

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PCR CHẨN ĐOÁN NHANH STREPTOCOCCUS AGALACTIAE Ở PHỤ NỮ MANG THAI

VŨ THỊ KIM LIÊN, TRẦN THỊ HẢI ÂU, ĐỖ THỊ QUỲNH ANH, TĂNG THỊ ANH, NGUYỄN THỊ MINH ANH*;
THANG ĐÌNH TRÍ**, NGÔ THỊ THỊ***, ĐỖ MINH HUYỀN***, ĐẶNG ĐỨC ANH

Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

* Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

** Học viện Quân Y 103

*** Bệnh Viện Việt Pháp, Hà Nội

TÓM TẮT

Streptococcus agalactiae (GBS) là một trong những tác nhân quan trọng nhất gây nhiễm trùng trẻ sơ sinh. Mục đích nghiên cứu này là xây dựng quy trình PCR nhằm sàng lọc *Streptococcus agalactiae* ở phụ nữ mang thai, với nuôi cấy được coi như tiêu chuẩn vàng. 110 mẫu bệnh phẩm dịch âm đạo phụ nữ mang thai tuần 35-37 được thu thập tại bệnh viện Việt Pháp được tiến hành tách chiết ADN bằng hai phương pháp nhiệt và kít, kết quả PCR cho thấy có sự khác biệt giữa hai phương pháp tách chiết. Kết quả dương tính với PCR và nuôi cấy lần lượt là 33/110 (30%) và 15/110 (13,64%). Quy trình PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 100% và 81,05%, đòi hỏi thời gian ít hơn quy trình nuôi cấy. Quy trình PCR với ADN tách chiết bằng kít QIAGEN được sử dụng sàng lọc GBS ở phụ nữ mang thai, cho phép điều trị hiệu quả ngăn ngừa nhiễm trùng trẻ sơ sinh.

Từ khóa: *Streptococcus agalactiae*, phụ nữ mang thai

SUMMARY

DEVELOPMENT OF CONVENTIONAL PCR ASSAY FOR THE RAPID DETECTION OF *Streptococcus agalactiae* IN PREGNANCY

Streptococcus agalactiae (GBS) is one of the most important causal agents of serious neonatal infections. The aim of this study was to develop conventional PCR assay for screening *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. The culture technique was established as the gold standard. One hundred and ten vaginal samples were collected, from women 35-37 weeks of pregnancy at Franco-Vietnamese Hospital. DNA extraction methods including simple boiling and Quiagent KIT were compared in 110 clinical samples. There were significant different between two methods of ADN extractions. PCR technique yielded 33/110 (30%) positive results, significantly higher than of culture 15/110 (13,64%). Sensitivity and specificity for PCR were calculated as 100% and 81.05%, respectively. PCR demonstrated a shorter time than the culture. Thus, conventional PCR assay following QIAGEN extraction DNA can be used in screening for GBS in pregnant women, allowing effective treatment to prevent newborn infection.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, polymerase chain reaction, culture, pregnancy.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus agalactiae hoặc liên cầu nhóm B (GBS) là một trong những tác nhân quan trọng nhất gây bệnh và tử vong cho trẻ sơ sinh trên toàn thế giới (Issacs & Royle, 1999; Mehr et al., 2002; Mullaney, 2001; Pinar, 2004). Từ năm 1996, các hiệp hội chuyên ngành sản, nhi của Mỹ đã khuyến cáo xét nghiệm GBS trong âm đạo và trực tràng của tất cả phụ nữ có thai ở tuần thứ 35-37 như một sàng lọc trước sinh để phát hiện thai phụ mang GBS. Người mang GBS cần được điều trị kháng sinh dự phòng để phòng chống nhiễm trùng sơ sinh cho con.

Từ năm 2002, trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC) khuyến cáo rằng phương pháp phát hiện kinh điển GBS từ âm đạo và trực tràng của phụ nữ có thai là nuôi cấy trên môi trường chọn lọc nhằm hỗ trợ sự phát triển của GBS và ức chế các vi khuẩn khác có thể có mặt trong bệnh phẩm (Costa AL., 2008; Schrag SJ., 2000; Bergeron MG., 2000). Tuy nhiên, phương pháp nuôi cấy kinh điển có nhiều hạn chế về thời gian và độ nhạy, vì vậy một số trường hợp thai phụ nuôi cấy âm tính với GBS nhưng sau đó trẻ sinh ra lại bị nhiễm do GBS. Do đó, việc xây dựng một qui trình chẩn đoán sinh học phân tử nhanh và chính xác cho sàng lọc trước sinh và chẩn đoán nhiễm trùng do GBS là vấn đề nghiên cứu rất quan trọng. Vì vậy, nhóm nghiên cứu của chúng tôi muốn nghiên cứu ứng dụng quy trình PCR nhằm phát hiện nhanh và chính xác GBS từ bệnh phẩm dịch âm đạo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Chủng chuẩn *Streptococcus agalactiae* ATCC ®13813TM (Công ty Lan Oanh cung cấp).

- 17 chủng vi khuẩn chuẩn: *P.vulgaris* ATCC 13315; *E.Coli* ATCC 25922; *S. Suis* ATCC 43765; *Clostridium difficile* ATCC 43593; *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; *S. epidermidis* ATCC 12228; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *K. pneumoniae* ATCC 13883; *S. mitis* ATCC 33399; *N.meningitidis* ATCC 13077; *E. faecalis* ATCC 29212; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *E. cloacae* ATCC 23365; *Acinebacter baumannii* ATCC 19606; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *S. pneumoniae* ATCC 6303; *Proteus mirabilis* ATCC 25933

- 110 mẫu bệnh phẩm dịch âm đạo phụ nữ có thai tuần 35-37 thu thập tại Bệnh viện Việt Pháp từ tháng

5/2013 đến tháng 7/2013

2. Phương pháp nghiên cứu

* **Phương pháp nuôi cấy:** được tiến hành theo thường quy xét nghiệm sàng lọc *Streptococcus agalactiae* của Khoa xét nghiệm, Bệnh viện Việt Pháp

* Phương pháp PCR

- Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm và tách chiết DNA: Cho tampon bệnh phẩm vào ống nghiệm chứa 2-4 ml môi trường chọn lọc Todd Hewitt (canh thang BHI) có bổ sung gentamicin (8 µg/ml) và nalidixic acid (15 µg/ml), ủ nhiệt độ 35-37°C trong 15-18 giờ. Sau khi ly tâm, cặn vi khuẩn được rửa với PBS x1 và hoà cặn trong dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5). Hỗn hợp dung dịch này được tách chiết ADN theo hai phương pháp: Phương pháp nhiệt độ (10 phút ở 100°C, chuyển ngay vào đá 5 phút, ly tâm lấy dịch nổi chứa ADN, sử dụng làm ADN khuôn cho phản ứng PCR) và phương pháp tách bằng kit QIAGEN theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Quy trình PCR khuếch đại đoạn gen cfb: Sag 059: 5'- TTT CAC CAG CTG TAT TAG AAG TA-3'; Sag 190: 5'- GTT CCC TGA ACA TTA TCT TTG AT-3' [1]

- Phân tích số liệu: Độ nhạy, độ đặc hiệu được tính toán cho quy trình PCR dựa trên nuôi cấy là tiêu chuẩn vàng. Độ tương đồng giữa hai phương pháp được xác định sử dụng hệ số Kappa.

* Phương pháp giải trình tự ADN

Giải trình tự sản phẩm PCR đặc hiệu của GBS theo phương pháp giải trình tự gen của Sanger.

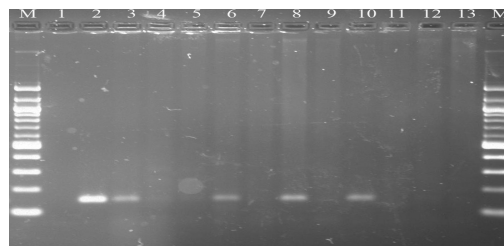
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Xây dựng quy trình PCR chẩn đoán *Streptococcus agalactiae*

Sau quá trình hoàn thiện và tối ưu nồng độ MgCl₂; dNTPs; primers..., nhóm nghiên cứu quyết định xây dựng quy trình PCR chẩn đoán GBS sử dụng thành phần phản ứng PCR và chu kỳ nhiệt độ như sau:

- Thành phần phản ứng: 3,0 mM MgCl₂, 0,4 mM mỗi Sag059 và mỗi Sag190, 200 mM dNTPs; 1,0 u Taq polymerase, 1 µl ADN mẫu tương đương 50-150 ng ADN, bổ sung nước cất vô trùng vừa đủ thể tích 25 µl. Trong phản ứng PCR luôn tiến hành đồng thời một chứng dương là ADN chủng *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 và một chứng âm là H₂O.

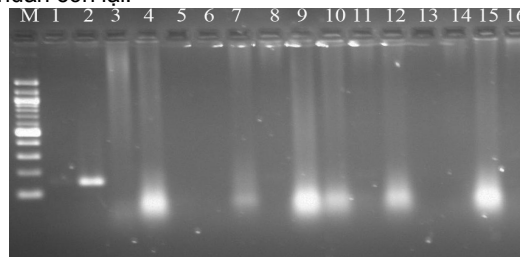
- Điều kiện PCR: Giai đoạn biến tính ban đầu 95°C/05 phút; 30 chu kỳ (95°C/30 giây; 55°C/30 giây; 72°C/30 giây); giai đoạn tổng hợp cuối cùng: 72°C/05 phút. Sản phẩm PCR có độ dài 153 bp đặc hiệu GBS được khuếch đại với cặp mồi Sag59 và mỗi Sag190, kiểm tra trên gel agarose 2,0% trong đệm 1 x T r i s-borate-EDTA buffer.



Hình 1. Kết quả khuếch đại đoạn ADN 153 bp đặc hiệu *Streptococcus agalactiae*

Marker: Thang ADN chuẩn 100bp; 1: chứng âm; 2: *Streptococcus agalactiae* ATCC®13813; 3→ 13: mẫu bệnh phẩm dịch âm đạo của phụ nữ mang thai

- Nhằm xác định độ đặc hiệu của cặp primers Sag 059 và Sag190, nhóm nghiên cứu sử dụng chủng chuẩn *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 và 17 chủng vi khuẩn chuẩn khác nhau. Kết quả cho thấy xuất hiện vạch 153 bp đặc hiệu trên chủng chuẩn, không xuất hiện vạch đặc hiệu trên tất cả các chủng vi khuẩn còn lại.



Hình 2: Khuếch đại đoạn ADN đặc hiệu *Streptococcus agalactiae* trên một số chủng vi khuẩn khác nhau. 1: Thang ADN chuẩn 100 bp; 2: *Streptococcus agalactiae*; 3 → 16: các chủng chuẩn lần lượt như mục 2.1.

2. Áp dụng quy trình PCR chẩn đoán *Streptococcus agalactiae* trên bệnh phẩm dịch âm đạo của phụ nữ mang thai

Trong 110 bệnh phẩm dịch âm đạo của phụ nữ mang thai tuần 35-37 tuần tuổi, được tiến hành khuếch đại đoạn gen đặc hiệu GBS theo 02 phương pháp tách chiết ADN bằng nhiệt độ và kit QIAGEN. Kết quả quy trình PCR sử dụng ADN tách chiết bằng nhiệt 16/110 (14,5%) và bằng kit 33/110 (30%). Vì vậy chúng tôi lựa chọn khuếch đại PCR sàng lọc GBS ở phụ nữ mang thai với ADN tách chiết bằng kit QIAGEN

Khi so sánh kết quả quy trình PCR sử dụng ADN tách chiết bằng kit với quy trình nuôi cấy của Bệnh viện Việt Pháp (nuôi cấy được coi là tiêu chuẩn vàng), dương tính với quy trình nuôi cấy là 15/110 (13,64 %), trong khi đó dương tính với quy trình PCR là 33/110 (30%). Tất cả những mẫu dương tính với quy trình nuôi cấy, cũng dương tính với quy trình PCR, độ nhạy của quy trình PCR là 100% (95% CI: 78,03-100). Trong số 95 mẫu âm tính với nuôi cấy, có 18 mẫu dương tính với PCR và 77 mẫu âm tính với

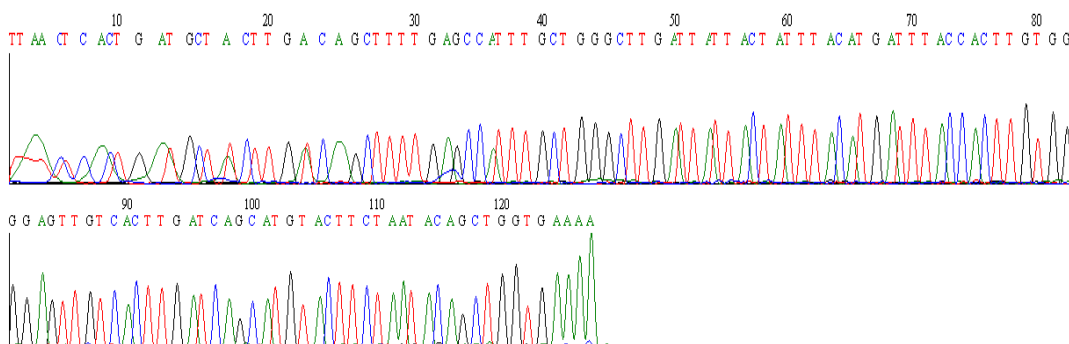
cả hai quy trình. Độ đặc hiệu của quy trình PCR là 81,05% (95% CI: 71,72-88,36). Độ tương đồng của hai quy trình có chỉ số Kappa là: 0,538 [2] (Bảng 1).

Bảng 1: So sánh kết quả quy trình PCR và nuôi cấy

| PCR (Kít) (Viện VSDTTU) | Nuôi cấy (BV Việt Pháp) | | Tổng số |
|----------------------------|-------------------------|---------|---------|
| | Dương tính | Âm tính | |
| Dương tính | 15 | 18 | 33 |
| Âm tính | 0 | 77 | 77 |
| Tổng số | 15 | 95 | 110 |

3. Phương pháp giải trình tự đoạn ADN đặc hiệu *Streptococcus agalactiae*

Trong số 18 mẫu bệnh phẩm dịch âm đạo dương tính với PCR nhưng âm tính với nuôi cấy, nhóm nghiên cứu lấy ngẫu nhiên 06 mẫu bệnh phẩm giải trình tự ADN với primer Sag190. Phân tích kết quả bằng phần mềm BioEdit, sử dụng công cụ blast so sánh trình tự trên GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) cho thấy trình tự sản phẩm PCR 153 bp của 06 mẫu được phân tích có độ tương đồng 100% với trình tự chủng *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (GenBank GL636070.1). Kết quả này cho phép khẳng định mức độ chính xác của kết quả PCR.



Hình 3: Kết quả giải trình tự mẫu dịch âm đạo của phụ nữ mang thai STT 105

BÀN LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Ở Việt Nam, số liệu về nhiễm trùng sơ sinh do GBS ở bệnh viện thường không đầy đủ do 2 nguyên nhân: thiếu hệ thống giám sát các nhiễm trùng sơ sinh do GBS và tỉ lệ nuôi cấy dương tính thấp do việc lạm dụng kháng sinh phổ rộng, kháng sinh thế hệ mới trong các bệnh viện. Hơn nữa, nghiên cứu tỷ lệ thai phụ mang GBS ở cộng đồng mới bước đầu được tiến hành ở Việt Nam như: tỷ lệ nhiễm GBS trên thai phụ tại Bệnh viện Từ Dũ là 18,1%; Tác giả Nguyễn Thị Vĩnh Thành Bệnh viện Từ Dũ năm 2006 là 17% [3]; Tác giả Aya Goto thực hiện tại 10 huyện thuộc tỉnh Nghệ An năm 2003 là 4,4% và tác giả Nguyễn Thị Ngọc Khanh nghiên cứu tại Hà Nội năm 2000 là 4,5%. Những nghiên cứu trên hoàn toàn dựa trên phương pháp nuôi cấy truyền thống, số liệu của các nghiên cứu này thấp hơn các nghiên cứu khác trên thế giới khi sử dụng phương pháp sinh học phân tử. Vì vậy CDC khuyến cáo sử dụng nuôi cấy làm tiêu chuẩn vàng để sàng lọc GBS ở phụ nữ mang thai, nhưng ngày càng cần thiết phải có các quy trình thường quy chẩn đoán GBS nhanh và hiệu quả hơn phương pháp nuôi cấy [4].

Trong quá trình xây dựng, hoàn thiện quy trình PCR nhằm phát hiện nhanh và chính xác GBS từ bệnh phẩm dịch âm đạo ở phụ nữ mang thai, chúng tôi đã sử dụng hai phương pháp tách chiết ADN bằng nhiệt và bằng kít. Phương pháp tách chiết bằng nhiệt có giá thành hạ và thao tác đơn giản nhưng kết quả không khả thi khi dương tính lần lượt với kít là 33/110; nhiệt độ 16/110. Vì vậy, nhóm nghiên cứu

thực hiện quy trình PCR chẩn đoán GBS trên dịch âm đạo phụ nữ mang thai. sử dụng ADN tách chiết bằng kít thương mại. Đồng thời, nhóm nghiên cứu đề xuất tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về phương pháp tách chiết ADN bằng nhiệt như tìm hiểu loại đệm thích hợp hơn, chu kỳ nhiệt khác nhau nhằm làm tăng tỷ lệ dương tính thật và giảm giá thành sản phẩm.

Tỷ lệ GBS cư trú trong âm đạo hoặc trực tràng của phụ nữ có thai thay đổi từ 10-35%, một nghiên cứu của Hà lan cho thấy phụ nữ mang thai châu Á là 21%; châu Phi 29%; Mỹ 21%; Nauy 34,8% [5]. Kết quả của nghiên cứu này, cho thấy tỷ lệ nhiễm GBS ở dịch âm đạo của phụ nữ mang thai là 13,64% đối với nuôi cấy và 30% đối với PCR. Trong một nghiên cứu tại Brazil, Fernanda de Paris và cộng sự xác định được tỷ lệ nhiễm GBS ở dịch âm đạo của phụ nữ mang thai lần lượt là 15,96% với nuôi cấy và 26,99% bằng PCR, tương đối phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi [6]. Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm GBS ở phụ nữ mang thai có thể thay đổi nhiều phụ thuộc vào vị trí địa lý, tuổi, điều kiện sinh nở và tình trạng kinh tế xã hội.

Kết quả nghiên cứu này khi so sánh quy trình nuôi cấy, quy trình PCR có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 81,05%. Độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình PCR tương đương với nghiên cứu trước đây của Fernanda de-Paris có độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 100% and 86.88% [6], tuy nhiên độ đặc hiệu của quy trình PCR này thấp hơn độ đặc hiệu của một số nghiên cứu khác [7] có thể do thường quy xét nghiệm của bệnh viện Việt Pháp là tampon bệnh

phẩm dịch âm đạo được cấy trực tiếp vào đĩa thạch máu, ủ 35-37°C qua đêm 5% CO₂; không tăng sinh trong môi trường chọn lọc Todd Hewitt (canh thang BHI) có bổ sung gentamicin (8 µg/ml) và nalidixic acid (15 µg/ml), ủ ở nhiệt độ 35-37°C trong 15-18 giờ (như khuyến cáo thu thập mẫu của CDC). Khi so sánh kết quả của nghiên cứu này giữa quy trình PCR với nuôi cấy, mặc dù quy trình nuôi cấy được xem là tiêu chuẩn vàng cho quá trình sàng lọc nhiễm GBS ở phụ nữ mang thai, nhưng kết quả cho thấy quy trình nuôi cấy dẫn đến những trường hợp âm tính giả, vì vậy quy trình này không hoàn toàn hiệu quả trong phát hiện GBS. Hơn nữa, quy trình nuôi cấy sàng lọc GBS đòi hỏi thời gian ít nhất 48-96 giờ (2-4 ngày) và trong khi đó quy trình PCR chỉ cần 24 giờ. Kết quả của nghiên cứu là quy trình PCR sàng lọc nhiễm GBS ở phụ nữ mang thai cho phép có độ nhạy cao, tăng hiệu quả điều trị và giảm tỷ lệ mắc bệnh và tử vong cho trẻ sơ sinh.

KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm GBS ở dịch âm đạo của phụ nữ mang thai cho thấy 13,64% đối với nuôi cấy và 30% đối với PCR. Khi so sánh với quy trình nuôi cấy, độ nhạy của quy trình PCR là 100% (95% CI: 78,03-100) và độ đặc hiệu 81,05% (95% CI: 71,72-88,36). Độ tương đồng của hai quy trình có chỉ số Kappa là: 0,538.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Danbing Ke; Christian menard; Francois J. Picard; Maurice Boissimot; Marc Ourlette; Paul H. Roy and

Michel G. Bergeron. Developmen of conventional and real-time PCR assays for the Rapid detection of group B streptococci. Clinical chemistry, march 2000 vol.46 no.3 324-331.

2. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Family Medicine 2005 May;37(5):360-3.

3. Nguyễn Thị Vĩnh Thành; Ngô Thị Kim Phụng (2009). Tỷ lệ thai phụ nhiễm liên cầu khuẩn nhóm B tại bệnh viện Từ Dũ (6/2006-6/2007). Y học Thành phố Hồ Chí Minh; Vol.13; No. 1-2009: 82-86.

4. F. J. Picard; M. G. Bergeron. 2004. Laboratory detection of group B streptococcus for prevention of perinatal disease. Eur Clin. Microbiol Infect Dis. (2004). 23: 665-671.

5. Hakon Bergseng. Aspects of group B streptococcus (GBS) disease in the newborn. Dotoral theses at NTNU, 2009; 45.

6. Fernanda de-Paris; Alice Beatriz Monbach Pinheiro Machado;... Group B streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. Brazilian Journal of Infectious Diseases; Vol. 15; no. 4; 2011

7. Sarah Shabayek; Salah Abdalla; Abouzeid M. H. Abouzeid. 2010. Comparison of scp B gene and cfb gene polymerase chain reaction assays with culture on Islam medium to detect group B streptococcus in pregnancy. Indian journal of Medical Microbiology. Vol. 28; 4; 320-325