

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN VI SINH VẬT GÂY NHIỄM KHUẨN HUYẾT BẰNG PCR ĐA MỒI

Lê Hữu Song*; Nguyễn Trọng Chính*
Ngô Tất Trung*; Phan Quốc Hoàn*

TÓM TẮT

Bảy chủng vi sinh vật (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* và *Candida albicans*) được định danh đưa vào làm chứng dương để tối ưu hóa quy trình PCR đa mồi. Kết quả cho thấy, 2 bộ PCR (5 lex + 2 lex) có thể phát hiện 7 mầm bệnh này với độ đặc hiệu 100% và độ nhạy của phương pháp là 100 CFU/ml.

* Từ khóa: Nhiễm khuẩn huyết; PCR đa mồi.

ESTABLISHING PROTOCOL OF MULTIPLEX PCR FOR IDENTIFYING PATHOGENS CAUSED SEPSIS

SUMMARY

Colonies of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Candida albicans* were used as positive control to monitor the success of multiplex-PCR assay. The result showed that two set of multiplex - PCR (5lex + 2 lex) can detect these 7 pathogens with 100% of specificity and a sensitivity of 100 CFU/ml.

* Key words: Sepsis; Multiplex PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn huyết (NKH) đã và vẫn là một trong những nguyên nhân gây tử vong cao. Theo thống kê của Cơ quan Kiểm soát Bệnh Hoa Kỳ (CDC), bệnh này gây tử vong đứng hàng thứ 11. Chỉ tính riêng ở Mỹ, hàng năm có hơn 20.000 trường hợp > 65 tuổi bị mất trí do NKH [1].

Ở nước ta, cho đến nay vẫn chưa có số liệu thống kê tình hình NKH tại các cơ sở y

tế trong toàn quốc. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ NKH tại Khoa Hồi sức - Bệnh viện Nhi TƯ là 9,4/1000 BN/ngày, tỷ lệ tử vong lên tới 20% trong số những trường hợp NKH [2].

Cấy máu hiện đang được cho là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán mầm bệnh trong NKH [3, 4]. Tuy nhiên, việc lấy một lượng máu lớn ở bệnh nhi sơ sinh là một việc rất khó khăn, quy trình thực hiện thường kéo dài từ 48 - 72 giờ mới có kết quả sơ bộ.

* Bệnh viện TWQĐ 108

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thôi Sơn

Kết quả nghiên cứu cho thấy, 25% bệnh nhân (BN) được xác định nguyên nhân gây NKH bằng cấy máu [5]. Vì vậy, việc chẩn đoán NKH hiện nay chủ yếu dựa vào các triệu chứng lâm sàng, nên không phát hiện sớm được bệnh, do đó rất nguy hiểm cho tính mạng BN, đặc biệt đối với trẻ nhỏ và người cao tuổi.

Việc phát hiện ADN của vi khuẩn trong mẫu máu BN được cho là một phương pháp có độ nhạy cao, thực hiện nhanh, có giá trị hỗ trợ cho cấy máu để chẩn đoán NKH. Tuy nhiên, từ trước tới nay, hầu hết các phương pháp PCR chẩn đoán mầm bệnh thường

chỉ sử dụng đơn mồi. Mỗi lần xét nghiệm chỉ phát hiện được 1 vi sinh vật. Như vậy, để chẩn đoán nhiều mầm bệnh sẽ rất mất thời gian và kinh phí cao. Yêu cầu thực tế hiện nay là phải phát triển một phương pháp đơn giản, giá thành thấp để có thể phát hiện được nhiều mầm bệnh trong một lần xét nghiệm. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng PCR đa mồi (multiplex PCR) để phát hiện các mầm bệnh thường gây NKH: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* và *Candida albicans*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

Các khuẩn lạc tương ứng của 7 chủng vi sinh vật: *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* phân lập từ Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện TƯQĐ 108, hóa chất chuẩn dùng trong chạy PCR và điện di trên thạch agarose.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Tách ADN tổng số:

Tách chiết ADN tổng số bằng kit thương mại (QIAamp DNA Blood Mini Kit). Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

* Thiết kế mồi:

Thiết kế đặc hiệu cặp mồi cho mỗi loài không bắt chéo với nhau và không bắt cặp với genomics người. Trình tự mồi như sau:

KÍCH THƯỚC AMPLICON	BỆNH CĂN DO	TÊN MỒI (tên gen)	TRÌNH TỰ MỒI XUÔI/NGƯỢC
243	<i>C. albicans</i>	Z48339	5'-GTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTA-3' 5'-CCGTGCCACATTCCTCCGC-3'
411	<i>P. aeruginosa</i>	P.au. AF116285	5'-CCCGAATGTCGGCATCATTCTC-3' 5'-CGGTAGACCTCGCGCTTGAA-3'
324	<i>K. pneumoniae</i>	Kp-aldA	5'-CCTTGCTTTAAACGCGCGC-3' 5'-TTTTTCGCCGCGAGCGG-3'
515	<i>S. aureus</i>	STAAROA	5'-AAGGGCGAAATAGAAGTGCCGG-3' 5'-ATGGTCGGTTCCTTAGAAAACAACTTG-3'

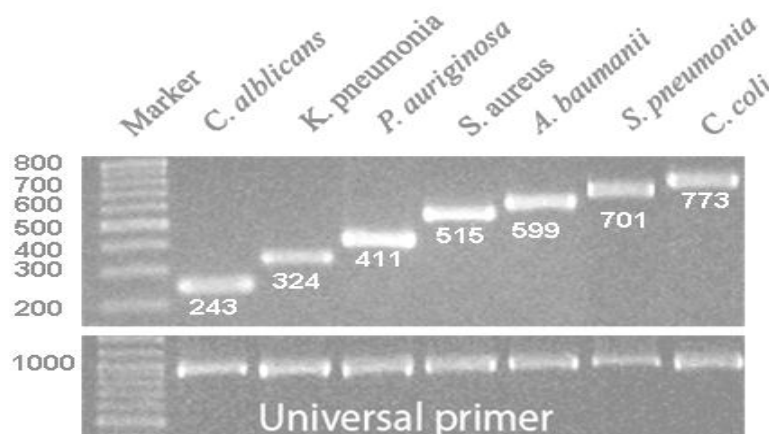
(1)	(2)	(3)	(4)
599	<i>A. baumannii</i>	Ab (JX470958)	5'-TTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTG-3' 5'-TGGTGCAACAAACTCCCATGGT-3'
701	<i>S. pneumoniae</i>	Sp LytA	5'-CAACCGTACAGAATGAAGCGGATTAT-3' 5'-GTCCTTGACTTGACCCAGCCT-3'
701	<i>S. pneumoniae</i>	5-capsular gene cluster	5'-CAACCGTACAGAATGAAGCGGATTA -3' 5'-GATCGGTATTCTTCTCTATCAAACCTGG -3'
773	<i>E. coli</i>	S-uidA	5'-GTCGCGAGTGAAGATCCCTTTC-3' 5'-GCATTAATGGACTGGATTGGGGC-3'
996/155	Universal primers	Uni-pathogen	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3'
180	β globin	β globin	5'-AGAAGAGCCAAGGACAGGTACG-3' 5'-TGCTAGTGAACACAGTTGTGTCAGA-3'

* Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu:

Kiểm định độ đặc hiệu bằng giải trình tự gen và chạy thử trên các mẫu chứng âm. Chứng âm là những mẫu máu của BN nhiễm virus viêm gan B (HBV) và máu của BN được chẩn đoán nghi ngờ mang bệnh tự miễn cần làm xét nghiệm HLA-B27. Đánh giá độ nhạy của phương pháp bằng cách pha loãng nồng độ vi sinh vật từ 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 ; 10^0 CFU/ml.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Độ đặc hiệu của bộ môi đơn cho từng chủng vi sinh vật.



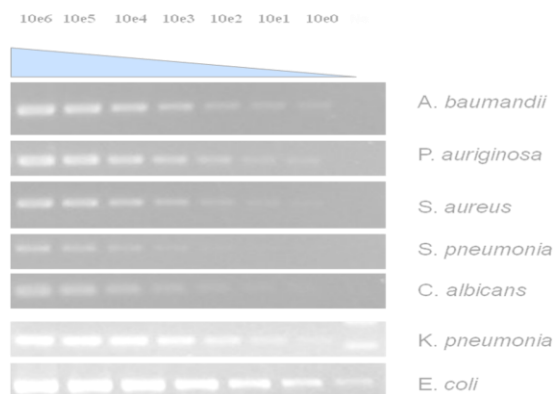
Hình 1: Kết quả phát hiện mầm bệnh bằng PCR đơn môi.

(Marker: thang chuẩn, 7 băng tiếp theo phía trên là kết quả của 7 mẫu bệnh tương ứng; 7 băng phía dưới là sản phẩm của cặp mồi chung (Universal primer).

Các sản phẩm PCR cho hình ảnh rõ nét, có khoảng cách xa nhau, đủ để phân biệt. Sau khi thực hiện phản ứng PCR đơn mồi, tiến hành giải trình tự và so sánh với trình tự chuẩn trên ngân hàng gen (www.ncbi.nlm.nih.gov). Kết quả phân tích cho thấy, bộ mồi đơn do chúng tôi thiết kế hoàn toàn đặc hiệu với 07 chủng vi sinh vật được quan tâm. Tuy nhiên, do tính phức tạp của bộ số liệu giải trình tự, nên trong bài báo này không trình bày.

2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của PCR đơn mồi.

Để đánh giá độ nhạy của PCR đơn mồi, tiến hành pha loãng nồng độ của 7 chủng vi sinh theo tỷ lệ giảm dần từ 10^6 CFU/ml đến 10^0 CFU/ml vào trong máu người khỏe mạnh, tiến hành tách chiết ADN tổng số và PCR đơn mồi cho từng chuỗi pha loãng.



Hình 2: Độ nhạy kỹ thuật xét nghiệm PCR đơn mồi cho từng chủng vi sinh vật.

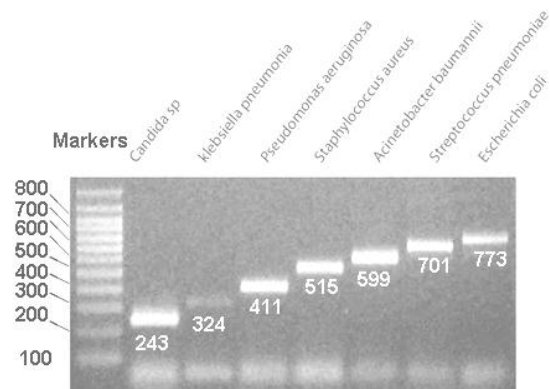
Kỹ thuật PCR đơn mồi có thể phát hiện được vi sinh vật ở nồng độ 1 CFU/1 ml bệnh

phẩm. Riêng *S. pneumoniae* cần có ngưỡng cao hơn (100 CFU/ml). Tuy nhiên, trong thực hành để có độ tin cậy cao, chúng tôi lấy ngưỡng là 100 CFU/ml cho tất cả mẫu bệnh.

3. Tối ưu hóa điều kiện PCR đa mồi.

Mục đích cuối cùng là tạo được một hoặc một số nhất định các bộ mồi có khả năng xác định được sự có mặt của vi sinh vật quan tâm trong mẫu bệnh phẩm. Để đạt được mục đích đó, tiến hành kết hợp các mồi đơn với nhau và thực hiện phản ứng PCR trên mẫu genomics ADN tách từ vi khuẩn chuẩn dương.

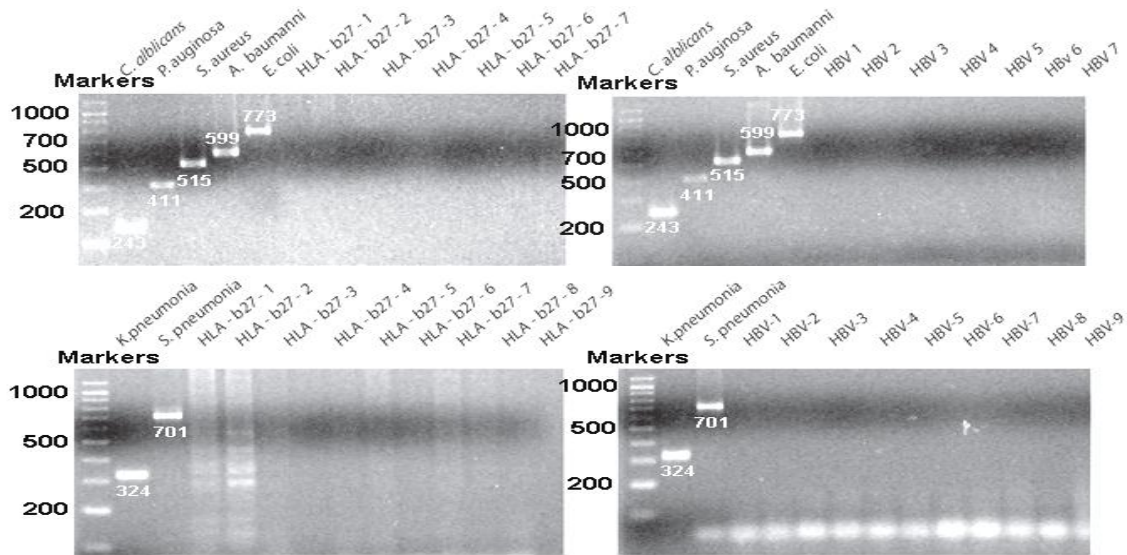
Sau khi thử nghiệm kết hợp các mồi đơn khác nhau bằng nhiều thử nghiệm (số liệu không trình bày ở đây), thu được 2 set mồi (5 lex + 2 lex - (*C. albicans* + *P. aeruginosa* + *S. aureus*, *A. baumannii* và *E. coli*) + (*S. pneumoniae* + *K. pneumoniae*) hoặc 6 lex (*C. albicans* + *P. aeruginosa* + *S. aureus*, *A. baumannii* + *S. pneumoniae* và *E. coli*) + 1 lex (*K. pneumoniae*) có khả năng chẩn đoán sự có mặt của các vi sinh vật chứng dương tương ứng trong mẫu phân tích.



Hình 3: Kết quả sử dụng mồi 5 plex và 2 lex trong chẩn đoán các mẫu bệnh đơn.

Kết quả PCR đa mồi phát hiện 7 mẫu bệnh rất rõ nét, không có băng phụ.

4. Đánh giá độ đặc hiệu phản ứng PCR đa môi.



Hình 4: Độ đặc hiệu môi 5 lex (panel trên) và môi 2 lex (panel dưới).

(Markers: thang chuẩn; các băng chuẩn dương có ghi rõ tên mầm bệnh tương ứng; HLA-b27 (1-9) là các mẫu máu biết chắc chắn không nhiễm mầm bệnh kể trên; HBV (1-9) là các mẫu máu của bệnh nhân nhiễm virus viêm gan B).

Các chứng dương cho kết quả rõ nét, không có trường hợp chứng âm nào có kết quả dương tính từ các bộ môi đã sử dụng.

BÀN LUẬN

Chẩn đoán nhanh, chính xác các mầm bệnh là yêu cầu tiên quyết để điều trị hiệu quả NKH. Trong khi hầu hết các trung tâm y tế của nước ta vẫn áp dụng phương pháp cấy khuẩn với thời gian chờ đợi kết quả thường 48 - 72 giờ. Hơn nữa, cấy khuẩn đòi hỏi lượng máu lớn, nhưng vẫn bỏ sót nhiều trường hợp dương tính, đặc biệt với BN nhiễm các chủng vi sinh vật không thể tiến hành nuôi cấy hoặc rất khó nuôi cấy như *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* [5].

Phương pháp chẩn đoán vi sinh vật dựa trên trình tự đặc thù của axit nhân (PCR) đã và đang được nhiều trung tâm y tế lớn của thế giới triển khai. Nó có ưu điểm: thời gian chẩn đoán ngắn, độ nhạy kỹ thuật cao; về lý thuyết có thể xác định được chính xác sự

có mặt của 1 tế bào vi sinh vật trong mẫu bệnh phẩm [6]. Tuy nhiên, chi phí cho xét nghiệm sinh học phân tử phải cân nhắc: tính trung bình giá thành của một xét nghiệm PCR đơn môi cho một mầm bệnh vi sinh vật khoảng 300 - 350 nghìn, nếu xét nghiệm chẩn đoán đồng thời 7 - 10 mầm bệnh, bằng kỹ thuật PCR đơn môi, mỗi BN phải chi trả khoảng 2 - 3,5 triệu đồng.

Vấn đề quan trọng nhất trong PCR đa môi là thiết kế môi và tối ưu hóa các điều kiện phản ứng. Trong nghiên cứu này, các cặp môi đơn được thiết kế bắt cặp đặc hiệu vào khu vực bảo tồn cao cho mỗi loài trên gen ribosome 16S hoặc 23S hoặc gen mã hóa cho protein độc tố đặc trưng của loài. Các cặp môi không bắt cặp chéo với nhau (khi thực hiện phản ứng đa môi) và không bắt cặp với genomics ADN người. Ngoài

các bộ mồi đơn đặc hiệu cho mỗi loài, chúng tôi còn thiết kế một cặp mồi bắt vào khu vực bảo tồn chung tất cả các loài vi sinh vật (universal primer) nhằm kiểm chứng lây nhiễm vi sinh vật tổng số hoặc vi sinh vật không nằm trong danh sách được quan tâm. Để kiểm tra chất lượng AND, trong quá trình tách chiết, sử dụng một bộ mồi đặc hiệu cho genomics ADN người (mồi beta globin). Sự khác biệt về kích thước giữa các đoạn sản phẩm tạo ra nằm trong khoảng 80 - 100 bp, đảm bảo các đoạn sản phẩm có thể dễ dàng phân biệt khi điện di trên gel agarose 1,5 - 2,5%.

Để kiểm tra tính đặc hiệu của bộ mồi do chúng tôi thiết kế và loại bỏ hiện tượng dương tính giả do bắt cặp giữa các thành phần của hỗn hợp mồi ở những vị trí khác nhau của bộ gen người, chúng tôi thực hiện phản ứng PCR đa mồi sử dụng set mồi (5 lex + 2 lex) trên các khuôn (template) là ADN bệnh phẩm mang HBV ADN hoặc ADN bệnh phẩm trong chẩn đoán thể đa hình gen HLA - B27.

Quá trình thử nghiệm chưa ghi nhận hiện tượng bắt cặp chéo giữa mồi đơn đặc hiệu của vi sinh vật với các vị trí trên gen người (hình 4). Kết quả này chứng minh PCR đa mồi được xây dựng có độ đặc hiệu cao. Chúng tôi thấy quy trình này có khả năng xác định chính xác 1 trong 7 vi sinh vật được quan tâm. Tuy nhiên, trong thực hành lâm sàng, chúng tôi lấy ngưỡng phát hiện là 100 CFU/ml.

Quy trình xét nghiệm này chỉ đòi hỏi một lần tách ADN bệnh phẩm tổng số và 3 phản ứng PCR, do đó, giá thành xét nghiệm chỉ ở mức < 1 triệu/BN. Đặc biệt, cả quá trình chỉ thực hiện trong 1 ngày làm việc (8 giờ), đó là những lợi điểm chủ yếu trong phương pháp của chúng tôi.

KẾT LUẬN

Kỹ thuật PCR đa mồi được xây dựng thành công cho phép chẩn đoán chính xác, nhanh và hiệu quả 7 mầm bệnh thường gây NKH.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Kiến Ngãi, T.V.H. Colin Partridge, Lê Lan Anh, Nguyễn Hoài Thu, Trần Minh Chi, Meklit Workneh. Tỷ lệ mắc mới và một số yếu tố liên quan của nhiễm khuẩn huyết bệnh viện tại các khoa hồi sức cấp, Bệnh viện Nhi TW <http://www.nhp.org.vn/images/data/94-TLM-1.pdf>.
2. Kenneth D. Kochanek, M.A.J.X. M.D, Sherry L. Murphy, B.S. Arialdi M. Miniño M.P.H. and Hsiang-Ching Kung. Deaths: Preliminary data for 2009. National Vital Statistics Reports. 2011. Vol 59, No 4.
3. Gerdes. J.S. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. Clin Perinatol. 1991, 18 (2), pp.361-381.
4. Gerdes. J.S. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. Isr J Med Sci. 1994, 30 (5 - 6), pp.430-441.
5. Jordan. J.A, et al. Evaluating the near-term infant for early onset sepsis: progress and challenges to consider with 16S rDNA polymerase chain reaction testing. J Mol Diagn. 2006, 8 (3), pp.357-363.
6. Espy. M.J, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006, 19 (1), pp.165-256.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phản biện: 10/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

