Vietnam Journal of Community Medicine, Special Issue (2022) 63-69

COMPARISON OF REALTIME-PCR TO ELISA FOR THE DETECTION OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN THAI BINH PEDIATRIC HOSPITAL

Nguyen Duy Chuc*

Thai Binh Pediatric Hospital - 2 Ton That Tung, Tran Lam, Thai Binh City, Thai Binh, Vietnam

Received 31/05/2022
Revised 06/07/2022; Accepted 15/08/2022

ABSTRACT

Objective: This paper presents the results of comparison of Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) to Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of human cytomegalovirus infection in paediatric patients and determine the correlation between clinical features to Elisa and Realtime PCR.

Subjects and methods: This study was carried out to detect human cytomegalovirus IgG and IgM antibodies using Elisa in under 6 years old paediatric patients in ThaiBinh paediatric hospital and to improve the diagnosis of HCMV through the introduction of PCR testing. There were 132 patients in the study.

Results: The results revealed that HCMV IgG was present in patients' blood 124/132 (93.9%), while 90/132 (68.2%) had IgM, 78/132 (59.1%) had IgG and IgM. HCMV DNA viral loads were detected in patients had IgG 74.2% and 94.4% in patients had IgM using Real-time PCR. However, the rate of detection HCMV DNA in negative samples are 12.5% in IgG {-} patients and 26.2% in IgM {-} patients.

Conclusion: This result is the basis for the right treatments in patients to avoid unfortunate complications.

Keywords: CMV, IgG, IgM, paediatric patients, new-born.

*Corressponding author
Email address: duychuc25@gmail.com
Phone number: (+84) 983 926 677
https://doi.org/10.52163/yhc.v63iChuyên%20đề%20tháng%209.404

NGHIÊN CỨU SO SÁNH HIỆU QUẢ CỦA PHƯƠNG PHÁP REALTIME PCR VÀ ELISA TRONG CHẨN ĐOÁN PHÁT HIỆN NHIỄM CMV TẠI BỆNH VIỆN NHI THÁI BÌNH

Nguyễn Duy Chúc*

Bệnh viện Nhi Thái Bình - 2 phố Tôn Thất Tùng, phường Trần Lãm, thành phố Thái Bình, Thái Bình, Việt Nam

Ngày nhận bài: 31 tháng 05 năm 2022
Chỉnh sửa ngày: 06 tháng 07 năm 2022; Ngày duyệt đăng: 15 tháng 08 năm 2022

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu đánh giá hiệu quả của phương pháp Elisa với phương pháp Realtime PCR trong xét nghiệm phát hiện CMV. Đồng thời, nghiên cứu xác định mối tương quan giữa đặc điểm lâm sàng với kết quả Elisa và Realtime PCR.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành trên mẫu bệnh phẩm là máu của nhóm trẻ dưới 6 tuổi khám và điều trị bệnh tại các khoa lâm sàng. Nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm CMV bằng phương pháp Elisa xác định kháng thể immunoglobulin G - IgG, immunoglobulin M - IgM. Nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm CMV bằng phương pháp realtime PCR trên số liệu thu thập được ở phương pháp Elisa.

Kết quả nghiên cứu: Trong132 bệnh nhân được chỉ định xét nghiệm kháng thể IgG, IgM cho thấy, có 124/132 (93.9%) số bệnh nhi phát hiện kháng thể IgG; 90/132 (68.2%) số bệnh nhi phát hiện kháng thể IgM; 78/132 (59.1%) số bệnh nhi phát hiện đồng thời 2 kháng thể IgG và IgM. Tỷ lệ mẫu dương tính DNA của CMV là 96/132 (72.7%). Đối với mẫu có IgG {+}, tỷ lệ DNA {+} là 74.2%; IgM {+}, tỷ lệ DNA {+} 94.4%. Tuy nhiên, đối với các mẫu có IgG {-}, tỷ lệ phát hiện DNA {+} là 12.5%; IgM {-}, tỷ lệ phát hiện DNA {+} là 26.2%.

Kết luận: Kết quả này là cơ sở để đưa ra liệu pháp đúng đắn và kịp thời điều trị cho bệnh nhân, tránh những biến chứng đáng tiếc.

Từ khóa: CMV, IgG, IgM, trẻ sơ sinh, bệnh nhi.

*Tác giả liên hệ
Email: duychuc25@gmail.com
Điện thoại: (+84) 983 926 677
https://doi.org/10.52163/yhc.v63iChuyên%20đề%20tháng%209.404

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

CMV (Human Cytomegalovirus) ở người thuộc họ Herpesviridae còn được gọi là Human Herpesvirus 5 (HHV-5) [6]. CMV là tác nhân gây bệnh cơ hội. Cũng như các vi rút khác thuộc họ Herpesviridae, vi rút có thể tồn tại trong vật chủ ở trạng thái tiềm ẩn sau khi lây nhiễm [8]. Nó là một loại vi rút phổ biến, tỷ lệ lưu hành huyết thanh từ 30 đến 100% ở khắp các quốc gia. HCMV có thể lây truyền qua đường máu hoặc tiếp xúc với dịch tiết cơ thể mang vi rút hoặc thông qua việc ghép tạng [5]. CMV gây tử vong cao đối với bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch, đặc biệt là ở những bệnh nhân ghép tạng và ghép tủy [5]. Nhiễm CMV bẩm sinh là nhiễm trùng bào thai thường gặp nhất tính trên toàn thế giới và chiếm tỷ lệ vào khoảng 0.2-2.2% tất cả trẻ sơ sinh. Ở trẻ em bị nhiễm CMV phần lớn không thể hiện triệu chứng lâm sàng [3].

Do đó, việc phát hiện sớm CMV có ý nghĩa rất quan trọng, là cơ sở xây dựng phác đồ điều trị và tránh được những tai biến không đáng có đối với trẻ em. Elisa trước đây đã được sử dụng để phát hiện kháng thể đặc hiệu CMV (IgG và IgM) chẩn đoán xác định nhiễm CMV. Tuy nhiên, hiện tại, độ đặc hiệu và độ nhạy thấp của phương pháp ELISA được sử dụng đã được báo cáo trong một số nghiên cứu đánh giá.

Hiện nay, Bệnh viện Nhi Thái Bình cũng đang triển khai và ứng dụng cả 2 phương pháp Realtime PCR và Elisa trong chẩn đoán CMV phục vụ công tác chẩn đoán và điều trị cho bệnh nhân. Tuy nhiên, tính hiệu quả của cả 2 phương pháp chưa được đánh giá về sự khác biệt trong chẩn đoán phát hiện CMV trên mẫu bệnh phẩm. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đưa ra thông tin sơ bộ về nhiễm HCMV, đặc biệt ở trẻ em và cải thiện việc chẩn đoán nhiễm CMV ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi tỉnh Thái Bình.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu dữ liệu bệnh nhân và thu thập mẫu sinh học

Nghiên cứu tiến hành trên 132 mẫu huyết thanh của trẻ em dưới 6 tuổi khám và điều trị bệnh tại các khoa lâm sàng từ tháng 03 năm 2020 đến tháng 03 năm 2021, có chỉ định xét nghiệm Elisa xác định kháng thể IgG (+), {IgM (+), IgM (-)} hoặc IgG (-), IgM (+).

Bệnh phẩm là máu toàn phần được lấy, vận chuyển đến khoa xét nghiệm theo quy định trong tài liệu "Quản lý mẫu bệnh phẩm truyền nhiễm" của Bộ Y tế ban hành năm 2018.

Bệnh phẩm được đối chiếu với các thông tin của bệnh nhân theo hồ sơ bệnh án. Dữ liệu thu thập được bao gồm tuổi, giới tính, khu vực sống, ngày lấy mẫu và khoa điều trị trong quá trình thu thập mẫu. Ly tâm tách huyết thanh, bệnh phẩm sau khi xử lý có thể bảo quản trong 48h ở nhiệt độ 2^0C-8^0C đối với xét nghiệm Elisa và 24h ở nhiệt độ 2^0C- 8^0C, hoặc bảo quản 90 ngày ở -20^0C đối với xét nghiệm PCR.

Phương pháp Elisa và Realtime PCR

Nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm CMV bằng phương pháp Elisa xác định kháng thể IgG, IgM. Các bước thực hiện theo quy trình xét nghiệm XN5.5- QTVS 34,35 tại bệnh viện Nhi Thái Bình. Nghiên cứu sử dụng bộ sinh phẩm xét nghiệm kháng thể IgG và IgM CMV (Biokit, Diapro, Mỹ) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm CMV bằng phương pháp realtime PCR trên số liệu thu thập được ở phương pháp Elisa. Các bước thực hiện theo quy trình xét nghiệm XN5.5-QTSP01 tại Bệnh viện Nhi Thái Bình. DNA được chiết xuất từ 200 µL huyết tương bằng bộ kit tách chiết DNA (Việt Á, Việt Nam).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu xác định được số lượng trẻ được xét nghiệm tìm kháng thể của CMV trong máu mà kết quả khẳng định có từ một hoặc hai loại kháng thể là IgG và IgM. Từ kết quả nghiên cứu phân loại được tỷ lệ có kháng thể theo từng lứa tuổi của trẻ.

3.1. Phát hiện kháng thể CMV

Bảng 1. Kháng thể IgG, IgM CMV trong nghiên cứu

Độ tuổi của trẻ	Số lượng mẫu	IgG {+}		IgM {+}		IgG {+} và IgM {+}	
		Số lượng	%	Số lượng	%	Số lượng	%
Trẻ sơ sinh (0 - 28 ngày)	30	29	96.6	19	63.3	19	63.3
Trẻ nhũ nhi (1 – 12 tháng)	45	43	95.5	33	73.3	33	73.3
Trẻ răng sữa (1- 6 tuổi)	57	52	91.2	38	66.6	26	45.6
Tổng số	132	124	93.9	90	68.2	78	59.0

Nghiên cứu cho thấy kháng thể IgG xuất hiện ở 124 bệnh nhi (93.9%), nhóm trẻ sơ sinh (0-28 ngày tuổi) chiếm tỷ lệ cao nhất 96.6% và thấp nhất là trẻ ở nhóm 1-6 tuổi chiếm 91.2% (Bảng 1).

Trong khi đó, kháng thể IgM xuất hiện ở 90 bệnh nhi (68.2%); cao nhất là nhóm trẻ nhũ nhi (1-12 tháng tuổi) chiếm 73.3% và thấp nhất là nhóm tuổi sơ sinh chiếm 63.3% (Bảng 1).

Tỷ lệ phát hiện đồng thời 2 loại kháng thể IgG, IgM chiếm 59% và không khác biệt nhiều theo từng nhóm tuổi; tỷ lệ cao nhất nằm ở nhóm tuổi nhũ nhi (1- 12 tháng tuổi) 73.3%; tỷ lệ thấp nhất xuất hiện ở nhóm tuổi trẻ răng sữa (1-6 tuổi) 45.6% (Bảng 1).

Kết quả nghiên cứu chỉ ra tỷ lệ kháng thể IgG, IgM phát hiện ở trẻ nữ cao hơn trẻ nam gần 1.4 lần. Trong 124 trẻ có kháng thể IgG thì 51 trẻ nam (41.1%) và 73 trẻ nữ (58.9%). Tromg 90 trẻ có kháng thể IgM thì 38 trẻ nam (42.2%) và 52 trẻ nữ (57,8%).

Tỷ lệ kháng thể IgG, IgM trong nhóm trẻ nghiên cứu sống ở nông thôn cao hơn trẻ sống ở thành thị. Trong đó, nhóm trẻ có kháng thể IgG ở nông thôn là 76 trẻ, thành thị là 48 trẻ; kháng thể IgM có ở 61 trẻ nông thôn và 29 trẻ thành thị.

3.2. Phát hiện DNA CMV

Bảng 2. DNA của CMV trong mẫu nghiên cứu theo độ tuổi

Độ tuổi của trẻ	Số lượng mẫu	DNA dương tính	
		Số lượng	%
Trẻ sơ sinh (0 - 28 ngày)	30	20	66.6
Trẻ nhũ nhi (1 – 12 tháng)	45	42	93.3
Trẻ răng sữa (1- 6 tuổi)	57	34	59.6
Tổng số	132	96	72.7

Tỷ lệ DNA của CMV trong nhóm trẻ nghiên cứu có sự khác biệt theo từng độ tuổi. Tỷ lệ phát hiện cao nhất ở trẻ nhũ nhi (1- 12 tháng tuổi) 93.3%; tỷ lệ phát hiện thấp nhất ở trẻ răng sữa (1-6 tuổi) 59.6% (Bảng 2). Tỷ lệ DNA của CMV phát hiện ở trẻ nữ cao hơn trẻ nam và phát hiện ở trẻ sống vở nông thôn cao hơn trẻ sống ở thành thị. Trong số 52 trẻ nông thôn phát hiện DNA CMV thì có 23 trẻ nam và 29 trẻ nữ. Có 19 trẻ nam và 25 trẻ nữ trong tổng số 44 trẻ thành thị phát hiện có DNA CMV.

3.3. So sánh tỷ lệ kháng thể IgG và IgM với DNA

Bảng 3. Nồng độ kháng thể với số lượng copies DNA của CMV

Nồng độ kháng thể (IU/ml)		Số lượng copies DNA của CMV (copies/ml)			
		($10 \div 10^2$)	**($10^2 \div 10^4$)**	**($10^4 \div 10^6$)**	**($10^6 \div 10^8$)**
IgG	(0÷0,5)	7	1	0	0
	(0,5÷1)	6	13	5	0
	(1÷2)	9	15	9	0
	(2÷4)	12	19	9	1
	(4÷8)	5	12	8	0
IgM	(0÷0,5)	31	8	3	0
	(0,5÷1)	3	4	9	1
	(1÷2)	2	8	14	1
	(2÷4)	3	10	18	2
	(4÷8)	0	6	8	1

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

Đối với 124 mẫu xuất hiện kháng thể IgG, phát hiện 92 mẫu (74.2%) DNA dương tính. Đối với 8 mẫu âm tính IgG, phát hiện 1 mẫu (12.5%) DNA dương tính.

Đối với 90 mẫu xuất hiện kháng thể IgM, có 82 mẫu (91.1 %) phát hiện DNA dương tính. Đối với 42 mẫu âm tính IgM, phát hiện 11 mẫu (26.2%) DNA dương tính.

Đối với kháng thể IgG: Nồng độ kháng thể cao nhưng đa số không thấy có mối liên quan tới số lượng bản copies DNA CMV. Đối với kháng thể IgM: Từ kết quả nghiên cứu cho thấy không có mối liên quan giữa nồng độ kháng thể với số lượng bản copie DNA CMV (Bảng 3).

4. BÀN LUẬN

CMV là tác nhân gây bệnh thường xuyên nhất trong các bệnh nhiễm trùng bẩm sinh của trẻ nhỏ. Nhiễm trùng cytomegalovirus (CMV) có thể gây ra các biến chứng nghiêm trọng ở những trẻ nhỏ bị suy giảm miễn dịch và các bệnh liên quan tới hô hấp, tiêu hóa…

Với phương pháp huyết thanh học là xét nghiệm chẩn đoán phát hiện các kháng thể lưu hành, xác định tiền sử của các bệnh nhiễm trùng trước đó

dựa vào nồng độ kháng thể IgG và các nhiễm trùng cấp tính thông qua IgM. Kháng thể IgG xuất hiện muộn hơn IgM nhưng lại có thể kéo dài nhiều năm. Tuy nhiên sau khi bị nhiễm tiên phát vẫn có thể tái nhiễm do sự kích hoạt của virus tiềm ẩn hoặc nhiễm ngoại sinh. Như vậy từ các kết quả chẩn đoán chúng ta có các trường hợp xảy ra như sau:

Thứ nhất, khi kết quả IgG {-}, IgM {-} được xác định là bệnh nhân không nhiễm CMV.

Kết quả này phụ thuộc thời điểm lấy mẫu, hoặc IgM chưa kịp sản sinh sau nhiễm trùng sơ cấp.

Thứ hai, khi kết quả IgG {+}, IgM {-} bệnh nhân được xác định là nhiễm CMV trước đó.

Thứ ba, khi kết quả IgG {-}, IgM {+} bệnh nhân được xác định là nhiễm CMV tiên phát.

Thứ tư, khi kết quả IgG {+}, IgM {+} bệnh nhân đươc xác định nhiễm CMV tiên phát hoặc tái phát. Tuy nhiên các kháng thể IgM có thể tồn tại một thời gian dài ở người khỏe mạnh. Trong nghiên cứu của chúng tôi, với 42 mẫu IgM {-} có 11 mẫu DNA {+}, như vậy có thể quá trình chuyển kháng thể vào huyết thanh bị trễ, do đó nếu chỉ sử dụng phương pháp Elisa chúng ta sẽ không đánh giá kịp thời tình trạng của người bệnh. Bên cạnh đó, 8 mẫu dương tính với IgM nhưng lại không thấy có mặt của DNA điều này phù hợp với giả thuyết về dương tính giả của IgM.

Với kết quả nghiên cứu cho thấy 42 mẫu âm tính với IgM có nồng độ (0÷0,5)UI/ml thì có 31 mẫu số lượng DNA nhỏ hơn 10^2 copie được xác định là dưới ngưỡng phát hiện, 9 mẫu có số lượng DNA từ (10^2÷10^6) copie chứng tỏ rằng đang có sự nhân lên của virus. Tuy nhiên với 8 mẫu có kết quả nồng độ kháng thể từ (0,5÷ 4) UI/ml thì lại không thấy sự có mặt của DNA điều này khẳng định hiện tượng dương tính giả của IgM khi thực hiện bằng phương pháp Elisa.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy, trong số 132 bệnh nhi, có 93.9% trẻ có kháng thể IgG và 68.2% trẻ có kháng thể IgM; số trẻ có đồng thời 2 kháng thể chiếm 59.1%. Tỷ lệ mẫu dương tính DNA của CMV là 72,7%.

KIẾN NGHỊ

Kiến nghị các cơ sở y tế nên áp dụng phương pháp xét nghiệm Realtime-PCR để nhanh chóng phát hiện, chẩn đoán nhiễm CMV, từ đó có liệu pháp đúng đắn và kịp thời điều trị cho bệnh nhân, tránh những biến chứng đáng tiếc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Nga CM, Application of moleculer biology techniques for diagnositic infectious disease, Training Ducuments, Ministry of Health – Paster Institute in Ho Chi Minh City, 2008.

[2] Chinh LH, Medical Microbiology, Medical Publishing House, Ho Chi Minh Branch, 2007.

[3] Nghia NA, "Congenital CMV infection", Reproductive Medicine 44, 2017, P 59-62.40.

[4] Enan KA, Rennert H, El-Eragi AM et al., Comparison of Real-time PCR to ELISA for the detection of human cytomegalovirus infection in renal transplant patients in the Sudan, Virology Journal 8: 222, 2011.

[5] Benz C, Mternohen O, Wulf A et al., Activated virus specific talls are early indicator of anti-CMV immune reaction in liver transplant patients. Gastroenterology, 5: 46–122 (2000).

[6] Mocarski ES, Courcelle CT, Cytomegaloviruses and their replication. in Fields Virology, ed. by DM. Knipe, and PM.

Howley (Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2001), pp. 2629–2673.

[7] Enan KA, Rennert H, El-Eragi AM et al., Comparison of Real-time PCR to ELISA for the detection of human cytomegalovirus infection in renal transplant patients in the Sudan, Virology Journal 8: 222, 2011.

[8] Emery VC, Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. J Clin Pathol. 54, 84–88 (2001). doi:10.1136/jcp.54.2.84.