

NIỄM ROTAVIRUS Ở TRẺ EM TIÊU CHẢY CẤP KHU VỰC HÀ ĐÔNG, HÀ NỘI

NGUYỄN LĨNH TOÀN

TÓM TẮT

Rotavirus là nguyên nhân hàng đầu gây tiêu chảy cấp (TCC) ở trẻ em. Nghiên cứu tiến hành trên 95 trẻ em dưới 5 tuổi mắc TCC. Rotavirus-RNA trong phân được phát hiện bằng kỹ thuật multiplex RT-PCR. Kết quả cho thấy Rotavirus-RNA dương tính trong phân trẻ mắc TCC là 78/95 (82%). Phân tích kiểu gen G của Rotavirus chứng minh kiểu gen G3 chiếm ưu thế 55/78 (70,5%), tiếp đến là G1 11/78 (14,1%) và phối hợp G1 và G3 là 7/78 (9%). Tóm lại, Rotavirus là nguyên nhân chính gây TCC trẻ em (82%) với hai kiểu gen phổ biến là G3 và G1 ở khu vực Hà đông, Hà Nội.

Từ khóa: Rotavirus, tiêu chảy cấp.

SUMMARY

Rotavirus is mainly caused acute diarrhea in children world-wide. 95 acute diarrhea children under 5 year old were enrolled in this study. Rotavirus-RNA in stool samples were examined by using multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. Result showed that Rotavirus-RNA was detected in 78 of 95 (82%) stool samples. Genotyping analysis demonstrated the Rotavirus G3 was predominant genotypes (70.5%), following by Rotavirus G1 (14.1%) and co-infected G1 and G3 genotype (9%). In summary, Rotavirus is mainly caused of diarrhea in children (82%) with two predominant kiểu gen G3 and G1 in Hadong area, Hanoi.

Keywords: Rotavirus, diarrhea, multiplex RT-PCR

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rotavirus là căn nguyên quan trọng gây tiêu chảy cấp (TCC), đặc biệt là trẻ em dưới 5 tuổi. Ở các nước đang phát triển có tỷ lệ TCC do Rotavirus từ 40 - 60%. Mỗi năm hàng trăm nghìn ca tử vong do Rotavirus ở các nước đang và chưa phát triển (Gray và cs, 2008).

Ở nước ta TCC do Rotavirus chiếm khoảng 54% các trường hợp tiêu chảy nhập viện. Ước tính khoảng 7500 trẻ chết mỗi năm do TCC trong đó nguyên nhân chủ yếu là do Rotavirus. Bởi vậy, chẩn đoán sớm và đúng nguyên nhân gây TCC để có biện pháp điều trị thích hợp là rất cần thiết (Đặng Đức Anh và cs, 2005; Nguyễn Văn Mẫn và cs, 2005).

Rotavirus có hình cầu, đường kính 70 - 80 nm, thuộc hệ gene RNA sợi kép gồm 11 mảnh ARN khác nhau, genome có kích thước 16 - 17 kb. Rotavirus được chia làm 7 nhóm kí hiệu từ A đến G, trong đó nhóm A là nhóm chủ yếu gây TCC ở trẻ em (Estes M. 1996; Matthijnsens J và cs, 2008).

Có nhiều phương pháp phát hiện Rotavirus thường dùng gồm miễn dịch gắn enzyme (ELISA), khuếch tán miễn dịch, sắc ký miễn dịch, ngưng kết latex... nhưng độ nhạy và đặc hiệu hạn chế. Hiện nay, kỹ thuật sinh học phân tử như RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) và PCR đa môi đã khắc phục được những hạn chế của các kỹ thuật trên và đã bổ sung thêm cho các phương pháp chẩn đoán kinh điển. Kỹ thuật này có độ nhạy và đặc hiệu cao cho phép phát hiện lượng virus thấp trong mẫu bệnh phẩm và cho phép xác định kiểu gen của virus.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành với các mục tiêu xác định tỷ lệ và kiểu gen của Rotavirus gây TCC trẻ em khu vực Hà Đông, Hà Nội.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Mẫu bệnh phẩm: 95 mẫu phân của trẻ em TCC dưới 5 tuổi nhập viện tại bệnh viện đa khoa Hà Tây (cũ) và bệnh viện Quân y 103. Chẩn đoán xác định TCC và phân loại mất nước theo Tổ chức y tế thế giới (1995). Các mẫu phân được thu thập theo đúng qui trình riêng rẽ từng bệnh nhân tránh nhiễm chéo qua dụng cụ lấy mẫu.

2. Xử lý bệnh phẩm: 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.

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. Môi (Primer): Các cặp primer dùng chẩn đoán và phân biệt kiểu gen của Rotavirus mô tả chi tiết trong bảng 1 (Gentsch và cs, 1992; Gouvea và cs, 1990; Iturriza-Gómara và cs, 2004).

Bảng 1. Trình tự các primer dùng phát hiện và phân biệt kiểu gen của Rotavirus.

Primer	Trình tự primer (5'-3')	Kích thước (bp)	Vị trí
Rota1F	GGCTTTAAAAGAGAGAAATTTCC	1062	21-22
Rota1R	GGTCACATCATAACAATTCTAATC		1062-1032
G1F	GCAAGTACTCAAATCAATGATG	749	313-334
G2F	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	651	411-435
G3F	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	374	689-709
G4F	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	582	480-498
G9F	CTAGATGTAACACTACTAC	305	757-776
G5R	CACGTACTCGTTGTTACGTC	778	779-760
G6R	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	498	499-481
G8R	CGGTTCCGGATTAGACAC	272	273-256
G10R	TTCAGCCGTTGCGACTTC	713	714-697
G11R	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	335	336-316

Phản ứng RT-PCR thứ nhất dùng cặp primer Rota1F và Rota1R, kích thước sản phẩm PCR là 1062 bp.

Phản ứng PCR thứ hai dùng hai tổ hợp primer: Tổ hợp primer thứ nhất gồm các mẫu: RotaR và các mẫu G1F, G2F, G3F, G4F và G9F, theo lần lượt cho các sản phẩm PCR là 749, 652, 374, 538 và 306 bp.

Tổ hợp thứ hai gồm các mẫu Rota1F và G5R, G6R, G8R, G10R và G11R theo lần lượt cho các sản phẩm tương ứng 779, 499, 273, 714 và 336 bp.

Hỗn hợp mỗi 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. 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. Tỷ lệ Rotavirus-RNA. Bằng kỹ thuật multiplex RT-PCR đã xác định được tỷ lệ nhiễm Rotavirus trong phân trẻ em TCC là 78/95 (82%). Xét nghiệm RT-PCR được xác định dương tính với Rotavirus (Hình 1.) khi xuất hiện băng sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% với kích thước tương ứng như đã mô tả trong bảng 1. So với kết quả phát hiện Rotavirus ở những trẻ TCC nhập viện ở một số tỉnh trong cả nước của một số tác giả khác giao động từ 47-62%. Tuy nhiên

các tác giả này xác định bằng kỹ thuật ELISA, thường độ nhạy thấp hơn nhiều so với RT-PCR lồng.

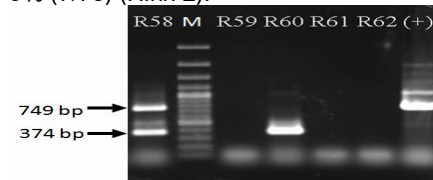


Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đa mẫu trên gel agarose 1,5%.

Các mẫu R19, R20, R21 và R26 dương tính với Rotavirus. Băng sản phẩm PCR tương ứng 374 bp (Rotavirus kiểu gen G3); các mẫu R18 âm tính; chứng dương là chủng Rotavirus kiểu gen G1P8 đã biết; M: thang chuẩn DNA 100 bp.

2. Kiểu gen của Rotavirus.

Sản phẩm PCR dùng phân tích kiểu gen của Rotavirus được điện di trên gel agarose 1,5% và nhuộm DNA bằng Ethidium Bromide. Kết quả phân tích kiểu gen G của Rotavirus chứng minh chỉ tồn tại hai kiểu gen G3 và G1 gây bệnh TCC trẻ em ở nghiên cứu này. Trong đó kiểu gen chiếm ưu thế là kiểu gen G3: 70,5% (55/78), kiểu gen G1: 14,1% (11/78) và đồng/bội nhiễm hai kiểu gene G3 với G1: 9% (7/78) (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh phân biệt kiểu gen của Rotavirus bằng multiplex RT-PCR.

Mẫu R58 đồng nhiễm kiểu gen G3 (374bp) và G1 (749 bp), R60 mang kiểu gen G1, chứng dương là chủng Rotavirus đã biết mang kiểu gen G1P8; M: thang chuẩn DNA 100 bp

BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy kỹ thuật RT-PCR đa mẫu cho phép xác định nhiễm Rotavirus trong mẫu phân bệnh TCC trẻ em. Đồng thời phân biệt được các kiểu gen của Rotavirus dựa vào các kích thước khác nhau sản phẩm PCR khi sử dụng các cặp mẫu đặc hiệu khác nhau.

Tỷ lệ rotavirus trong mẫu phân phát hiện được tới 82% cho thấy đây là căn nguyên chính gây bệnh TCC ở trẻ em dưới 5 tuổi. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố gần đây như Doan và cs (2003) cho thấy tỷ lệ TCC trẻ em do Rotavirus ở thành phố Hồ Chí Minh là 65,6%; theo 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 lí, tuổi, thời gian lấy mẫu, phương pháp xét nghiệm... Trong nghiên cứu này chúng tôi dùng kỹ thuật RT-

PCR lỏng 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.

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 (Matthijnsens J và cs, 2008).

Kết quả nghiên cứu này cho thấy chỉ xuất hiện hai kiểu gen G của Rotavirus gây TCC trẻ em khu vực Hà Đông, Hà Nội. Trong đó Rotavirus mang kiểu gen G3 là chiếm đa số với tỷ lệ 70,5%, kiểu gen G1 chiếm 14,1% và đồng/bội nhiễm G1 với G3 là 9%. 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 trong nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả khác có thể được giải thích là có thể trong một thời gian dùng các vắc xin chống lại virus 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 cũng như cỡ mẫu nghiên cứu còn ít.

KẾT LUẬN

Nguyên nhân gây TCC trẻ em dưới 5 tuổi chủ yếu là do Rotavirus, chiếm tỷ lệ 82% trong mẫu phân trẻ em TCC ở khu vực Hà Đông, Hà Nội. Tồn tại hai kiểu gen G3 và G1 của Rotavirus gây bệnh TCC trẻ em ở khu vực Hà Đông với kiểu gen G3 chiếm 70,5%, kiểu gen G1 là 14,1% và đồng/bội nhiễm hai kiểu gen G1 và G3 là 9%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Đức Anh. Bệnh tiêu chảy cấp do virut 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. 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.
5. 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.
6. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of Rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276–82.
- Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human Rotaviruses. *J Clin Virol*. 2004 Dec;31(4):259-65