

Thiết lập phương pháp phát hiện *Human metapneumovirus* gây viêm phổi ở người bằng kỹ thuật RT-qPCR

To establish a realtime polychain reaction-based assay for the detection of *Human metapneumovirus*

Lê Thị Lan*, Phạm Quang Trung,
Nguyễn Thị Tĩnh, Trần Thị Liễu và Ngô Tất Trung

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp phát hiện *Human metapneumovirus* (hMPV) gây viêm phổi ở người bằng kỹ thuật RT-qPCR. **Đối tượng và phương pháp:** Mẫu chứng dương plasmid tổng hợp có chứa trình tự hMPV được sử dụng trong nghiên cứu này. Ngưỡng phát hiện, độ nhạy kỹ thuật được thực hiện trên mẫu chứng dương pha loãng giảm dần nồng độ từ 10^5 ÷ 10^0 . Mồi và probe được thiết kế bằng cách sử dụng trình tự hMPV trong cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information). Độ đặc hiệu của kỹ thuật được đánh giá dựa trên khả năng không bắt chéo với các virus khác. Một phản ứng khuếch đại nội chuẩn để đánh giá hiệu quả tách chiết và kiểm soát chất ức chế của phản ứng. Thực hiện so sánh kết quả chạy trên mẫu thực tế với kit Seegene. **Kết quả:** Ngưỡng phát hiện hMPV là 1 copy/ μ L, độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật tương ứng 95%, 100%, kết quả chạy trên mẫu thực tế tương đồng với kit Seegene. **Kết luận:** Đã thiết lập thành công phương pháp RT-qPCR trong phát hiện *Human metapneumovirus* với độ nhạy, độ đặc hiệu kỹ thuật cao trên mẫu chứng dương plasmid.

Từ khóa: RT-qPCR, *Human metapneumovirus* (hMPV)

Summary

Objective: To validate a real-time RT-PCR assay for detection of *Human metapneumovirus*. **Subject and method:** This real-time PCR-based method was employed for the amplification of target genes, utilizing relevant negative controls, and a *Human metapneumovirus* plasmid. Detection limit and sensitivity were determined through a range of spiking assays covering a concentration range from 100 to 105 copies/ μ L. Primers and probe were designed using the hMPV sequences available in the NCBI database. A limited clinical samples were also used as input for the newly established assay to compare its performance with an IVD marked kit. **Result:** The limit of detection (LOD) of our in-house assay is 1 copy hMPV derived cDNA per microliter (μ L), the assay showed a high level of specificity at 100% and a sensitivity of 95%. made it equal performance to that of Seegene's kit. **Conclusion:** We have successfully established a highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of *Human metapneumovirus* using a positive standard plasmid template.

Keywords: RT-qPCR, *Human metapneumovirus* (hMPV)

Ngày nhận bài: 13/6/2025, ngày chấp nhận đăng: 30/9/2025

* Tác giả liên hệ: lanlt91@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Human metapneumovirus (hMPV) là virus gây viêm phổi ở người được phát hiện và phân lập lần đầu tiên từ trẻ nhỏ mắc bệnh đường hô hấp tại Hà Lan vào năm 2001¹. Đây là một loại virus RNA thuộc họ *Pneumovirinae*, chi *Metapneumovirus* và cùng nhóm với virus hợp bào hô hấp RSV. Sau đó, virus này đã được báo cáo trên toàn cầu, nó gây ra nhiễm trùng đường hô hấp trên và dưới ở mọi nhóm tuổi ở người và ở những bệnh nhân suy giảm miễn dịch². Mặc dù virus này đã xuất hiện từ lâu nhưng trong những năm gần đây, các báo cáo về hMPV gây viêm phổi ở người tại Trung Quốc và một số nước trên thế giới đang dấy lên lo ngại về đợt bùng phát dịch bệnh như làn sóng Covid năm 2021. Theo thông tin mới nhất được công bố từ Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Trung Quốc (CDC) ngày 2/1/2025, số lượng các ca nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính ở nước này đang có xu hướng tăng cao với sự tăng cao đáng kể các ca nhiễm hMPV. Ngày 7/1/2025, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã có thông tin chính thức về hMPV. Theo đó, WHO khẳng định đây không phải là loại virus mới, sự gia tăng số ca nhiễm hMPV gần đây tại Trung Quốc và nhiều quốc gia khác đã được dự báo trước và không xuất hiện thêm yếu tố bất thường nào. Tại Việt Nam, hMPV không phải là virus mới và từng lưu hành ở thành phố Hồ Chí Minh gây viêm đường hô hấp ở trẻ em năm 2023 và 2024 với tỉ lệ thấp hơn so với các tác nhân gây viêm phổi phổ biến khác (*H.influenzae*, *S.pneumoniae*, cúm A, RSV...).

hMPV được xác định là một loại virus gây bệnh đường hô hấp với các triệu chứng tương tự như cúm thông thường: ho, sốt, nghẹt mũi, khó thở, và có thể dẫn đến các biến chứng như viêm phổi và viêm phế quản. hMPV có thể xuất hiện ở tất cả các đối tượng ở mọi độ tuổi, đặc biệt là trẻ em, người già và người suy giảm hệ miễn dịch. Tương tự như các virus đường hô hấp khác, hMPV có khả năng lây lan qua tiếp xúc gần, ho, hắt hơi hoặc qua tiếp xúc với vật dụng bị nhiễm virus, với thời gian ủ bệnh từ 3-6 ngày. Mặc dù hMPV thường không gây ra bệnh nhiễm trùng, tuy nhiên virus này chưa có vaccine ngăn ngừa cũng như thuốc điều trị đặc hiệu. Do vậy, việc sàng lọc để phát hiện nguyên nhân và cách ly nguồn bệnh vẫn là vấn đề cấp thiết hiện nay.

Human metapneumovirus (hMPV) gây ra các triệu chứng lâm sàng không đặc hiệu, do đó việc chẩn đoán nhiễm hMPV chỉ dựa vào biểu hiện lâm sàng và tiền sử bệnh là rất khó khăn. Hiện nay, phương pháp phổ biến và hiệu quả nhất để phát hiện hMPV là phản ứng chuỗi polymerase (PCR), với ưu điểm là thời gian thực hiện nhanh, độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Tại Việt Nam, hiện chưa có bộ sinh phẩm chuyên biệt nào được tối ưu hoá cho việc phát hiện hMPV. Chỉ có một nghiên cứu được công bố năm 2019 trên Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh đã sử dụng kỹ thuật multiplex RT-PCR để phát hiện đồng thời virus cúm A và hMPV từ mẫu dịch phế họng - mũi³. Tuy nhiên, nghiên cứu nói trên chỉ dừng lại ở việc tối ưu phương pháp PCR thông thường, vốn tồn tại nhiều hạn chế như: Yêu cầu bước điện di sau phản ứng, nguy cơ nhiễm chéo cao và không cho phép theo dõi kết quả theo thời gian thực như kỹ thuật qPCR.

Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thiết kế và tối ưu hóa phương pháp RT-qPCR nhằm phát hiện hMPV từ mẫu bệnh phẩm đường hô hấp. Phương pháp này cho phép phát hiện sớm, chính xác và sàng lọc hiệu quả số lượng lớn ca nhiễm, đặc biệt hữu ích trong tình huống dịch bùng phát, từ đó hỗ trợ tích cực cho công tác chẩn đoán và điều trị tại các cơ sở y tế.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu thực hiện trên 20 mẫu của bệnh nhân mắc các triệu chứng nhiễm khuẩn đường hô hấp.

Đối chứng âm: Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các mẫu RNA tách chiết từ virus có tương đồng về hệ gen với hMPV là RSV^{4,5}.

Chứng dương: Là plasmid chứa vùng gene đích hMPV.

2.2. Phương pháp

Mẫu thu thập được bảo quản -80°C. RNA được tách chiết trên hệ thống tự động MagPurix.

Thiết kế mồi và đầu dò: Các đoạn mồi PCR được thiết kế nhắm vào các gen glycoprotein (G) và nucleoprotein (N), bằng cách sử dụng trình tự (GenBank: KC731484 - KC731527) có trong cơ sở dữ

liệu NCBI, các đoạn mỗi đã được kiểm tra phản ứng chéo, tự trùng hợp, hình thành cấu trúc kẹp tóc và cấu trúc thứ cấp bằng NCBI BLAST. Trình tự mỗi xuôi, mỗi ngược và đầu dò cho phát hiện virus hMPV lần lượt như sau:

hMPV-F: 5'-CATGTYTTTTGYGACACAGC-3'.

hMPV-R: 5'-RTGYCTTCCTGTGCTGAC-3'.

hMPV-probe: 5'FAM-TGTTGCTGAGCAATCAARRGARTG-3'BHQ1.

Mỗi và đầu dò cho nội chuẩn Rnase P được sử dụng để kiểm soát quá trình tách chiết và hoạt động của enzyme lần lượt như sau:

IC-F: 5'-AGATTGGACCTGCGAGCG-3'.

IC-R: 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'.

IC-probe: 5'HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3'BHQ1.

Tối ưu điều kiện phản ứng realtime PCR sử dụng plasmid: Các điều kiện phản ứng được khảo sát bao gồm: Nồng độ, nhiệt độ gắn mỗi/ probe. Nồng độ mỗi của hMPV và nội chuẩn được khảo sát trong khoảng từ 100-600nmol/ phản ứng, nồng độ probe được khảo sát trong khoảng 50 - 250nmol/ phản ứng. Nhiệt độ được khảo sát trong khoảng $60 \pm 2^\circ\text{C}$.

Xác định độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng: Nồng độ copy/ μL được quy đổi từ ng/ μL dựa trên kích thước plasmid dựa trên công thức sau:

$$\text{Copy}/\mu\text{L} = \text{Nồng độ (ng}/\mu\text{L}) \times 6,022 \times 10^{23} / \text{Kích thước plasmid (bp)} \times 650 \text{ (g/mol)} \times 10^9$$

Độ nhạy được xác định dựa trên dải pha loãng từ $10^5 \div 10^0$, giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ thấp nhất mà kỹ thuật có thể phát hiện được. Độ đặc hiệu được đánh giá dựa trên khả năng bắt chéo không đặc hiệu với các virus khác.

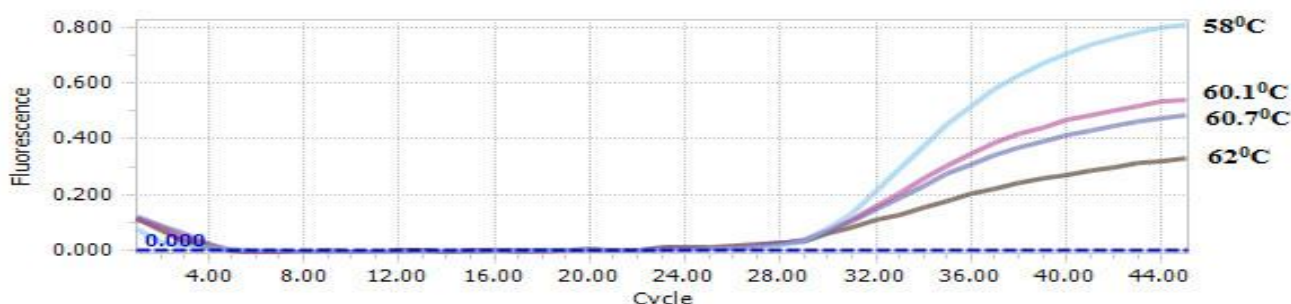
3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả khảo sát trình tự mỗi cho phản ứng RT-qPCR

Cặp mỗi được kiểm tra tính đặc hiệu bằng công cụ Primer blast, kết quả cho thấy cặp mỗi thiết kế bắt cặp đặc hiệu với trình tự hMPV, tuy nhiên vẫn tồn tại khả năng bắt cặp chéo với trình tự của *Avian pneumovirus* (aMPV). Để khắc phục, chúng tôi thiết kế thêm đầu dò đặc hiệu cho hMPV, kết quả kiểm tra cho thấy đầu dò không có bắt cặp với bất kỳ trình tự nào của aMPV, kết quả được minh họa trong hình dưới đây:



3.2. Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng RT-qPCR

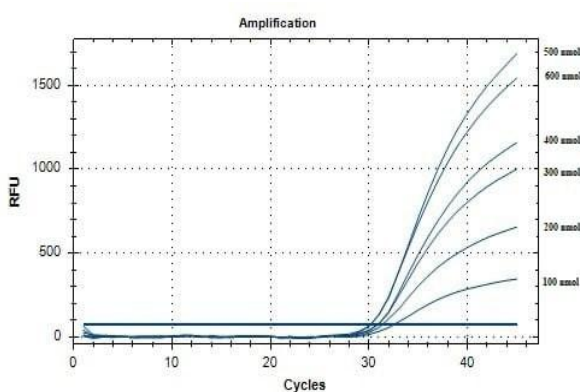


Hình 1. Kết quả khảo sát gradient nhiệt độ bắt cặp mỗi của phản ứng RT-qPCR phát hiện hMPV

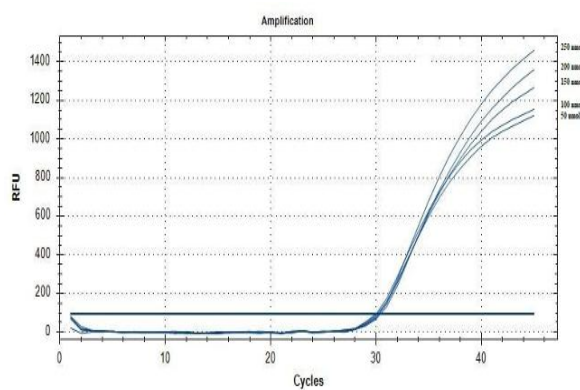
Tiến hành khảo sát nhiệt độ bắt cặp mỗi dựa trên dải nhiệt độ $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Hình 1 cho thấy ở tất cả nhiệt độ trong dải nhiệt độ khảo sát đều cho tín hiệu khuếch đại tốt, trong đó ở 58°C phản ứng phát hiện hMPV cho tín hiệu khuếch đại tốt nhất. Nghiên cứu lựa chọn điều kiện 58°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Kết quả khảo sát nồng độ mỗi, probe sử dụng

Nồng độ mỗi và probe ảnh hưởng lớn đến hiệu suất phản ứng, nồng độ mỗi quá cao sẽ làm tăng khả năng liên kết không đặc hiệu hoặc thậm chí bắt cặp lẫn nhau. Do vậy nồng độ mỗi được tối ưu để đảm bảo giá trị Ct thấp nhất mà nồng độ không được quá cao dẫn tới dư thừa nguyên liệu. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá trên dải nồng độ mỗi từ 100 – 600 nmol. Kết quả cụ thể như sau:



A



B

Hình 2. Kết quả lựa chọn nồng độ mỗi (hình 2A) và probe (hình 2B) phát hiện hMPV

Nhận xét: Biểu đồ trên cho thấy, giá trị Ct lên thấp nhất ở nồng độ 500 nmol và có xu thế ổn định ở nồng độ 600nmol. Tiến hành tối ưu nồng độ probe sao cho ΔRn đạt giá trị cao nhất, kết quả cho thấy, ở nồng độ 250 nmol là điều kiện tối ưu cho hMPV.

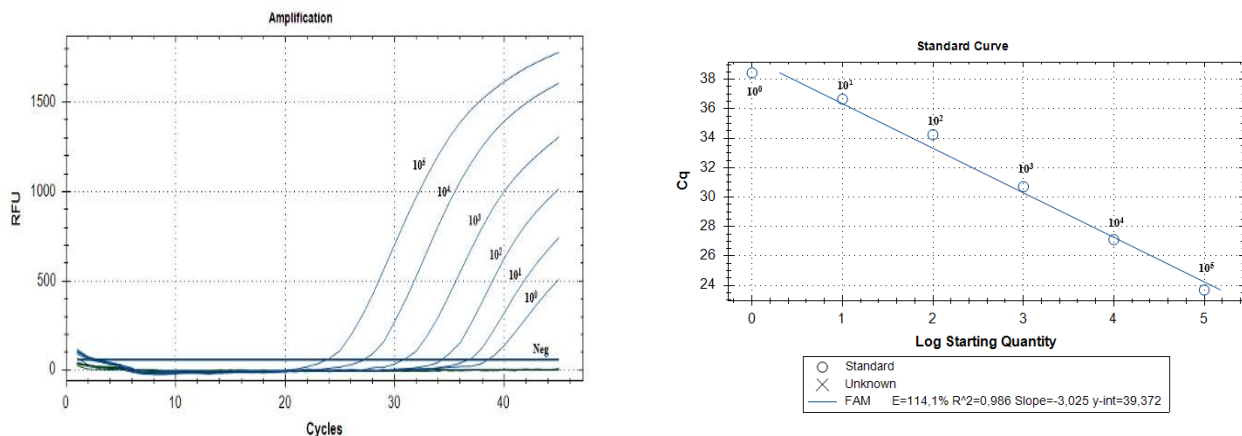
Như vậy, điều kiện tối ưu khuếch đại phản ứng multiplex real-time PCR trong nghiên cứu này là:

Điều kiện nhiệt độ 95°C -15 phút; (95°C -15 giây; 58°C -1 phút) $\times$ 45 chu kỳ. Nồng độ mỗi, probe cho hMPV tương ứng 500 nmol và 250 nmol.

3.4. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện, độ nhạy và độ đặc hiệu kỹ thuật

Để xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng, chúng tôi tiến hành khảo sát 6 dải nồng độ được pha loãng từ plasmid ban đầu từ 10^5 đến 10^0 copy/

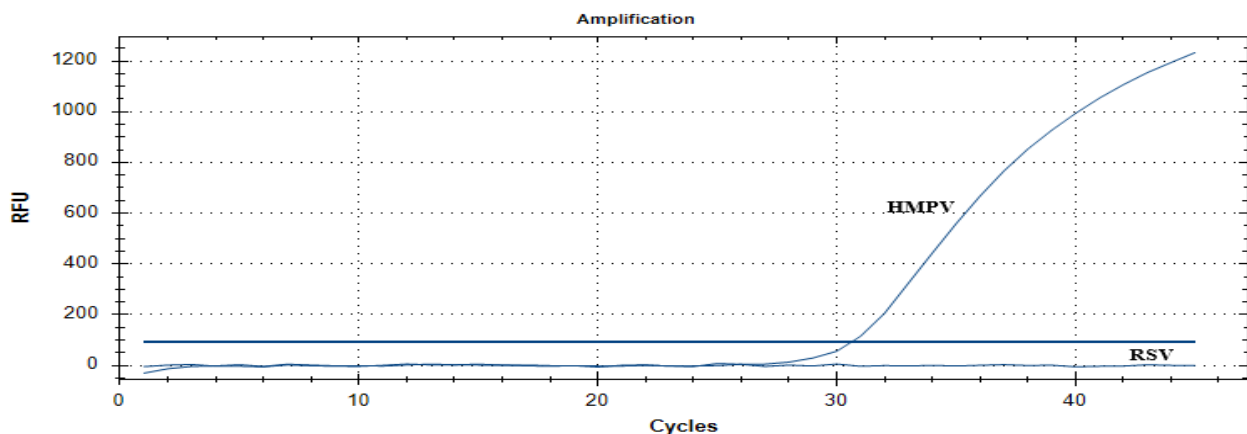
μL. Giới hạn phát hiện là nồng độ thấp nhất cho kết quả dương tính trên 95% mẫu chạy.



Hình 3. Kết quả RT-qPCR phát hiện hMPV trên các dải pha loãng $10^0 \div 10^5$ copies

Nhận xét: Kết quả cho thấy, ở ngưỡng 10^0 copies DNA plasmid/μL hMPV kỹ thuật có thể phát hiện được. LOD được ước tính bằng khả năng phát hiện nồng độ tối thiểu mà kỹ thuật có thể phát hiện được với độ tin cậy 95% bằng cách lặp lại 20 lần với một dải nồng độ quanh ngưỡng phát hiện. Theo công thức $LOD = \text{mean} + 3SD$ cho thấy: LOD hMPV đạt 1 copy/μL ($95\%, 1 \div 10$)[6].

Độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật được xác định bằng cách thử nghiệm mẫu dương tính hMPV với các loại virus đường hô hấp khác có tương đồng về hệ gen với hMPV, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng mẫu dương tính RSV. Kết quả cho thấy, không quan sát thấy phản ứng chéo với RNA virus RSV. Hình ảnh minh họa dưới đây:



Hình 4. Kết quả RT-qPCR mỗi hMPV trên virus hMPV và RSV

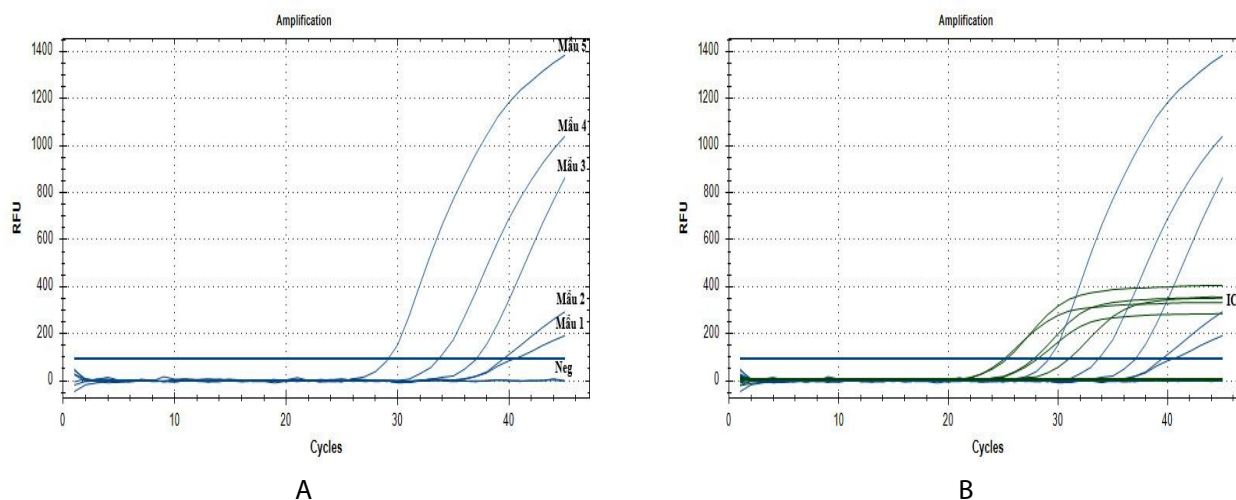
Nhận xét: Qua kết quả cho thấy, phản ứng RT-qPCR cho kết quả dương tính với plasmid hMPV (10^3 copies/μL) và âm tính với RSV. Như vậy, không có sự bắt chéo không đặc hiệu nào trong thử nghiệm này.

3.5. Kết quả thử nghiệm quy trình tối ưu trên mẫu RNA tách chiết từ dịch tỵ hầu

Chúng tôi tiến hành chạy thử nghiệm các điều kiện đã tối ưu trên 20 mẫu cDNA được tổng hợp từ RNA ở bệnh nhân mắc các triệu chứng nhiễm

khuẩn đường hô hấp, kết quả có 5 trong tổng số 20 mẫu cho kết quả dương tính với hMPV, kết quả này tương đồng với kit thương mại Seegene. Một bộ mỗi nội chuẩn Rnase P được sử dụng trong thử nghiệm này để kiểm soát quá trình tách chiết và tổng hợp

cDNA, kết quả cho thấy nồng độ 100 nmol cho primer và probe là giá trị thích hợp đảm bảo cho tín hiệu nội chuẩn được khuếch đại tốt mà đảm bảo nồng độ tối thiểu giảm thiểu cạnh tranh với gene đích. Kết quả được thể hiện trong hình dưới đây:



Hình 5. Kết quả thử nghiệm RT-qPCR trên 20 mẫu với mỗi hMPV (hình 5A) và kết hợp mỗi nội chuẩn (hình 5B)

Nhận xét: Qua kết quả hình 5B cho thấy, phản ứng RT-qPCR phát hiện hMPV kết hợp nội chuẩn không có sự khác biệt so với phản ứng đơn gene (hình 5A).

4. BÀN LUẬN

Human metapneumovirus (hMPV) là loại virus đường hô hấp phổ biến, thuộc họ *Paramyxoviridae*, phân họ *Pneumovirinae* trong chi *Metapneumovirus* (cùng nhóm với virus hợp bào hô hấp RSV), gây ra các triệu chứng cảm lạnh thông thường như hắt hơi, ho, sổ mũi, đau họng trong vài ngày. Trong một số trường hợp hiếm gặp có thể phát triển triệu chứng nghiêm trọng hơn, đặc biệt ở những đối tượng có hệ thống miễn dịch yếu như trẻ sơ sinh, người cao tuổi, người có bệnh lý nền. Do đó, việc chẩn đoán đúng và kịp thời hMPV là cần thiết.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng quy trình RT-qPCR cho phát hiện hMPV. Kết quả lựa chọn phản ứng ở các điều kiện: Nồng độ mỗi, nhiệt độ gần mỗi. Việc đánh giá độ nhạy, ngưỡng phát hiện được tiến hành trên các dải plasmid pha loãng. Kết quả cho thấy kỹ thuật có độ nhạy cao, xây dựng đường chuẩn cho hiệu suất phản ứng cao hMPV ($R^2 = 0,999$). Giá trị LOD của hMPV là 1copy/ μ L. Kết quả

đánh giá độ đặc hiệu đạt 100%, không có sự bắt chéo không đặc hiệu nào giữa mỗi phát hiện hMPV với các virus khác như RSV. Kết quả này tương đồng với kit thương mại Seegene Meningitis-V2 Assay.

Việc bổ sung nội chuẩn được chú trọng, nhằm kiểm soát chất lượng RNA tách chiết và quá trình tổng hợp cDNA. Dựa trên trình tự gene RaseP, nhóm nghiên cứu đã thiết lập phản ứng kết hợp mỗi đích và nội chuẩn, giá trị $Ct_{IC} \leq 35$ là khoảng chấp nhận được.

5. KẾT LUẬN

Xét nghiệm RT-qPCR phát hiện hMPV đã được thiết lập thành công với ngưỡng phát hiện 1 copy/ μ L, mỗi hoạt động tốt trong khảo sát với mẫu chứng dương, kết quả thử nghiệm trên 20 mẫu dịch tỵ hầu đã phát hiện 5/20 mẫu dương tính, các mẫu dương tính này phù hợp với kết quả thực hiện trên kit xét nghiệm thương mại Seegene (IVD). Xét nghiệm có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (95% và 100%), có thể được sử dụng trong chẩn đoán.

Tài liệu tham khảo

1. Van den Hoogen, BG et al (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from

- young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7(6): 719-24.
2. Choudhary ML et al (2014) *Development of real-time RT-PCR for detection of human metapneumovirus and genetic analysis of circulating strains (2009-2011) in Pune, India*. *Arch Virol* 159(2): 217-225.
 3. Nguyen Dai Thuc, D.N.A.T., Nguyen Ngoc Tan, Nguyen Thu Ngoc (2019) *Detection influenza A virus and human pneumovirus (hMPV) on nasopharyngeal specimen by using multiplex RT-PCR*. *Ho Chi Minh City Journal of Medicine* 23(5): 251-258.
 4. Zhou Z et al (2020) Experiments Investigating the Competitive Growth Advantage of Two Different Genotypes of Human Metapneumovirus: Implications for the Alternation of Genotype Prevalence. *Scientific Reports* 10(1): 2852.
 5. Gaunt ER et al (2011) Molecular epidemiology and evolution of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *PLoS One* 6(3): 17427.
 6. Forootan A et al (2017) *Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)*. *Biomol Detect Quantif* 12: p. 1-6.