

## **XÁC ĐỊNH TRỰC TIẾP MỘT SỐ CĂN NGUYÊN VI KHUẨN GÂY TIÊU CHẢY TỪ PHÂN BẰNG PCR**

**LÊ VIỆT, NGUYỄN VŨ TRUNG**  
*Đại học Y Hà Nội*

### **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Kỹ thuật PCR phối hợp với nuôi cấy phân lập thường được dùng để phát hiện các vi khuẩn có khả năng gây tiêu chảy từ các bệnh phẩm lâm sàng và cho kết quả với độ nhạy và độ đặc hiệu cao [3, 4, 5]. Tuy nhiên, qui trình này cần ít nhất 24 giờ cho vi khuẩn mọc sau khi cấy bệnh phẩm trên môi trường đặc. Do vậy, trong hầu hết các trường hợp tiêu chảy, việc xác định căn nguyên và quyết định phương hướng điều trị gặp rất nhiều khó khăn. Thêm vào đó,

nhiều trường hợp, bệnh tiến triển rất nhanh trên lâm sàng khiến việc xác định sớm căn nguyên gây tiêu chảy có ý nghĩa rất quan trọng, đặc biệt đối với trẻ em. Vì vậy, việc phát triển qui trình PCR nhằm xác định sớm các căn nguyên vi khuẩn trực tiếp từ bệnh phẩm phân là vấn đề cấp thiết. Tách chiết và tinh sạch ADN trực tiếp từ bệnh phẩm là chìa khoá đối kỹ thuật PCR trong xác định trực tiếp các chủng vi khuẩn từ bệnh phẩm. Đã có một số phương pháp tách chiết

và tinh sạch ADN trực tiếp từ phân như phương pháp tách chiết dùng ethanol; phương pháp sắc ký lỏng cao áp; phương pháp dùng bi thủy tinh (hoặc bi silic) và dung dịch chaotropic...[8, 9]. Tuy nhiên, các phương pháp này hoặc là quá phức tạp, hoặc quá đắt và chỉ thực hiện được ở những phòng xét nghiệm được trang bị máy móc hiện đại. Nhóm nghiên cứu đã phát triển thành công kỹ thuật tách chiết ADN trực tiếp từ phân để xác định nhanh một số căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy như các *Escherichia coli* gây tiêu chảy (diarrheagenic *Escherichia coli*), *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *shigella* spp., [1, 2]. Để đánh giá kết quả áp dụng kỹ thuật PCR trực tiếp trong xác định một số căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy từ phân, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

Xác định một số căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy bằng kỹ thuật PCR trực tiếp từ phân.

## ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu.

202 bệnh phẩm phân thu thập từ Khoa Vi sinh, bệnh viện Saint-Paul. Các bệnh phẩm này được thu thập từ các trẻ em dưới 60 tháng tuổi bị tiêu chảy, đến khám và điều trị tại viện.

Các bệnh phẩm phân này được thu thập kèm theo các thông tin về trẻ như tuổi, giới, đặc điểm phân bị tiêu chảy, số lần tiêu chảy trong 24 giờ trước khi vào viện.

Các bệnh phẩm này đã được tiến hành nhuộm soi, nuôi cấy, phân lập vi khuẩn theo thường qui tại khoa Vi sinh bệnh viện Saint-Paul. Số lượng phân còn thừa (ít nhất là 1g) được giữ ở 4-8°C trước khi được chuyển về Khoa Xét nghiệm, Viện CBTN-NDQG để phân tích.

### 2. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng vi khuẩn làm chứng dương:

+ Các chủng DEC do GS Andrej Weitraub, Viện Karolinska Thụy Điển cung cấp:

DEC	Chủng chuẩn	Gen đích
ETEC	ATCC 35401	<i>eltB, estA</i>
EHEC	ATCC 43890	<i>vt1, eaeA</i>
EHEC	ATCC 43889	<i>vt2, eaeA</i>
EPEC	ATCC 43887	<i>eaeA, bfpA</i>
EIEC	ATCC 43893	<i>ial</i>
EAEC	97R*	Có plasmid pCVD432

+ Chủng *V. cholerae* 245P phân lập từ bệnh nhân bị tiêu chảy cấp nguy hiểm tháng 12 năm 2007 tại Viện Các bệnh Truyền nhiễm và Nhiệt đới Quốc gia (CBTN-NDQG).

+ Chủng *S. typhi* 165M phân lập từ máu của bệnh nhân bị thương hàn điều trị tại Viện CBTN-NDQG năm 2007.

- Chủng vi khuẩn làm chứng âm là *E. coli* ATCC 11775 không mang gen độc lực do GS Andrej Weitraub, Viện Karolinska Thụy Điển cung cấp.

- Cặp mồi (primer) đặc hiệu cho các DEC (Invitrogen-Mỹ).

Primer	Gen đích	Số truy cập trung ngân hàng gen	Trình tự	Sản phẩm (bp)
LT	<i>eltB</i>	S60731	<sup>5</sup> TCTCTATGTGCATACGGAGC <sup>3</sup> <sup>5</sup> CCATACTGATTGCCGCAAT <sup>3</sup>	322
ST	<i>estA</i>	M34916	<sup>5</sup> GCTAAACCAGTA <sup>G</sup> <sub>A</sub> GGTCTTCAAAA <sup>3</sup> <sup>5</sup> CCCGGTACA <sup>G</sup> <sub>A</sub> GCAGGATTACAACA <sup>3</sup>	147
VT1	<i>vt1</i>	AF461172	<sup>5</sup> GAAGAGTCCGTGGGATTACG <sup>3</sup> <sup>5</sup> AGCGATGCAGCTATTAATAA <sup>3</sup>	130
VT2	<i>vt2</i>	AY143337	<sup>5</sup> ACCGTTTTTCAGATTTT <sup>G</sup> <sub>A</sub> CACATA <sup>3</sup> <sup>5</sup> TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT <sup>3</sup>	298
<i>eae</i>	<i>eaeA</i>	AE005595	<sup>5</sup> CACACGAATAAACTGACTAAAATG <sup>3</sup> <sup>5</sup> AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT <sup>3</sup>	376
SHIG	<i>ial</i>	[4]	<sup>5</sup> CTGGTAGGTATGGTGAGG <sup>3</sup> <sup>5</sup> CCAGGCCAACAAATTATTTCC <sup>3</sup>	320
<i>bfpA</i>	<i>bfpA</i>	U27184	<sup>5</sup> TTCTTGGTGCTTGCCTGTCTTTT <sup>3</sup> <sup>5</sup> TTTTGTTTGTGTATCITTTGTA <sup>3</sup>	367
EA	pCVD	X81423	<sup>5</sup> CTGGCGAAAGACTGTATCAT <sup>3</sup> <sup>5</sup> CAATGTATAGAAATCCGCTGTT <sup>3</sup>	630
OMPCF	Trình tự đặc	[3, 6]	5' ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG 3'	204

OMPCR	trung giống		5' CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG 3'	
ctxB <sub>2</sub> ctxB <sub>3</sub>	ctxB	[5]	5' GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT G 3' 5' GGT TGC TTC TCA TCATCG AAC CAC 3'	460

- Sinh phẩm, hoá chất
- + Nước khử ion, PCR master mix (Epicentre-Đức).
- + Thạch agarose dùng trong điện di (BBL, Mỹ).
- + TAE (Tris Acetate EDTA), Ethilium bromide dùng để nhuộm gel.
- + PBS (Phosphate Buffer Saline).
- Dụng cụ và máy móc
- + Máy điều nhiệt tự động GenAmp PCR system 9700 AB (Applied Biosystem, Mỹ).
- + Máy ly tâm lạnh, bộ điện di ngang Horizon#58 (Gibco-BRL của Mỹ).
- + Máy soi và chụp gel (Geldoc) (Biorad Mỹ).

### 3. Phương pháp nghiên cứu.

- Tách ADN trực tiếp từ phân
- Kỹ thuật tách ADN trực tiếp từ phân được thực hiện theo qui trình đã được mô tả trước đây [1, 2].
- Chạy PCR với các cặp mồi đặc hiệu phát hiện DEC, *Shigella* spp., *Salmonella*., *V. cholerae* theo qui trình đã được mô tả trước đây [1, 2, 7].

- Phân tích số liệu

Các số liệu được quản lý và phân tích bằng thống kê y học. Test  $\chi^2$  được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa hai tỷ lệ. Giá trị p < 0,05 được coi là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 1. Phân bố nhóm tuổi của các trẻ bị tiêu chảy.

Bảng 1. Phân bố nhóm tuổi.

Nhóm tuổi (tháng)	n	%
0-12	93	46,0
13-24	71	35,1
25-36	23	11,4
37-48	12	5,9
49-60	3	1,5

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, phần lớn các mẫu phân thu thập được từ các trẻ dưới 24 tháng tuổi bị tiêu chảy, 164 trường hợp (81,1%). Tỷ lệ này cao nhất ở nhóm trẻ dưới 12 tháng tuổi, chiếm 46%.

#### 2. Kết quả phát hiện một số căn nguyên gây tiêu chảy.

Trong số 202 bệnh phẩm phân tiêu chảy, 14 trường hợp (6,93%) có 1 trong các căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy (DEC hoặc *Salmonella* spp.).

Bảng 2. Phân bố các căn nguyên gây tiêu chảy phát hiện được bằng PCR:

Căn nguyên	n	%
EAEC	7	3,5
EPEC	3	1,5
ETEC	1	0,5
<i>Salmonella</i> spp.	3	1,5
Không phát hiện được	188	93,1

Tổng số	202	100
---------	-----	-----

Kết quả nuôi cấy phân lập tại Khoa Vi sinh bệnh viện Saint-Paul đối với 202 mẫu bệnh phẩm trên đều cho kết quả âm tính.

Bảng 3. Liên quan về phân bố một số căn nguyên gây tiêu chảy với nhóm tuổi:

	Kết quả PCR		Tổng số	p
	Có Vi khuẩn	Không có vi khuẩn		
≤ 24 tháng	9	155	164	>0,05
> 24 tháng	5	33	38	
Tổng số	14	188	202	

Kết quả ở Bảng trên cho thấy, không có sự khác biệt giữa tỷ lệ phân lập các căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy ở 2 nhóm trẻ dưới 24 và trên 24 tháng tuổi.

### BÀN LUẬN

Có nhiều tác nhân vi sinh vật gây tiêu chảy như vi khuẩn, vi rút, ký sinh trùng. Trong đó, các căn nguyên vi khuẩn đóng vai trò quan trọng. Một số vi khuẩn hay gây tiêu chảy thường gặp là *Salmonella* spp; *Shigella* spp; *Escherichia coli* gây tiêu chảy (Diarrheagenic *Escherichia coli*-DEC). Đặc biệt gần đây, vai trò của DEC đang thu hút được sự quan tâm của các bác sĩ lâm sàng và các nhà vi sinh.

Có nhiều phương pháp xác định các căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy: Phương pháp định danh kinh điển sử dụng các tính chất sinh vật hóa học và ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu; Phương pháp thử nghiệm trên động vật thí nghiệm; Phương pháp miễn dịch; Phương pháp sử dụng kỹ thuật nuôi cấy trên tế bào; Các phương pháp sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử như lai ADN, phản ứng khuếch đại gen - Polymerase Chain Reaction (PCR). Trong số các phương pháp trên, PCR rất hay được dùng vì kỹ thuật này có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao [2, 3, 7]. Tuy nhiên cho tới nay, phần lớn các qui trình sử dụng PCR để xác định các vi khuẩn nói chung và vi khuẩn gây tiêu chảy nói riêng, đều thông qua bước cấy bệnh phẩm phân trên các môi trường đặc, rồi tiến hành chọn lựa các khuẩn lạc để tách chiết ADN của vi khuẩn cho phản ứng PCR. Như vậy, cần ít nhất 24-30 giờ để phát hiện được sự có mặt của vi khuẩn gây tiêu chảy trong phân [7]. Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy việc xác định nhanh một số căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy từ phân có thể thực hiện được bằng cách sử dụng kỹ thuật tách chiết ADN trực tiếp từ phân. Trong nghiên cứu này, khi phân tích 202 mẫu phân từ trẻ bị tiêu chảy, tỷ lệ phát hiện DEC và *Salmonella* spp., là 6,9%. Trong khi đó, sử dụng kỹ thuật nuôi cấy, phân lập thông thường không phát hiện được một trường hợp nào. Điều này có thể do

việc sử dụng kháng sinh cho trẻ trước khi đến viện, hoặc số lượng vi khuẩn thấp trong bệnh phẩm, hoặc do điều kiện nuôi cấy, phân lập còn hạn chế. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ việc sử dụng PCR sử dụng ADN tách trực tiếp từ phân có hiệu quả trong việc xác định một số căn nguyên gây tiêu chảy. Mặc dù tỷ lệ phát hiện DEC và *Salmonella* spp., là 6,9%, thấp hơn so với một số nghiên cứu khác sử dụng kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường đặc sau đó tách ADN từ các khuẩn lạc [7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ đối chiếu kết quả PCR với kết quả nuôi cấy, phân lập của khoa Vi sinh, bệnh viện Saint-Paul. Nhóm nghiên cứu không có điều kiện nuôi cấy lại các bệnh phẩm này và tách ADN từ khuẩn lạc như những nghiên cứu trước đây. Do vậy, có thể có một số trường hợp còn bị bỏ sót.

Về phân bố các căn nguyên gây tiêu chảy, EAEC và EPEC là hai căn nguyên gặp với tỷ lệ cao hơn trong số các loại DEC. Điều này cũng phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được 3 chủng *Salmonella*, tuy nhiên bằng kỹ thuật PCR đang sử dụng, chúng tôi không thể xác định được ở mức loài. Phần lớn các căn nguyên vi khuẩn phát hiện được ở nhóm trẻ dưới 24 tháng tuổi, điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên, do số lượng bệnh phẩm phân được xác định có DEC và *Salmonella* spp., còn ít (14 chủng) nên chúng tôi không thấy có sự khác biệt về phân bố của các căn nguyên gây vi khuẩn gây tiêu chảy ở 2 nhóm tuổi.

#### KẾT LUẬN

Kỹ thuật PCR sử dụng ADN tách chiết trực tiếp từ phân cho phép phát hiện được một số vi khuẩn gây tiêu chảy mà bằng kỹ thuật nuôi cấy, phân lập thông thường không phát hiện được.

Việc áp dụng rộng rãi kỹ thuật này ở một số phòng xét nghiệm vi sinh có đầy đủ trang thiết bị góp phần phát hiện sớm và tăng tỷ lệ phát hiện một số căn nguyên vi khuẩn góp phần quan trọng trong chẩn đoán và điều trị.

#### SUMMARY

PCR-based technique using DNA directly extracted from fecal samples of 202 children with diarrhea from Saint-Paul hospital has been used to

detect common bacteria causing diarrhea. The results showed that the prevalence of enteric pathogens was 6.9% while there was no bacteria detected by conventional techniques. Detected bacteria were EAEC, EPEC, ETEC, and *Salmonella* spp., with higher prevalence in EAEC, EPEC and *Salmonella*. The higher prevalence has been seen in children under 24 months of age. There was no significant difference in terms of detection prevalence in two groups of age. This study showed the effectiveness of direct PCR in detection of bacteria causing diarrhea.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Vũ Trung, Nguyễn Thị Hồng Nhung. Phát triển kỹ thuật tách chiết ADN của Shigella và E. coli trực tiếp từ phân. Tạp chí nghiên cứu y học, 2008. 55(3). 104-109.
2. Nguyễn Vũ Trung, Lê Thị Tuyết Trinh. Phát triển và hoàn thiện qui trình tách chiết ADN để ứng dụng PCR xác định trực tiếp Escherichia coli gây bệnh tiêu chảy. Tạp chí nghiên cứu y học, 2008. 56(4). 92-97.
3. Alvarez, J., et al., Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. J Clin Microbiol, 2004. 42(4): p. 1734-8.
4. Begum, D. and M.P. Jackson, Direct detection of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli in ground beef using the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes, 1995. 9(4): p. 259-64.
5. Chow, K.H., et al., Detection of RTX toxin gene in Vibrio cholerae by PCR. J Clin Microbiol, 2001. 39(7): p. 2594-7.
6. Kwang, J., E.T. Littledike, and J.E. Keen, Use of the polymerase chain reaction for Salmonella detection. Lett Appl Microbiol, 1996. 22(1): p. 46-51.
7. Nguyen, T.V., et al., Detection and characterization of diarrheagenic Escherichia coli from young children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol, 2005. 43(2): p. 755-60.
8. Paton, A.W. and J.C. Paton, Direct detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. J Clin Microbiol, 1999. 37(10): p. 3362-5.
9. Ramotar, K., et al., Direct detection of verotoxin-producing Escherichia coli in stool samples by PCR. J Clin Microbiol, 1995. 33(3): p. 519-24.