC trẻ em do *rotavirus* ở thành phố Hồ Chí Minh là 65,6%; tác giả Đặng Đức Anh và cs (2005) nghiên cứu trên 5768 trường hợp tại 4 khu vực Hà Nội, Hải Phòng, Khánh Hòa và Hồ Chí Minh giai đoạn từ 1988 đến 2003, bằng kỹ thuật ELSA xác định tỷ lệ TCC trẻ em nhập viện có căn nguyên do Rotavirus từ 47-62%. Có sự giao động về tỷ lệ mắc giữa các khu vực và nghiên cứu có thể do nhiều nguyên nhân như khác nhau về khu vực địa lý, tuổi, thời gian lấy mẫu, phương pháp xét nghiệm... Trong nghiên cứu này chúng tôi dùng kỹ thuật RT-PCR lồng còn các nghiên cứu khác chủ yếu dùng kỹ thuật ELISA.

Người ta thấy rằng TCC do *rotavirus* ở Miền Bắc nước ta thường xuất hiện vào thời điểm giao mùa giữa mùa thu và đông, mùa đông và mùa xuân. Thời tiết khô, lạnh là điều kiện thích hợp để bệnh tiêu chảy do *rotavirus* phát triển. Trong khi đó ở miền Nam không có mùa đông rõ rệt, nên tiêu chảy do *rotavirus* xảy ra quanh năm, không bùng phát thành dịch như phía Bắc (Doan và cs, 2003). Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành lấy mẫu từ tháng 12 đến tháng 10, bao trùm

cả mùa đông và xuân đây là mùa TCC trẻ em thường liên quan đến nguyên nhân do virus gây ra.

## **2. Liên quan biểu hiện lâm sàng TCC, kiểu gen của virus với căn nguyên TCC trẻ em do rotavirus.**

Phân tích đa chiều sử dụng chương trình thống kê chuyên dụng cho thấy chưa có sự khác biệt giữa các biểu hiện lâm sàng với căn nguyên TCC do hay không do rotavirus. Hệ gen của rotavirus bao gồm 11 đoạn ARN sợi kép mã hóa cho các protein cấu trúc (VP) hoặc không cấu trúc (NVP). Cấu trúc vỏ capsit của rotavirus gồm 3 lớp: lớp lõi chứa các protein cấu trúc VP1, VP2, VP3 được mã hóa nhờ các gen số 1, 2 và 3; lớp trong là VP6 – một loại kháng nguyên đặc hiệu nhóm do gen số 6 mã hóa; lớp ngoài cùng là VP4 và VP7, trong đó VP7 có bản chất là glycoprotein (G protein) được mã hóa do gen số 9 của rotavirus còn VP4 là protein nhạy cảm với protease (P protein) được mã hóa bởi gen số 4. Hai gen này gây đáp ứng miễn dịch tạo các kháng thể trung hòa và có liên quan đến miễn dịch bảo vệ, xác định tính đặc hiệu kiểu gen của virus, vì vậy nó được sử dụng để đặt tên cho các chủng rotavirus. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, hiện có tới 19 kiểu gen G, 27 kiểu gen P và 11 VP6 đã được phát hiện cả ở người và ở động vật. Tuy nhiên, gây bệnh cho người chủ yếu kiểu gen G1, G2, G3, G4, G9 và phối hợp với P8, P4 và P6 (Matthijnssens J và cs, 2008). Kết quả công bố gần đây chúng tôi chỉ ra rằng kiểu gen của rotavirus gây TCC trẻ em khu vực Hà Đông, Hà Nội gần đây chủ yếu là kiểu gen G. Trong đó rotavirus kiểu gen G3 chiếm đa số với tỷ lệ 70,5%, G1 chiếm 14,1% và đồng/bội nhiễm G1 với G3 là 9% (Nguyễn Linh Toàn và CS., 2011). Một số nghiên cứu gần đây cho thấy rotavirus ở Việt Nam thường mang kiểu gen G1P8, ngoài ra có một tỷ nhỏ các chủng G2P4, G1P4, G4P8, G4P6, G3P8 (Nguyễn Văn Mẫn và cs, 2006; Martella và cs, 2001, Đặng Đức Anh và cs, 2005). Có sự khác biệt giữa các nghiên cứu của

các tác giả khác có thể được giải thích là có thể trong một thời gian dùng các vắc xin chống lại virus rotavirus có kiểu gen G1 có thể làm cho tỷ lệ lưu hành nhóm G1 giảm xuống hoặc do sự khác biệt về khu vực địa lí.

## **KẾT LUẬN**

Nghiên cứu trên 95 bệnh nhi mắc TCC cho thấy, tuổi hay mắc TCC thường trong 3 năm đầu đời, trẻ em nam gặp nhiều hơn trẻ em nữ. Nguyên nhân gây TCC trẻ em chủ yếu là do rotavirus, chiếm tỷ lệ 82% trong mẫu phân trẻ em TCC ở khu vực Hà Đông, Hà Nội. Chưa thấy có sự liên quan khác biệt rõ rệt giữa lâm sàng, xét nghiệm máu và điện giải với tình trạng mắc TCC do rotavirus.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đặng Đức Anh. Bệnh tiêu chảy cấp do virus rota ở Việt Nam 1998-2003. Tạp chí y học dự phòng, tập XV, số 1, 2005, 5-7.
2. Nguyen Van Man, Luan LT and D.D. Trach et al. (2005). Epidemiological profile and burden of Rotavirus diarrhea in Vietnam: 5 years of sentinel hospital surveillance, 1998–2003, J Infect Dis 192; S127–S132.
3. Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H. Epidemiological features of Rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. J Med Virol. 2003 Apr;69(4):588-94.
4. Nguyễn Linh Toàn và CS., 2011. Phân bố kiểu gen rotavirus ở bệnh nhân tiêu chảy cấp trẻ em. Tạp chí y học thực hành 2011.
5. Estes M. 1996. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Holey PM, editors. Fields Virology, 3rd edition, vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Press. p 1625–1655.
6. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorzilia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. Identification of group A Rotavirus gene 4 types by PCR. J Clin Microbiol 30:1365–1373.