

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO                      BỘ QUỐC PHÒNG**  
**VIỆN NGHIÊN CỨU KHOA HỌC Y DƯỢC LÂM SÀNG 108**

**TRẦN THỊ LIÊN**

**NGHIÊN CỨU MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN VÀ GIÁ TRỊ CHẨN ĐOÁN,  
TIÊN LƯỢNG CỦA MỘT SỐ MICRORNA Ở BỆNH NHÂN  
NHIỄM KHUẨN HUYẾT**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI – 2021**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ QUỐC PHÒNG**

**VIỆN NGHIÊN CỨU KHOA HỌC Y DƯỢC LÂM SÀNG 108**

**TRẦN THỊ LIÊN**

**NGHIÊN CỨU MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN VÀ GIÁ TRỊ CHẨN ĐOÁN,  
TIÊN LƯỢNG CỦA MỘT SỐ MICRORNA Ở BỆNH NHÂN  
NHIỄM KHUẨN HUYẾT**

**Chuyên ngành: Truyền nhiễm và các bệnh nhiệt đới**

**Mã ngành: 62.72.01.53**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học:**

**1.TS. Vũ Viết Sáng**

**2.TS. Ngô Tất Trung**

**HÀ NỘI – 2021**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trần Thị Liên, nghiên cứu sinh khóa năm 2013, chuyên ngành Truyền nhiễm và các bệnh nhiệt đới, Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược lâm sàng 108, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Vũ Viết Sáng và TS. Ngô Tất Trung.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, tháng 09 năm 2021*

**Học viên**

**Trần Thị Liên**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, tạo điều kiện của Ban Giám đốc Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược Lâm sàng 108, Viện Lâm sàng các bệnh Truyền nhiễm và nhiệt đới, Khoa Sinh học phân tử, Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt Đức, Đảng ủy, Ban Giám hiệu Trường Đại học Y dược Hải Phòng, Ban Giám đốc, và các phòng ban chức năng của Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành về sự giúp đỡ đó.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Lê Hữu Song, Chủ nhiệm Bộ môn Truyền nhiễm, Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược Lâm sàng 108- Thầy đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành nghiên cứu, chỉ bảo và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Vũ Viết Sáng và TS. Ngô Tất Trung – những thầy giáo trực tiếp hướng dẫn và chỉ bảo cho tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt Đức, Viện Lâm sàng các bệnh Truyền nhiễm và nhiệt đới, Khoa Sinh học phân tử, khoa Vi sinh vật, khoa Khám bệnh Bệnh viện TƯQĐ 108 đã giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu, thu thập số liệu và chạy các mẫu nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Sau đại học, Bộ môn Truyền nhiễm - Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược Lâm sàng 108 đã quan tâm giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các thầy trong Hội đồng bảo vệ cấp Bộ môn, cấp Viện đã góp ý cho tôi nhiều ý kiến sâu sắc và quý báu để luận án được hoàn thiện.

Tôi xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp của Tôi đang công tác tại Trường Đại học Y Dược Hải Phòng và Khoa Bệnh nhiệt đới Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp và gia đình đã động viên, khích lệ, tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành luận án này.

**Tác giả luận án**

**Trần Thị Liên**

## MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
<b>LỜI CAM ĐOAN .....</b>	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN .....</b>	<b>ii</b>
<b>MỤC LỤC .....</b>	<b>iii</b>
<b>DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT .....</b>	<b>vi</b>
<b>DANH MỤC BẢNG .....</b>	<b>ix</b>
<b>DANH MỤC BIỂU ĐỒ .....</b>	<b>xi</b>
<b>DANH MỤC HÌNH .....</b>	<b>xii</b>
<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Tổng quan về nhiễm khuẩn huyết.....	3
1.1.1. Định nghĩa nhiễm khuẩn huyết.....	3
1.1.2. Căn nguyên, ổ nhiễm khuẩn tiên phát và yếu tố nguy cơ.....	6
1.1.3. Cơ chế bệnh sinh của nhiễm khuẩn huyết .....	7
1.1.4. Vai trò các dấu ấn sinh học trong nhiễm khuẩn huyết .....	11
1.2. miRNA và vai trò của một số miRNA trong NKH .....	13
1.2.1. Nguồn gốc sinh học của miRNA .....	14
1.2.2. Cơ chế hoạt động của miRNA ở người .....	15
1.2.3. Đặc tính của miRNA.....	15
1.2.4. Các kỹ thuật định lượng miRNA .....	16
1.2.5. Vai trò của miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh ở người	17
1.2.6. Vai trò của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết .....	20
<b>Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>31</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	31
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân nghiên cứu .....	31
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	32
2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu.....	32

2.2.1. Địa điểm nghiên cứu .....	32
2.2.2. Thời gian nghiên cứu .....	32
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	32
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu .....	32
2.3.2. Phương pháp tiến hành nghiên cứu .....	33
2.4. Nội dung nghiên cứu.....	39
2.4.1. Chỉ tiêu nghiên cứu.....	39
2.4.2. Định nghĩa các biến số cần thu thập .....	43
2.5. Phương tiện, sinh phẩm, và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu .....	45
2.5.1. Khám lâm sàng .....	45
2.5.2. Các xét nghiệm huyết học và sinh hóa cơ bản.....	45
2.5.3. Xét nghiệm PCT .....	46
2.5.4. Cấy khuẩn và định danh.....	46
2.5.5. Kỹ thuật multiplex PCR xác định DNA của vi khuẩn trong máu .	46
2.6. Phương tiện nghiên cứu .....	46
2.7. Xử lý số liệu.....	47
2.8. Đạo đức nghiên cứu .....	49
<b>Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>51</b>
3.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng .....	51
3.1.1. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết .....	51
3.1.2. Một số đặc điểm cận lâm sàng.....	54
3.2. Mức độ biểu hiện của các miRNA.....	57
3.2.1. Mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết so với nhóm chứng.....	57
3.2.2. Liên quan mức độ biểu hiện của miRNA với biểu hiện lâm sàng...	61
3.2.3. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA với suy chức năng cơ quan.....	63
3.2.4. Sự thay đổi biểu hiện của miRNA theo mức độ nhiễm khuẩn huyết .	64

3.2.5. Mức độ biểu hiện miRNA ở BN NKH theo kết quả phát hiện tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết .....	65
3.2.6. Mức độ biểu hiện của miRNA theo kết quả điều trị.....	66
3.3. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết	66
3.3.1. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết .....	66
3.3.2. Giá trị của miRNA trong tiên lượng bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.	71
<b>Chương 4. BÀN LUẬN .....</b>	<b>76</b>
4.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết ..	76
4.1.1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	76
4.1.2. Đặc điểm cận lâm sàng nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết .....	79
4.2. Mức độ biểu hiện miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết .....	83
4.2.1. Mức độ biểu hiện miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng là người khỏe mạnh và bệnh nhân SXH Dengue.....	83
4.2.2. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA theo vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát của nhiễm khuẩn huyết .....	87
4.2.3. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết theo rối loạn chức năng cơ quan .....	87
4.3. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết	93
4.3.1. Vai trò của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết .....	93
4.3.2. Vai trò của miRNA trong tiên lượng nhiễm khuẩn huyết .....	98
<b>HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI.....</b>	<b>105</b>
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>106</b>
<b>KHUYẾN NGHỊ.....</b>	<b>108</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

TT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
		American College of Chest Physicians/Society of Critical Care
1	ACCP/SCCM	Medicine (Hội các Thầy thuốc lồng ngực Hoa Kỳ /Hiệp hội Hồi sức Hoa Kỳ)
2	AKI	Acute kidney injury (Tổn thương thận cấp)
3	ALI	Acute lung injury (Tổn thương phổi cấp)
4	aPTT	Activated partial thromboplastin time (Thời gian hoạt hóa một phần thromboplastin)
5	APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (Thang điểm lượng giá bệnh lý cấp tính và mạn tính)
6	ARDS	Acute respiratory distress syndrome (Hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển)
7	AUC	Area Under the ROC Curve (Diện tích dưới đường cong ROC)
8	BN	Bệnh nhân
9	BUN	Blood urea nitrogen (Nồng độ nitrogen ure trong máu)
10	Bilirubin TP / TT	Nồng độ bilirubin máu toàn phần/ trực tiếp
11	CI	Confident Interval (Khoảng tin cậy)
12	CRP	C – reactive protein ( Protein C phản ứng)
13	DAMPS	Damage-associated molecular pattern (Mô hình phân tử liên quan tổn thương)
14	FiO <sub>2</sub>	Fraction of inspired oxygen concentration (Phân suất oxy trong khí hít vào)
15	Hb	Hemoglobin (Nồng độ huyết sắc tố)
16	Hct	Hematocrit (Dung tích hồng cầu)



17	IL	Interleukin
18	INR	International Normalized Ratio (Tỉ số chuẩn hóa quốc tế)
19	IRAK-1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (Enzym liên kết thụ thể IL-1)
20	JAK-STAT	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (Bộ chuyển đổi tín hiệu và hoạt hóa phiên mã Janus kinase)
21	LPS	Lipopolysaccharides (Nội độc tố)
22	MAP	Mean Arterial Pressure (Huyết áp động mạch trung bình)
23	MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Protein kinase hoạt hóa Mitogen)
24	MIF	Macrophage migration inhibitory factor (yếu tố ức chế di chuyển đại thực bào)
25	MODS	Multiple organ dysfunction syndrome (Hội chứng rối loạn chức năng đa cơ quan)
26	MiRNA	micro Ribonucleic acid (Phân tử axit ribonucleic siêu nhỏ)
27	NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Yếu tố nhân chuỗi nhẹ kappa tăng hoạt hóa tế bào B)
28	NKH	Nhiễm khuẩn huyết
29	NMES1	New molecular entities (Thực thể phân tử mới)
30	HuR	Hu antigen R (Kháng nguyên HuR)
31	PaCO <sub>2</sub>	Phân áp CO <sub>2</sub> máu động mạch
32	PaO <sub>2</sub>	Phân áp O <sub>2</sub> máu động mạch
33	PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns (Mô phân tử liên quan đến mầm bệnh)
34	PCT	Procalcitonin
35	PT	Prothrombin time (Thời gian prothrombin)
36	RLCN	Rối loạn chức năng
37	ROC	The receiver operating characteristic (Đường cong chẩn đoán)

38	Se	Sensitivity (Độ nhạy)
39	SIRS	Systemic Inflammatory Response syndrome ( Hội chứng đáp ứng viêm hệ thống)
40	SNK	Sốc nhiễm khuẩn
41	SOFA	Sequential organ failure assessenzymt score (Thang điểm lượng giá rối loạn chức năng cơ quan theo thời gian)
42	Sp	Specificity (Độ đặc hiệu)
43	SSC	Surviving Sepsis Campaign (Chiến dịch kiểm soát nhiễm khuẩn huyết)
44	sTREM	soluble Triggering Receptor Expressed by Myeloid cells 1 (Thụ thể hòa tan hoạt hóa biểu hiện bởi các tế bào tủy –I)
45	SuPaR	Soluble Plasminogen Aactivator Urokinase Receptor (Thụ thể hòa tan Plasminogen urokinase)
46	SXH Dengue	Sốt xuất huyết Dengue
47	TAB	TAK1 binding protein 1 (Protein liên kết yếu tố chuyển dạng tăng trưởng)
48	TAK	Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 ( men hoạt hóa yếu tố chuyển dạng tăng trưởng)
59	Th1	T Helper 1 (Tế bào T giúp đỡ 1)
50	Th2	T Helper 2 (Tế bào T giúp đỡ 2)
51	TLR	Toll like receptor (Thụ thể tiếp nhận dạng chuông)
52	TNF	Tumor Necrosis Factor (Yếu tố hoại tử u)
53	TRAF-6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor (Thụ thể liên quan đến yếu tố hoại tử khối u)
54	Treg	T recognise (Tế bào T nhận biết)

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng</b>	<b>Tên bảng</b>	<b>Trang</b>
Bảng 1.1.	Tiêu chuẩn chẩn đoán NKH theo đồng thuận quốc tế lần thứ 2 .....	4
Bảng 1.2.	Thay đổi khái niệm về nhiễm khuẩn huyết .....	5
Bảng 1.3.	Bảng điểm SOFA đánh giá suy chức năng tạng .....	6
Bảng 1.4.	Vai trò của miRNA trong cơ chế bệnh sinh của nhiễm khuẩn huyết.....	24
Bảng 2.1.	Trình tự mỗi của các miRNA .....	35
Bảng 2.2.	Đánh giá các biến đổi về chỉ số huyết học .....	41
Bảng 2.3.	Các biến đổi về chỉ số sinh hóa máu .....	42
Bảng 2.4.	Tiêu chuẩn rối loạn chức năng cơ quan theo Knaus.....	44
Bảng 3.1.	Đặc điểm chung của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết .....	51
Bảng 3.2.	Các bệnh lý nền ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	52
Bảng 3.3.	Đặc điểm suy chức năng các cơ quan.....	53
Bảng 3.4.	Đặc điểm xét nghiệm huyết học .....	54
Bảng 3.5.	Đặc điểm xét nghiệm sinh hóa máu .....	55
Bảng 3.6.	Kết quả xét nghiệm lactat máu động mạch và Procalcitonin .....	55
Bảng 3.7.	So sánh mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với người khỏe mạnh .....	58
Bảng 3.8.	So sánh mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue .....	59
Bảng 3.9.	Mối tương quan giữa các miRNA với tuổi ở từng nhóm nghiên cứu .....	61
Bảng 3.10.	Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết có bệnh lý nền. ....	61
Bảng 3.11.	Mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p và miRNA-147b theo vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát .....	62

Bảng 3.12. Mức độ biểu hiện miRNA-155 và miRNA-223 theo vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát.....	62
Bảng 3.13. Mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH có suy hô hấp.....	63
Bảng 3.14. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH có rối loạn chức năng tim mạch.....	63
Bảng 3.15. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH có rối loạn chức năng thận.....	64
Bảng 3.16. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA theo mức độ nhiễm khuẩn huyết.....	64
Bảng 3.17. Mức độ biểu hiện của miRNA theo kết quả phát hiện tác nhân...	65
Bảng 3.18. Mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH theo nhóm tác nhân gây bệnh.....	65
Bảng 3.19. Mức độ biểu hiện của miRNA theo kết quả điều trị.....	66
Bảng 3.20. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là người khỏe mạnh.....	67
Bảng 3.21. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là SXH Dengue.....	68
Bảng 3.22. Giá trị của miRNA trong tiên lượng sốc ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	71
Bảng 3.23. Giá trị của miRNA, PCT, bạch cầu trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	73
Bảng 4.1. Các nghiên cứu về mô hình kết hợp các chỉ số lâm sàng và xét nghiệm trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết.....	103

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ	Tên biểu đồ	Trang
Biểu đồ 3.1.	Ồ nhiễm khuẩn tiên phát của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết ....	52
Biểu đồ 3.2.	Rối loạn chức năng các cơ quan ở bệnh nhân nghiên cứu .....	53
Biểu đồ 3.3.	Tác nhân được phát hiện trong máu .....	56
Biểu đồ 3.4.	Mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân NKH và nhóm chứng (không NKH) .....	57
Biểu đồ 3.5.	Mức độ biểu hiện của 4 miRNA huyết tương ở người khỏe mạnh, bệnh nhân SXH Dengue và nhiễm khuẩn huyết.....	60
Biểu đồ 3.6.	Đường cong ROC của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là người khỏe mạnh .....	66
Biểu đồ 3.7.	Đường cong ROC của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là SXH Dengue.....	68
Biểu đồ 3.8.	Giá trị của các miRNA kết hợp trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là người khỏe mạnh .....	69
Biểu đồ 3.9.	Giá trị của các miRNA kết hợp trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm SXH Dengue.....	70
Biểu đồ 3.10.	Giá trị của miRNA và PCT trong tiên lượng sốc ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	71
Biểu đồ 3.11.	Giá trị của miRNA, PCT, bạch cầu trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	72
Biểu đồ 3.12.	Đường cong ROC của miRNA kết hợp và miRNA+PCT trong tiên lượng sốc ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	73
Biểu đồ 3.13.	Đường cong ROC của miRNA kết hợp trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	74
Biểu đồ 3.14.	Đường cong ROC của miRNA kết hợp với PCT, SOFA và tuổi trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.....	75

## DANH MỤC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1.	Quá trình sinh tổng hợp của miRNA .....	14
Hình 1.2.	Vai trò của miRNA ở phản ứng viêm.....	21
Hình 1.3.	Mức độ biểu hiện của một số miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và SIRS.....	25
Hình 1.4.	Vai trò miRNA-146a trong ức chế dịch mã tế bào dung nạp nội độc tố.....	27
Hình 1.5.	Động học miRNA-147b .....	28
Hình 2.1.	Máy Agilent Technologies Stratagiene Mx3005p Real Time PCR.....	47
Hình 2.2.	Sơ đồ nghiên cứu.....	50

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn huyết (NKH) được định nghĩa là tình trạng rối loạn chức năng cơ quan đe dọa tính mạng do mất kiểm soát đáp ứng hệ thống miễn dịch của cơ thể đối với căn nguyên nhiễm trùng [1]. Trong những năm gần đây, đã có nhiều tiến bộ về hiểu biết về cơ chế bệnh sinh của NKH giúp cải thiện chẩn đoán, chăm sóc và điều trị. Tuy nhiên, NKH vẫn đang là một trong những thách thức đối với hệ thống chăm sóc sức khỏe với tỷ lệ mắc lên tới 437/100.000 dân và tỷ lệ tử vong cao [2]. Các báo cáo cũng đã ghi nhận NKH là một trong những căn nguyên gây tử vong hàng đầu trong bệnh viện, đặc biệt tại các đơn vị hồi sức tích cực với 270.000 ca tử vong liên quan đến NKH tại Hoa Kỳ, cứ ba bệnh nhân tử vong tại bệnh viện thì có một ca liên quan đến NKH [3].

Nhận biết và chẩn đoán sớm NKH giúp các nhà lâm sàng đưa ra các liệu pháp điều trị phù hợp và kịp thời, nhằm cải thiện các biến chứng như giảm tỷ lệ sốc nhiễm khuẩn, suy đa tạng, đồng thời giảm tỷ lệ tử vong [4]. Tuy nhiên, biểu hiện lâm sàng của nhiễm khuẩn huyết thường đa dạng và phức tạp, phụ thuộc vào đặc điểm của mỗi quần thể như tuổi, bệnh lý nền, tình trạng hệ thống miễn dịch của từng cá thể, ổ nhiễm khuẩn cũng như các tác nhân gây bệnh [5]. Các nghiên cứu đã cho thấy nhiều dấu ấn sinh học (biomarkers) đã được sử dụng trong chẩn đoán sớm và tiên lượng NKH như các cytokine (interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP) [6],[7],[8]. Mặc dù vậy các dấu ấn sinh học này có độ đặc hiệu chưa cao và vẫn cần tìm kiếm các dấu ấn mới nhằm giúp các nhà lâm sàng có thêm các công cụ phát hiện sớm cũng như tiên lượng bệnh nhân NKH [9].

MicroRNA (miRNA) là các phân tử RNA chuỗi đơn ngắn (khoảng 22 nucleotide), nội sinh, không tham gia vào quá trình tổng hợp protein, tuy nhiên chúng có vai trò điều hòa các gen giai đoạn sau phiên mã [12]. Ở bệnh nhân

NKH, miRNA cho thấy sự có mặt ở các giai đoạn trong cơ chế bệnh sinh như: đáp ứng viêm sớm, đáp ứng chống viêm, phản ứng viêm quá mức, ức chế miễn dịch, chết tế bào theo chương trình và cuối cùng dẫn đến rối loạn chức năng đa cơ quan [10]. Nghiên cứu chỉ ra vai trò của một số miRNA như miRNA-15a, miRNA-125b và miRNA-146a, miRNA-147 trong kiểm soát hoạt hóa NF- $\kappa$ B, thông qua đó tham gia các quá trình điều hòa cơ chế bệnh sinh của NKH[11],[12].

Các nghiên cứu đã cho thấy sự thay đổi mức độ biểu hiện của các miRNA trong huyết tương của bệnh nhân NKH, trong đó một số miRNA như miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-223, miRNA-155 cho thấy là những dấu ấn có tiềm năng trong chẩn đoán và tiên lượng NKH [13],[12],[14]. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của các miRNA khác nhau ở bệnh nhân NKH phụ thuộc vào đặc trưng của các quần thể nghiên cứu cũng như phương pháp đánh giá mức độ biểu hiện và nội chuẩn được sử dụng [15].

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu đã cho thấy vai trò của các dấu ấn sinh học như IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , PCT và CRP trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh nhân NKH [6],[16], đồng thời có nghiên cứu tìm hiểu về vai trò của một số miRNA trong bệnh lý gan mật, ung thư[17]. Tuy nhiên, chưa có các công bố về vai trò của các miRNA ở bệnh nhân NKH tại Việt Nam.

Xuất phát từ lý do trên, chúng tôi tiến hành đề tài: “**Nghiên cứu mức độ biểu hiện và giá trị chẩn đoán, tiên lượng của một số miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**” với hai mục tiêu sau:

1. *Khảo sát mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết so với nhóm chứng.*

2. *Xác định vai trò của miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.*



## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Tổng quan về nhiễm khuẩn huyết

##### 1.1.1. Định nghĩa nhiễm khuẩn huyết

Nguồn gốc của thuật ngữ nhiễm khuẩn huyết "sepsis" có thể bắt nguồn từ hơn 2700 năm trước bởi Homer[18], sau đó, thuật ngữ này được Hippocrates, Aristotle, Plutarch và Galen sử dụng với ý nghĩa không thay đổi về cơ bản[18]. Năm 1914, lần đầu tiên sinh lý bệnh của nhiễm trùng huyết trở nên rõ ràng trong mô tả của Schottmüller về nhiễm khuẩn huyết là tình trạng vi sinh vật xâm nhập vào máu gây ra các dấu hiệu bệnh[19].

Định nghĩa về hội chứng đáp ứng viêm hệ thống, NKH, NKH nặng và sốc nhiễm khuẩn lần đầu tiên được đưa ra vào năm 1992 tại Hội nghị đồng thuận của Hội lồng ngực trường đại học Hoa kỳ (ACCP) và Hội hồi sức Hoa kỳ (SCCM) [20]. Các định nghĩa đã được đưa ra ở Hội nghị đồng thuận lần thứ nhất về NKH (Sepsis-1), cụ thể như sau:

- Hội chứng đáp ứng viêm hệ thống (SIRS): là một hội chứng lâm sàng do rối loạn điều hòa đáp ứng viêm của tình trạng viêm do nhiễm trùng hoặc không do nhiễm trùng. SIRS được xác định khi có 2 trong 4 dấu hiệu sau:

- + Nhiệt độ  $>38^{\circ}\text{C}$  hoặc  $<36^{\circ}\text{C}$  (thân nhiệt trung tâm)
- + Mạch nhanh  $>90$  lần/phút
- + Thở nhanh  $>20$  lần/phút hay  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg
- + Bạch cầu tăng  $>12$  G/l hoặc giảm  $<4$  G/l, hoặc bạch cầu non tăng  $>10\%$ .

- Nhiễm khuẩn huyết (sepsis): là hội chứng đáp ứng viêm của cơ thể đối với nhiễm trùng.

- Nhiễm khuẩn huyết nặng (Severe sepsis): Tình trạng nhiễm khuẩn huyết gây tổn thương các tạng và rối loạn nhiều chức năng (hô hấp, thần kinh, tim mạch, gan, đông máu, thận), tỷ lệ tử vong khoảng 20%. Tình trạng này có thể tiến triển thành sốc nhiễm khuẩn.

**Bảng 1.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán NKH theo đồng thuận quốc tế lần thứ 2**

<b>Nghi ngờ hoặc có bằng chứng nhiễm khuẩn, và một vài dấu hiệu sau:</b>
<b>Dấu hiệu chung:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Sốt hoặc hạ nhiệt độ</li> <li>+ Nhịp tim nhanh</li> <li>+ Thở nhanh</li> <li>+ Thay đổi ý thức</li> <li>+ Tăng đường máu không giải thích được</li> </ul>
<b>Dấu hiệu viêm:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Tăng bạch cầu hoặc giảm bạch cầu ngoại vi</li> <li>+ CRP huyết tương &gt; 2 lần so với giá trị bình thường</li> <li>+ PCT huyết tương &gt; 2 lần so với giá trị bình thường</li> </ul>
<b>Các biểu hiện tưới máu mô:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Tăng lactat máu không rõ nguyên nhân</li> <li>+ Chậm đầy mao mạch hoặc ấn lõm da chậm hồi phục</li> </ul>
<b>Biểu hiện suy tạng:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Thiếu oxy máu động mạch (<math>PaO_2/FiO_2 &lt; 300</math>)</li> <li>+ Thiếu niệu cấp tính</li> <li>+ Rối loạn đông máu</li> <li>+ Giảm nhu động ruột</li> <li>+ Giảm tiểu cầu</li> <li>+ Tăng Bilirubin máu (Bilirubin toàn phần &gt; 70 mmol/L)</li> </ul>

- Sốc nhiễm khuẩn: được định nghĩa là “tụt huyết áp dai dẳng khó trị dù cho được truyền dịch thích hợp”, tỷ lệ tử vong cao trên dưới 50%.

Năm 2001, các định nghĩa này được chỉnh lý lại bởi một nhóm chuyên gia. Nhóm này nhận thấy các định nghĩa năm 1991 có những hạn chế:

- SIRS quá nhạy và kém đặc hiệu.

- Mặc dù đã phổ biến rộng rãi bản danh sách các tiêu chuẩn chẩn đoán nhưng không đưa ra được các thay đổi vì thiếu các bằng chứng hỗ trợ.

Nhận ra hạn chế của Sepsis-1, Hội nghị lần thứ 2 năm 2001 đã chuyển các tiêu chuẩn SIRS thành danh sách bao gồm các dấu hiệu có thể có của đáp ứng viêm toàn thân với nhiễm khuẩn (Sepsis-2) [21].

**Bảng 1.2. Thay đổi khái niệm về nhiễm khuẩn huyết**

Sepsis 1(1991)[20]	Sepsis 2 (2001)[21]	Sepsis 3 (2016)[1]
<b>Đáp ứng viêm hệ thống:</b> Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): biểu hiện đa dạng với các triệu chứng sau: thân nhiệt > 38°C hoặc < 36°C; nhịp tim > 90 lần/phút; nhịp thở > 20 lần/phút hoặc PaCO <sub>2</sub> < 32 mmHg; và bạch cầu trong máu > 12 G/L hoặc < 4 G/L hoặc > 10% bạch cầu non trong máu ngoại vi.	<b>Nhiễm khuẩn:</b> nghi ngờ hoặc ghi nhận nhiễm khuẩn. <b>Biểu hiện chung:</b> Sốt (thân nhiệt > 38,3°C) hoặc hạ thân nhiệt < 36°C; nhịp tim > 90 lần/phút hoặc > 2SD giá trị bình thường theo tuổi; nhịp thở > 20 lần/phút; thay đổi ý thức; phù hoặc mất cân bằng dịch hoặc cân bằng dịch dương > 20ml/kg/24 giờ; tăng đường máu > 7,7 mmol/kg với những bệnh nhân không có tiểu đường.	<b>Định nghĩa:</b> Nhiễm khuẩn huyết là bệnh lý ảnh hưởng đến tính mạng do suy giảm chức năng cơ quan gây ra bởi mất điều hòa giữa đáp ứng của cơ thể vật chủ với nhiễm trùng. <b>Tiêu chuẩn lâm sàng chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết (Sepsis):</b> nghi ngờ hoặc ghi nhận tình trạng nhiễm trùng và điểm SOFA tăng trên hoặc bằng 2 điểm (bảng 1.3).
Nhiễm khuẩn huyết (Sepsis) là đáp ứng hệ thống hệ thống với nhiễm trùng được biểu hiện với ít nhất 2 biểu hiện trong hội chứng đáp ứng viêm hệ thống với nhiễm trùng.	<b>Đáp ứng viêm</b> Tăng bạch cầu > 12 G/L; hạ bạch cầu < 4 G/L; hoặc bạch cầu non > 10% máu ngoại vi; nồng độ CRP huyết thanh > 2SD giá trị bình thường và procalcitonin huyết thanh > 2SD giá trị bình thường	Các khuyến cáo cho phép cân nhắc sử dụng qSOFA (quick SOFA) ở những bệnh nhân có nhiễm trùng mới mà trước đó chưa có biểu hiện nhiễm trùng. <b>Tiêu chuẩn qSOFA gồm:</b> Thay đổi ý thức (GSC < 15đ); Huyết áp tối đa < 100 mmHg; Nhịp thở > 22 lần/phút
<b>Nhiễm khuẩn huyết nặng (severe sepsis)</b> là nhiễm khuẩn huyết kết hợp với suy chức năng các cơ quan, giảm tưới máu tổ chức hoặc tụt huyết áp, giảm tưới máu mô và rối loạn tưới máu tổ chức có thể bao gồm toan lactic, thiếu niệu, hoặc rối loạn ý thức.	<b>Đánh giá huyết động:</b> hạ huyết áp động mạch (huyết áp tối đa < 90 mmHg, huyết áp trung bình < 70 mmHg, hoặc huyết áp tối đa giảm > 40 mmHg ở người lớn hoặc giảm < 2SD theo tuổi, nồng độ Oxy trộn tĩnh mạch > 70%, chỉ số tim > 3,5l/phút/m <sup>2</sup> da)	<b>Sốc nhiễm khuẩn</b> được định nghĩa là dưới nhóm của nhiễm khuẩn huyết với biểu hiện của suy tuần hoàn và rối loạn chuyển hóa mức tế bào đến mức làm tăng tỷ lệ tử vong.
<b>Sốc nhiễm khuẩn (septic shock):</b> nhiễm khuẩn huyết gây nên tụt huyết áp mặc dù đã bù đủ dịch với biểu hiện của rối loạn tưới máu tổ chức gồm toan lactic, thiếu niệu, hoặc rối loạn ý thức. Những bệnh nhân phải dùng thuốc vận mạch có thể chưa có tụt huyết áp nhưng có rối loạn tưới máu tổ chức.	<b>Đánh giá suy chức năng cơ quan.</b> Oxy hóa máu (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 300); suy thận cấp (nước tiểu < 0,5 ml/kg/giờ hoặc creatinine tăng ≥ 44,2 μmol/L; rối loạn đông máu (INR > 1,5 hoặc Prothronbin time 60 s); liệt ruột (mất nhu động ruột); giảm tiểu cầu (tiểu cầu < 100 G/L); tăng Bilirubin (bilirubin TP > 70 mmol/L) <b>Giảm tưới máu mô:</b> tăng lactat máu (> 3mmol/l); giảm độ đàn hồi mao mạch hoặc tím tái.	<b>Sốc nhiễm khuẩn</b> được xác định với những tiêu chuẩn lâm sàng của nhiễm khuẩn huyết và có tụt huyết áp cần sử dụng thuốc vận mạch để duy trì huyết áp trung bình ≥ 65 mmHg và lactat > 2 mmol/L mặc dù đã được bù đủ dịch.

Trong hơn 2 thập kỷ qua, đã có nhiều tiến bộ trong hiểu biết về cơ chế bệnh sinh của NKH, đồng thời có sự phát triển vượt bậc trong lĩnh vực hồi sức cấp cứu. Cùng với đó, các nhà lâm sàng đã chỉ ra nhiều hạn chế khi sử dụng tiêu chuẩn về hội chứng đáp ứng viêm hệ thống trong thực hành lâm sàng. Năm 2016, NKH được định nghĩa là sự rối loạn chức năng các tạng do

đáp ứng không kiểm soát được của vật chủ với nhiễm trùng (Sepsis-3)[1]. Theo đó, khái niệm về đáp ứng viêm hệ thống không còn được sử dụng, thay vào đó là khái niệm về rối loạn chức năng tạng và được đánh giá bằng sự gia tăng của ít nhất 2 điểm SOFA so với trước khi có nhiễm trùng. Điểm SOFA cơ bản có thể được đánh giá là 0 ở những bệnh nhân không có suy tạng trước đó. Thời điểm tính điểm SOFA là khoảng thời gian cửa sổ tính từ 48 giờ trước đến 24 giờ sau so với thời điểm khi xuất hiện nhiễm khuẩn, cũng như từng ngày sau đó. Điểm SOFA  $\geq 2$  phản ánh nguy cơ tử vong tổng thể khoảng 10% ở các bệnh nhân có nghi ngờ nhiễm khuẩn [1].

Sốc nhiễm khuẩn là một dưới nhóm của NKH có tình trạng bất thường nặng nề về tuần hoàn và chuyển hóa tế bào, do đó, SNK được định nghĩa là NKH có tụt huyết áp kéo dài đòi hỏi cần thuốc vận mạch để duy trì huyết áp động mạch trung bình  $\geq 65$  mmHg và nồng độ lactat trong máu  $> 2$ mmol/L (18mg/dL) mặc dù đã được bồi phụ đủ dịch[1].

**Bảng 1.3. Bảng điểm SOFA đánh giá suy chức năng tạng**

Điểm	0	1	2	3	4
<b>Hô hấp</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	$\geq 400$	$<400$	$<300$	$<200$ (thở máy)	$< 100$ (thở máy)
<b>Đông máu</b> Tiểu cầu (G/l)	$\geq 150$	$<150$	$<100$	$<50$	$< 20$
<b>Gan</b> (Bilirubin) ( $\mu$ mol/l)	$< 20$	20 – 32	33 – 101	102 - 204	$>204$
<b>Tim mạch</b>	MAP $\geq 70$	MAP $<$ 70	Dopamine $<$ 5 hoặc Dobutamine liều bất kỳ	Dopamine 5.1-15 hoặc epinephrine $\leq$ 0.1 hoặc norepinephrine $\leq$ 0.1	Dopamine $>$ 15 hoặc epinephrine $>$ 0.1 hoặc norepinephrine $>$ 0.1
<b>Thần kinh</b> Glasgow(điểm)	15	13-14	10-12	6-9	$<$ 6
<b>Thận</b> Creatinin( $\mu$ mol/l) Nước tiểu(ml/24h)	$< 110$	110-170	171-299	300–440  $<$ 500	$>$ 440  $<$ 200

Nguồn: theo Singer M (2016) [1]

### 1.1.2. Căn nguyên, ổ nhiễm khuẩn tiên phát và yếu tố nguy cơ

### *1.1.2.1. Căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết*

Các tác nhân gây bệnh khác nhau đáng kể theo vùng, quy mô bệnh viện, mùa, và khoa điều trị. Chỉ có khoảng một nửa ca NKH xác định được căn nguyên gây bệnh[22], trong đó căn nguyên vi khuẩn chiếm khoảng 90% các căn nguyên được phát hiện [23]. Nghiên cứu ở 75 nước với 14.000 bệnh nhân ICU bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cho thấy trong số những ca có kết quả cấy máu dương tính, vi khuẩn gram âm chiếm 62%, vi khuẩn gram dương chiếm 47% và nấm chiếm 19%[22], trong đó, *E. coli* vẫn là căn nguyên phổ biến nhất gây NKH[24].

### *1.1.2.2. Ổ nhiễm khuẩn tiên phát*

Đa số bệnh nhân NKH xác định được ổ nhiễm khuẩn tiên phát[10],[23]. Các nghiên cứu thường có xu hướng thống nhất về ổ nhiễm khuẩn tiên phát của nhiễm khuẩn huyết[25],[26]. Trong nghiên cứu SOAP, đường hô hấp chiếm 60%; đường máu chiếm 20%; ổ bụng 26%; da 14%; và hệ tiết niệu 12%[25]. Tuy nhiên, vẫn còn tới 20% đến 30% số bệnh nhân không tìm được nguồn nhiễm trùng xác định[27], điều này gây khó khăn cho việc dự đoán tác nhân gây bệnh và lựa chọn kháng sinh ban đầu, ảnh hưởng đến kết quả điều trị bệnh nhân.

### *1.1.2.3. Yếu tố nguy cơ*

Nhiễm khuẩn huyết thường xảy ra ở những bệnh nhân trung niên và lớn tuổi [27]. Giới tính nam mắc NKH cao hơn so với giới tính nữ [28]. Hơn một nửa số bệnh nhân bị NKH nặng cũng bị mắc ít nhất một bệnh mạn tính như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, ung thư, bệnh thận, viêm gan mạn tính và đái tháo đường[28].

### **1.1.3. Cơ chế bệnh sinh của nhiễm khuẩn huyết**

NKH là hội chứng bao gồm các đáp ứng sinh lý qua trung gian miễn dịch đối với tác nhân nhiễm trùng. Những dấu hiệu lâm sàng như sốt, nhịp tim nhanh, và hạ huyết áp thường gặp nhưng diễn biến lâm sàng tùy thuộc vào

loại và sự đề kháng của vi sinh vật gây bệnh, vị trí và kích thước của tổn thương nhiễm trùng, và các đặc điểm miễn dịch di truyền hoặc mắc phải của vật chủ.

#### *1.1.3.1. Đáp ứng ban đầu của cơ thể với mầm bệnh*

Căn nguyên xâm nhập và sống sót được thúc đẩy bởi tình trạng tổn thương mô (phẫu thuật hay chấn thương), dị vật (ống thông), và tình trạng hệ thống miễn dịch của cơ thể (ức chế miễn dịch).

Khi vi sinh vật xâm nhập vào cơ thể, đáp ứng đầu tiên của cơ thể là nhận diện và gắn vào các thành phần của vi khuẩn[29].

Hệ miễn dịch bẩm sinh được kích hoạt bởi các sản phẩm vách tế bào vi khuẩn, như lipopolysaccharide, gắn với các thụ thể của vật chủ, bao gồm thụ thể nhận dạng (thụ thể tiếp nhận dạng chuông) (Toll like receptor)[30], [31]. Các thụ thể này có nhiều trên bạch cầu và đại thực bào, và một số có trên tế bào nội mô[32]. Có ít nhất 10 TLR được mô tả ở người. Chúng có tính đặc hiệu đối với các dấu ấn hoặc sản phẩm bề mặt của các vi khuẩn, nấm hoặc vi-rút khác nhau. Peptidoglycan củavi khuẩn gram dương gắn vào TLR – 2, trong khi đó lipopolysaccharide của vi khuẩn Gram âm gắn vào TLR – 4 trên bề mặt tế bào miễn dịch vật chủ. Đa hình di truyền liên quan đến khả năng sóc do vi khuẩn gram âm[33].

Tham gia quá trình này gồm có các tế bào miễn dịch tự nhiên như tế bào biểu mô, tế bào nội mạch. Quá trình này diễn ra theo nhiều cách, trong đó con đường liên quan đến Toll - like receptors (TLRs) được hiểu rõ nhất.

Sự gắn của thụ thể trên bề mặt tế bào miễn dịch với những thành phần của vi khuẩn gây ra nhiều ảnh hưởng sau:

- Sự gắn của những TLR dẫn đến dòng thác tín hiệu thông qua hoạt hóa yếu tố NF-kb bào tương (cytosolic nuclear factor-kb (NF-kb)). NF-kb đã hoạt hóa sẽ di chuyển từ bào tương vào trong nhân tế bào, gắn vào vị trí sao chép,

và dẫn đến hoạt hóa một vùng gene lớn tham gia đáp ứng viêm của vật chủ như các cytokine tiền viêm (TNF, IL-1) và nitric oxide (NO).

- Các bạch cầu đa nhân trở nên hoạt hóa và di chuyển tới vùng bị tổn thương. Sự giải phóng các chất trung gian bởi bạch cầu đa nhân tại vị trí nhiễm trùng gây ra những dấu hiệu viêm tại chỗ: nóng và đỏ do sự giãn mạch và sung huyết, và phù do thoát protein hậu quả của tăng tính thấm của mao mạch.

- Quá trình này được điều chỉnh bởi kết hợp giữa các chất trung gian trợ viêm (TNF $\alpha$ , IL-1) và các chất trung gian kháng viêm (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, ...) được giải phóng bởi các đại thực bào vốn dĩ được hoạt hóa bởi sự xâm nhập của vi khuẩn.

#### *1.1.3.2. Hoạt hóa đáp ứng miễn dịch viêm và chống viêm*

Hoạt hóa hệ miễn dịch bẩm sinh dẫn đến chuỗi đáp ứng tế bào và thể dịch phức tạp, mỗi chuỗi có các bước khuếch đại:[34]

Các cytokine tiền viêm như yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF- $\alpha$ ) và interleukin 1 và 6 được giải phóng, lần lượt kích hoạt tế bào miễn dịch. Các chất oxy hóa, nitric oxide (NO), protease, và các phân tử tạo lỗ được giải phóng, làm tiêu diệt vi khuẩn.

NO gây giãn mạch và làm tăng tính thấm mao mạch, và có liên quan đến rối loạn chức năng ti lạp thể do NKH[35].

Hệ thống bổ thể được hoạt hóa, và làm trung gian kích hoạt các bạch cầu, thu hút chúng đến vị trí nhiễm trùng để chúng có thể tấn công trực tiếp vi sinh vật (thực bào, tế bào lympho T gây độc), nhận biết nó để các tế bào khác tấn công (tế bào trình diện kháng nguyên, tế bào lympho B), ‘ghi nhớ’ nó trong trường hợp nhiễm trùng sau này (tế bào ghi nhớ, tế bào lympho B), tăng cường sản xuất và hóa hướng động của nhiều tế bào T hỗ trợ hơn[36].

#### *1.1.3.3. Hệ thống nội mô và đông máu*

Nội mô mạch máu đóng vai trò chính trong cơ chế tự vệ của vật chủ đối với vi sinh vật xâm nhập, mà còn trong sự tiến triển của sepsis. Trên thực tế,

các tế bào nội mô ở trạng thái cân bằng động với vô số chất trung gian gây viêm và các yếu tố của hệ thống miễn dịch và đông máu bẩm sinh để điều phối phản ứng của vật chủ trong nhiễm trùng huyết. Chức năng rào cản của bề mặt nội mô hầu như bị suy giảm đồng đều trong sốc nhiễm trùng, và điều này có khả năng góp phần vào các kết quả bất lợi [37]. Nội mô được hoạt hóa không chỉ cho phép kết dính và di tản các tế bào miễn dịch được kích thích, mà còn giúp cho các phân tử lớn như protein dễ dàng chui qua, gây phù nề mô.

Nhiễm trùng huyết nặng hầu như luôn liên quan đến rối loạn đông máu mà phổ biến nhất là đông máu nội mạch rải rác [38]. Các thụ thể được kích hoạt bởi protease (PARs) tạo thành phân tử liên kết giữa đông máu và viêm [38]. Các thay đổi trong hệ thống đông máu bao gồm tăng yếu tố tăng đông, như yếu tố ức chế kích hoạt plasminogen loại I và yếu tố mô, và giảm nồng độ các chất chống đông tự nhiên trong vòng tuần hoàn, bao gồm antithrombin III và protein C hoạt hóa, cũng đóng vai trò kháng viêm và điều hòa tín hiệu viêm [39].

#### *1.1.3.4. Đáp ứng viêm và rối loạn chức năng cơ quan*

NKH làm giảm tương đối và tuyệt đối thể tích tuần hoàn thông qua giãn mạch (làm giảm sức cản tuần hoàn hệ thống) và tăng tính thấm mao mạch (gây thoát quản huyết tương).

Một số yếu tố kết hợp gây nhiều rối loạn chức năng cơ quan. Giảm thể tích tuần hoàn tương đối và tuyệt đối kết hợp với giảm co bóp thất trái, dẫn đến hạ huyết áp. Ban đầu, thông qua tăng nhịp tim, cung lượng tim tăng để bù lại và duy trì áp lực tưới máu, nhưng do cơ chế bù này trở nên kiệt sức sẽ xảy ra giảm tưới máu và sốc nhiễm khuẩn.

Phù quanh mao mạch làm nặng thêm rối loạn vận chuyển oxy tới các mô. Điều này có nghĩa là oxy phải khuếch tán qua một khoảng cách lớn hơn



để đến được các tế bào đích. Đường kính mao mạch giảm do phù thành mạch và tình trạng tăng đông dẫn đến hình thành các vi huyết khối trong mao mạch.

Các yếu tố góp phần gây bệnh khác bao gồm rối loạn lưu lượng máu qua giường mao mạch, do kết hợp shunt qua các kênh bàng hệ và tăng độ nhớt máu thứ phát do mất độ linh hoạt của hồng cầu[40]. Kết quả là các cơ quan bị thiếu oxy, cho dù lưu lượng máu toàn bộ đến cơ quan có thể tăng. Những bất thường này có thể dẫn đến nhiễm toan lactic, rối loạn chức năng tế bào, và suy đa tạng[41].

Mức năng lượng tế bào giảm do hoạt động chuyển hóa bắt đầu vượt quá khả năng sản xuất. Tuy nhiên, chết tế bào có vẻ không thường gặp trong NKH, cho thấy rằng tế bào ngừng hoạt động như là một phần đáp ứng toàn thân. Điều này có thể giải thích tại sao chỉ thấy một số khá ít các thay đổi mô học khi mổ tử thi, và tình trạng cải thiện các triệu chứng nặng như vô niệu và hạ huyết áp, sau khi viêm toàn thân được cải thiện[42].

#### ***1.1.4. Vai trò các dấu ấn sinh học trong nhiễm khuẩn huyết***

Những hạn chế của phương pháp cấy máu đã thúc đẩy các nhà nghiên cứu phát triển các xét nghiệm nhằm bổ trợ và thay thế phương pháp cấy máu. Do vậy các xét nghiệm về chỉ dấu sinh học như CRP, PCT, các interleukin (IL) như IL-6, IL-8,... đã trở thành đối tượng được quan tâm và có nhiều nghiên cứu đánh giá tính hữu ích của chúng đối với lâm sàng.

##### ***1.1.4.1. Protein C phản ứng***

Năm 1930, Tillet và Francis lần đầu tiên phát hiện protein C phản ứng (CRP) trong huyết thanh của BN viêm phổi thùy do *S.pneumoniae* có phản ứng viêm cấp với kháng thể carbohydrate "c". CRP là một protein hình thành trong pha cấp, được tổng hợp chủ yếu trong tế bào gan và đại thực bào của phế nang. CRP đóng vai trò trong cơ chế điều hòa miễn dịch của cơ thể thông qua điều chỉnh bổ thể, điều chỉnh quá trình opsonin hóa và thực bào. Nồng độ CRP cũng được ghi nhận là tăng trong một loạt các bệnh cảnh không liên quan đến nhiễm trùng như nhồi máu cơ tim,

bệnh lý khớp. Do vậy, CRP khó có khả năng phân biệt được một phản viêm do nhiễm khuẩn hay viêm vô khuẩn [43].

#### *1.1.4.2. Pro-calcitonin*

Ở người khỏe mạnh, PCT được sản xuất từ tế bào C của tuyến giáp, từ gen CALC-1 nằm trên nhiễm sắc thể số 11. Sản phẩm mRNA được gọi là tiền hormone của calcitonin, dài 116 acid amin. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, mức PCT tăng lên nhanh chóng trong khoảng từ 2-6 giờ, đạt đỉnh trong vòng 6-24 giờ sau khi nhiễm khuẩn. PCT là một dấu ấn sinh học đã được chứng minh thành công trên lâm sàng trong việc xác định sự hiện diện của NKH và được chứng minh có mối tương quan với mức độ của tình trạng nhiễm khuẩn. PCT không chỉ đặc hiệu cho chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết mà còn có thể tăng trong nhiều bệnh khác nhau như viêm phổi, nhiễm trùng ổ bụng, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm khuẩn màng não...[44]. Theo Ni và cộng sự, PCT có khả năng vừa phải để xác định nhiễm trùng đường hô hấp do vi khuẩn trong đợt cấp của bệnh phổi mạn tính tắc nghẽn, nhưng không có giá trị chẩn đoán cao trên bệnh nhân nhập viện tại các ICU [45]. PCT còn được sử dụng trong chẩn đoán các nhiễm trùng ổ bụng sau phẫu thuật đại trực tràng [46]. Nghiên cứu của Schuetz, P và cộng sự. (2012) về sử dụng PCT để hướng dẫn sử dụng kháng sinh trên nhóm bệnh nhân nhập viện vì cơn hen kịch phát cấp tính nặng cho thấy có giảm việc kê đơn kháng sinh nhưng không có sự khác biệt đáng kể về khả năng hồi phục lâm sàng, thời gian nằm viện hoặc kết quả xét nghiệm đo chức năng hô hấp ở cả hai nhóm [47]. Gần đây, nồng độ PCT được quan sát thấy có thể tăng trong ung thư có di căn. Nghiên cứu của Aziz, S.A và cộng sự thấy ngay cả khi không có NKH, nồng độ PCT cũng cao hơn đáng kể ở những bệnh nhân có khối u di căn so với những người không có [0,25 ng/mL (0,07–1,76) so với 0,09 ng/mL (0,03–0,54);  $p < 0,001$ ][48]. Do đó, kết quả cho thấy khối u di căn ảnh hưởng đến mức procalcitonin của bệnh nhân, ngay cả khi không có nhiễm trùng huyết. Mặt khác, ngay cả khi PCT có

thể hữu ích cho chẩn đoán thì vẫn chưa xác định được một điểm cắt chung cho các bệnh lý khác nhau. Theo Aziz, S.A., và cộng sự, điểm cắt xác định của PCT để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết là 1,14ng/ml[48]. Trong khi theo khuyến cáo của nhà sản xuất, nồng độ PCT lớn hơn bằng 2ng/ml nguy cơ nhiễm khuẩn huyết, nếu PCT lớn hơn và bằng 10ng/ml thì nguy cơ xảy ra sốc nhiễm khuẩn. Vì những lý do trên, PCT đã được đưa vào hướng dẫn chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết và thực hành lâm sàng ở các đơn vị chăm sóc đặc biệt [3] nhưng các nghiên cứu sau đó đã rút lại khuyến cáo này ở Sepsis-3[1]. Vì vậy, nhiều chuyên gia khuyến cáo rằng nên sử dụng PCT như một phương pháp hỗ trợ chẩn đoán kết hợp với các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân NKH.

#### 1.1.4.3. Interleukin

Sự giải phóng các cytokine gây viêm như yếu tố hoại tử u (TNF- $\alpha$ ), IL-1b, IL-8 và IL-6 để đáp ứng với các tác nhân gây bệnh và tổn thương ở vật chủ dẫn đến hội chứng đáp ứng viêm hệ thống (SIRS). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng yếu tố IL-6 được sản xuất bởi TNF- $\alpha$  và có thể đo đặc chính xác trong máu, có thời gian bán thải dài [49]. IL-6 là chất trung gian hóa học đóng vai trò quan trọng trong SNK, dùng để dự đoán mức độ nghiêm trọng cũng như kết cục lâm sàng của bệnh cảnh này [50]. Tuy nhiên, nó không đặc hiệu riêng cho tình trạng nhiễm trùng. Nhiều nghiên cứu khác đã nhận thấy IL-6 tăng cao trong nhiều bệnh cảnh khác nhau như trong chấn thương, viêm tụy cấp.... Do vậy, IL-6 chủ yếu đóng vai trò như là một yếu tố dự đoán sớm về kết cục như rối loạn chức năng các tạng trong bệnh cảnh NKH.

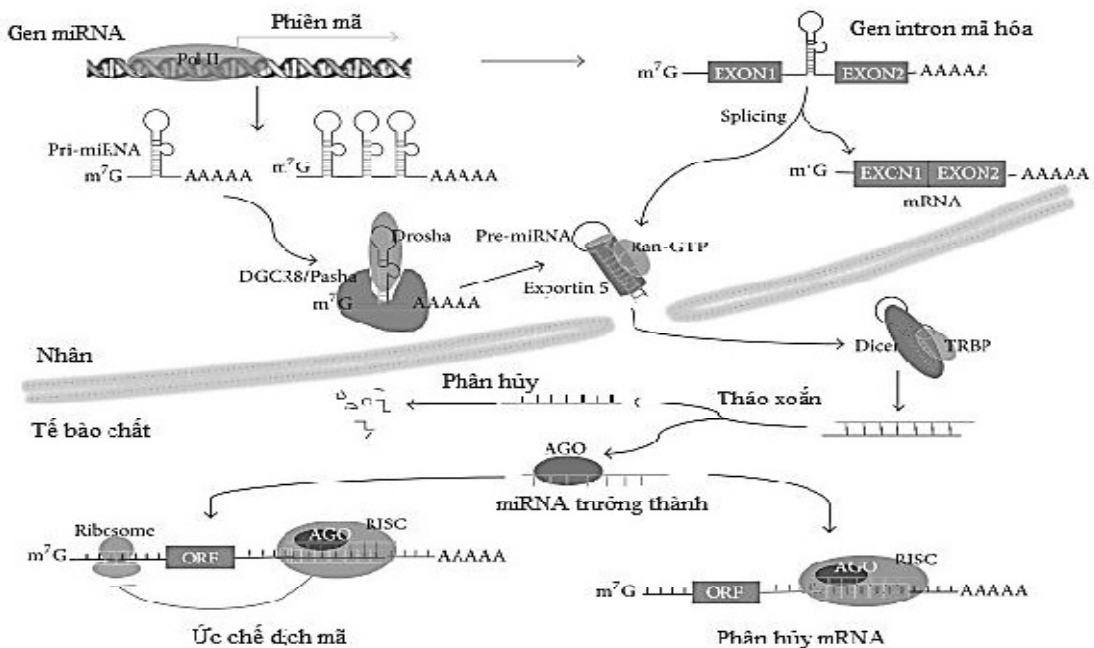
### 1.2. miRNA và vai trò của một số miRNA trong NKH

miRNA được phát hiện ra lần đầu tiên vào năm 1993 thông qua các phân tích về vị trí *lin-4* ở giun tròn *Caenorhabditis elegans* [51]. miRNA là những đoạn RNA ngắn khoảng từ 19 –24 nucleotit, không mã hóa thông tin di truyền nên chúng không tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein. Trong đó, gần 70% miRNA liên quan đến điều tiết quá trình phiên mã tạo ra các RNA thông

tin (RNA), 30% miRNA còn lại chưa được làm rõ chức năng [52]. Thuật ngữ miRNA được đặt bởi Gary Ruvkun năm 2001, và lĩnh vực sinh học miRNA chính thức ra đời [53].

### 1.2.1. Nguồn gốc sinh học của miRNA

Trong nhân tế bào: miRNA được phiên mã bởi RNA polymerase II tạo thành phân tử RNA sơ cấp primary miRNA (pri-miRNA). Về cấu trúc phân tử pri-RNA chứa 1 đến 2 vòng kẹp tóc, các phân tử pri-RNA có đầu 5' được gắn mũ chạp và đầu 3' có cấu trúc dạng poly-A. Sau đó các phân tử pri-miRNA được xử lý tiếp trong nhân để tạo thành các phân tử miRNA thứ cấp là precursor miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA sau xử lý có chiều dài xấp xỉ 70 nucleotide và gấp lại thành cấu trúc vòng thân không hoàn chỉnh (cấu trúc vòng kẹp tóc). Quá trình biến đổi này nhờ sự hỗ trợ của phân tử Drosha, Drosha chỉ hoạt động khi hình thành phức hợp với một phân tử protein dsRBD có tên là Pasha hay DGCR8 (hình 1.1). Pre-miRNA được chuyển ra tế bào chất nhờ phức hợp Exportin-5 thông qua con đường tín hiệu hạt nhân liên kết GTP (Ras-related Nuclear – GTP pathway).



Hình 1.1. Quá trình sinh tổng hợp của miRNA [54]

Trong tế bào chất: pre-miRNA tiếp tục được cắt bởi enzyme DicerRNase III, tạo ra miRNA dạng nhị phân mạch đôi có chiều dài khoảng 21-25 nucleotide. Tiếp theo, miRNA mạch đôi được tháo xoắn, một trong hai mạch sẽ bị phân hủy nhanh chóng, mạch còn lại chính là miRNA trưởng thành, gắn kết với protein Argonaute 2 (Ago2). Sợi đơn miRNA trưởng thành được kết hợp thành phức hợp RISC (RNA-induced silencing complex) để tham gia vào quá trình điều hòa biểu hiện gen thông qua hai cách phân hủy mRNA mục tiêu hay ức chế sự dịch mã.

### ***1.2.2. Cơ chế hoạt động của miRNA ở người***

MiRNA đóng vai trò quan trọng trong các mạng lưới quy định và kiểm soát các quá trình sinh học phức tạp liên quan đến tế bào, thông qua đó kiểm soát đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và thích nghi [55-57].

MiRNA được tổng hợp phổ biến ở rất nhiều loài sinh vật và điều hòa âm tính quá trình biểu hiện gen ở giai đoạn sau phiên mã bằng cách chỉ điểm các ARN thông tin (mRNA) cụ thể cho quá trình phân hủy hoặc ngăn cản quá trình dịch mã từ mRNA. Ngày nay, người ta đã thừa nhận vai trò cơ bản của miRNA trong các quá trình sinh lý và bệnh lý khác nhau, bao gồm quá trình phát triển tế bào gốc, biệt hóa tế bào, phát sinh cơ quan, quá trình sinh trưởng và chết theo chương trình, điều hòa miễn dịch và gây bệnh [52]. Một mRNA cụ thể có thể là đích gắn của nhiều loại miRNA khác nhau và các miRNA này phối hợp cùng điều hòa biểu hiện của gen. Ngoài ra, mỗi một miRNA trưởng thành có thể gắn với nhiều loại mRNA khác nhau. Hiện nay người ta đã biết rằng miRNA hoạt động phối hợp với các yếu tố phiên mã, đóng góp vào sự hình thành mạng lưới điều hòa sau phiên mã, làm giảm sự biến động trong quá trình biểu hiện gen [52].

### ***1.2.3. Đặc tính của miRNA***

miRNA có hai đặc tính chính: tính lưu thông phổ biến và tính bền vững. Các nghiên cứu chỉ ra miRNA có biểu hiện trong mô hoặc các loại dịch tiết của

cơ thể. Ngoài tồn tại trong mô, miRNA được phát hiện lưu thông trong nhiều dịch cơ thể khác nhau như huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, nước bọt và các thành phần dịch khác trong cơ thể như dịch não tủy [58][59].

Ngoài tính lưu thông phổ biến trong các dịch cơ thể, miRNA còn có tính bền vững rất cao như: có khả năng kháng lại hoạt động của enzym RNAase (enzym phân hủy RNA), chịu được điều kiện pH và nhiệt độ không thích hợp như nhiệt độ phòng hay trong điều kiện lưu trữ ở nhiệt độ âm [59].

Những đặc tính này của miRNA rất phù hợp với các đặc tính cần thiết của một chỉ dấu sinh học trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh ở người.

#### **1.2.4. Các kỹ thuật định lượng miRNA**

##### *1.2.4.1. Kỹ thuật phản ứng khuếch đại chuỗi gien định lượng theo thời gian thực (realtime-PCR)*

Kỹ thuật RT- qPCR hiện là tiêu chuẩn vàng để định lượng miRNA và được sử dụng thường xuyên [60]. Nguyên lý chung là tách ARN của các miRNA từ mẫu bệnh phẩm, sau đó tổng hợp thành các DNA bổ sung (cDNA) và cuối cùng là khuếch đại với phiên mã ngược (RT) -PCR để tạo thành các miRNA tương ứng. Trình tự của sản phẩm sau khi khuếch đại được phát hiện và đo lường theo thời gian thực bằng đầu dò huỳnh quang [61].

Có hai hệ thống chính được sử dụng để phát hiện huỳnh quang là công nghệ SYBR Green và Taqman. SYBR Green liên kết DNA sợi đôi và phát huỳnh quang khi chuỗi đích được khuếch đại. Ưu điểm của SYBR Green là không yêu cầu đầu dò riêng biệt cho mỗi miRNA cần định lượng nhưng nhược điểm là giảm tính đặc hiệu của xét nghiệm [62].

Công nghệ Taqman dựa trên một đầu dò được gắn nhãn. Trong phản ứng qPCR, đầu dò được gắn nhãn liên kết với chuỗi mục tiêu. Các môi được ủ và được mở rộng bởi Taq polymerase. Ưu điểm của Taqman là cho kết quả có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, còn nhược điểm là chi phí cao, đặc biệt khi cần định lượng nhiều miRNA [63].

#### *1.2.4.2. Microarray*

Microarray là một kỹ thuật lai tạo sử dụng các đầu dò DNA để định lượng các miRNA cụ thể [60].

Nguyên lý hoạt động chính của microarray là sự lai giữa hai chuỗi ADN, đặc tính của trình tự acid nucleic là bắt cặp bổ sung một cách đặc hiệu với chuỗi còn lại do hình thành liên kết hydro giữa các cặp bazơ nitơ bổ sung. Sau khi rửa các trình tự gắn không đặc hiệu, chỉ có những chuỗi bắt cặp mạnh mẽ sẽ được giữ lại. Các trình tự đích được đánh dấu huỳnh quang gắn với đầu dò cho tín hiệu phụ thuộc vào điều kiện lai (ví dụ như nhiệt độ) và điều kiện rửa sau lai. Độ mạnh của tín hiệu tại một điểm phụ thuộc vào lượng mẫu đích gắn với đầu dò. Microarray sử dụng định lượng tương đối khi mà cường độ của một điểm đặc trưng được so sánh với điểm giống như vậy ở trong điều kiện khác nhau

Một số nền tảng microarray đã được điều chỉnh cho định lượng miRNA, bao gồm GeneChip (Affymetrix), miRCURY LNA (Exiqon) và SurePrint (Agilent). Tất cả các nền tảng đã thiết kế các đầu dò dành riêng trình tự miRNA trưởng thành, nhưng sự khác biệt chính bao gồm quy trình lai và rửa cũng như thuốc nhuộm huỳnh quang.

Ưu điểm: Công nghệ microarray có thể được sử dụng để đo đồng thời nhiều miRNA cùng một lần đo.

Nhược điểm: chi phí cao, độ đặc hiệu thấp, cần được định lượng lại bằng một phương pháp khác như PCR, dữ liệu quá trình chuẩn hóa rất khó và tốn thời gian, và không có phương pháp duy nhất đã được chấp nhận rộng rãi để phân tích dữ liệu microarray.

#### ***1.2.5. Vai trò của miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh ở người***

MiRNA được sản xuất ở ngoài tế bào và có thể dễ dàng tìm thấy trong các chất dịch bên trong cơ thể như máu và nước tiểu. Mức độ biểu hiện của các miRNA lưu hành trong huyết tương ở các điều kiện khác nhau sẽ khác nhau, điều này có thể giúp chẩn đoán được nhiều loại bệnh [64],[ 65]. Năm

2008, Lawrie và cộng sự phát hiện thấy sự có mặt của miRNA trong huyết thanh như một chỉ dấu sinh học tiềm năng và phát hiện ra miRNA có liên quan đến u lympho tế bào B lớn. Ý tưởng đó đã được tiếp tục tìm hiểu trong hàng loạt nghiên cứu với mục tiêu trong chẩn đoán sớm và tiên lượng các thể ung thư ở người[66],[67]. Cho đến nay, miRNA đã được nghiên cứu với vai trò là dấu ấn sinh học trong chẩn đoán và tiên lượng rất nhiều bệnh ở người[68],[69],[70].

Một miRNA có khả năng điều chỉnh nhiều mục tiêu và do đó ảnh hưởng đến một mạng lưới các gen rất lớn (lên đến hàng trăm gen). Mặt khác, nhiều miRNA có thể tác động ảnh hưởng điều tiết lên một gene mã hóa protein. Thông qua đó miRNA điều chỉnh đường dẫn tín hiệu di động khác nhau liên quan đến sự tăng trưởng, tăng sinh, vận động và tồn tại tế bào. Đặc thù này làm cho các miRNA trở thành trung gian quan trọng của hầu hết các sự kiện của tế bào. Các miRNA cũng chịu sự điều chỉnh của cơ chế di truyền ngoại gen, các đột biến trong chất hoạt hóa của nó và các vùng mã hóa đã được hiển thị, tham gia vào cơ chế phát sinh ung thư.

Một số nghiên cứu gần đây đã ghi nhận sự tham gia của miRNA trong sự phát triển và di căn của ung thư đặc biệt là ung thư biểu mô tế bào gan [71]. Ở người, hơn 50% gen mã hóa miRNA nằm trong các khu vực của bộ gen ung thư và thường xuyên tham gia vào các bất thường nhiễm sắc thể, như mất đoạn, lặp đoạn... Điều này chỉ ra rằng chúng có liên quan đến bệnh sinh của ung thư.

Ít nhất hai phần ba số mRNA ở động vật có vú được quy định bởi miRNA, vì lẽ đó, các miRNA được xem như các bản mã không mã hóa tinh vi đóng vai trò quan trọng trong điều chỉnh phản ứng miễn dịch của vật chủ theo thời gian nhiễm. Ví dụ: nhiều miRNA được biết đến với vai trò điều hòa các thụ thể tiếp nhận dạng chuông TLR như TLR-4 trong đáp ứng miễn dịch bẩm sinh vật chủ[11], hoạt hóa và biệt hóa tế bào lympho T[72]. Các chức



năng miễn dịch của miRNA được xem xét toàn diện trong các tế bào khác nhau liên quan với phản ứng của vật chủ đối với nhiễm khuẩn [73]. Những kết quả của những nghiên cứu này làm nổi bật tầm quan trọng của miRNA với quy định biểu hiện gen sau phiên mã qua trung gian nội bào trong đáp ứng miễn dịch của động vật có vú với nhiễm trùng [74]. Trên cơ sở đó, các nhà khoa học đã nghiên cứu miRNA ở các bệnh lý truyền nhiễm [75].

Mức độ biểu hiện của một số miRNA được nghiên cứu cho thấy có sự thay đổi ở người bình thường so với người nhiễm vi rút như: HBV, HCV, bệnh tay- chân- miệng [76], cúm A [77], [78], bệnh thủy đậu [79] ... hoặc nhiễm lao, nhiễm các vi khuẩn khác... [80].

Gần đây, một số miRNA đã được ghi nhận có biểu hiện trong huyết thanh bệnh nhân viêm gan do vi- rút B mạn tính tăng cao hơn so với người khỏe mạnh. Các miRNA được ghi nhận gồm: miRNA-375, miRNA-92A, miRNA-10a, miRNA-423, miRNA-23b/a, miRNA-342-3p, miRNA-99A, miRNA-122a, miRNA-125b, miRNA-150. Ngoài ra, các miRNA còn được nghiên cứu trong chẩn đoán phân biệt bệnh nhân viêm gan B mạn tính do vi- rút viêm gan B với xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan có nhiễm vi rút viêm gan B [59]. Tương tự như vậy, Peng và cộng sự đã xác định được 38 miRNA quy định các đáp ứng miễn dịch kiểm soát gen mục tiêu cũng như nhắm vào hệ gen của vi rút viêm gan C. Mức độ biểu hiện của các miRNA-130a/b, miRNA-200, miRNA-34a, miRNA-23b, miRNA-24, miRNA-381, miRNA-25, miRNA--371-5p) thay đổi liên quan đến tình trạng nhiễm viêm gan vi- rút C và giai đoạn của bệnh [59].

Trong lĩnh vực bệnh lý nhiễm khuẩn, các miRNA cũng được tìm hiểu và bước đầu có những kết quả đáng lưu ý. Nghiên cứu thực nghiệm trên chuột được gây nhiễm trùng do *Citrobacter rodentium*, *Salmonella typhi* và *Listeria monocytogenes* thấy mức độ biểu hiện miRNA-155 giảm so với chuột bình thường [81].

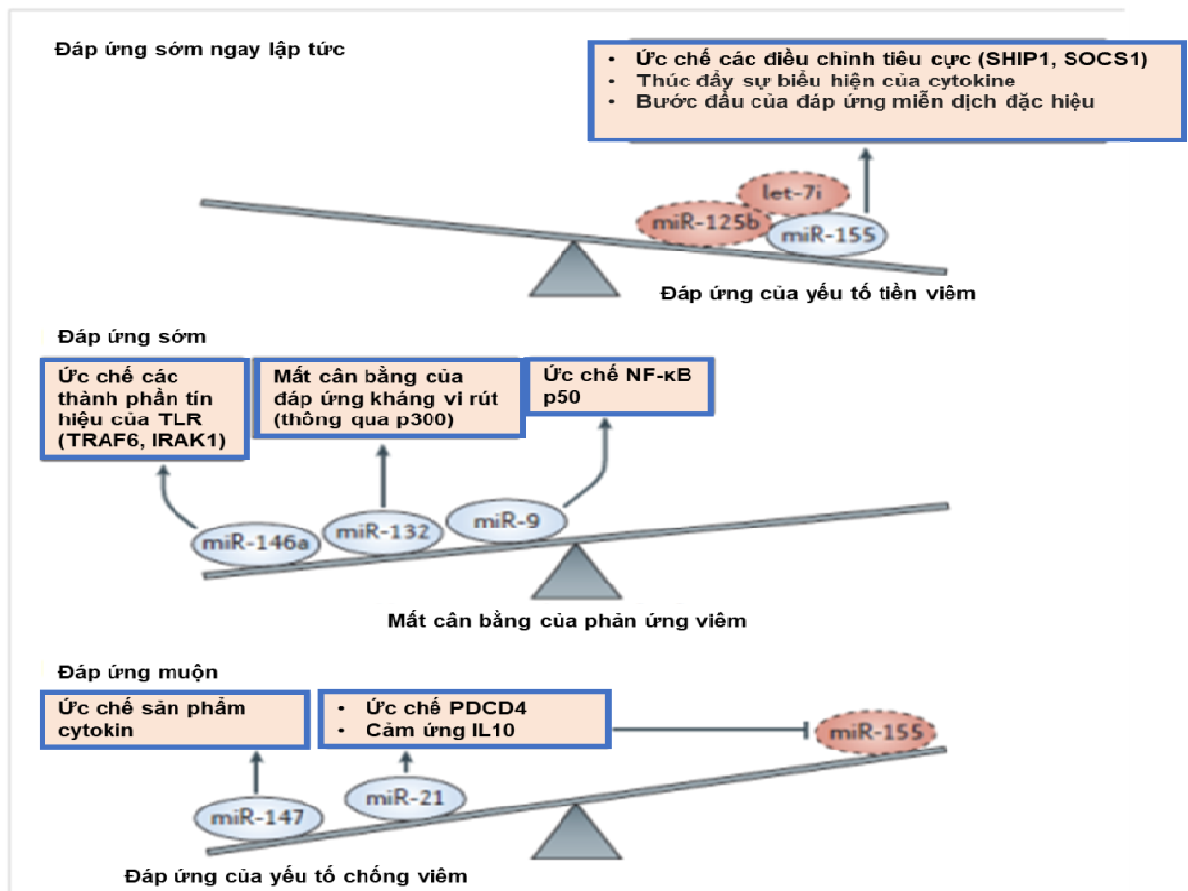
MiRNA-146 có biểu hiện tăng lên trong các tế bào miễn dịch sau khi hoạt hóa bởi các vi khuẩn gây bệnh. Trong bệnh lao, kết quả thực nghiệm cũng cho thấy, các thành viên của họ miRNA-146 có mức độ biểu hiện khác biệt trong nhân tế bào đại thực bào đơn nhân bị nhiễm *Mycobacterium tuberculosis* và nhiễm phức hợp *M.bovis* so với người không nhiễm lao[80].

### **1.2.6. Vai trò của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

Nhiễm khuẩn huyết là rối loạn chức năng cơ quan nghiêm trọng đe dọa tính mạng do đáp ứng không được điều phối của cơ thể đối với tác nhân nhiễm trùng [1]. Nhiễm khuẩn huyết có liên quan đến phản ứng viêm quá mức kèm theo sự gia tăng của các yếu tố gây viêm. Đường truyền tín hiệu trung gian của thụ thể tiếp nhận dạng chuông (TLR) đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của nhiễm khuẩn huyết và sốc nhiễm khuẩn[82]. Khi gắn với TLRs sẽ kích hoạt con đường truyền tín hiệu trong tế bào dẫn đến hoạt hoá NF- $\kappa$ B bào tương. NF- $\kappa$ B được hoạt hoá di chuyển từ bào tương vào nhân gắn vào vị trí khởi phát sao chép và tăng sự sao chép những cytokin như: TNF- $\alpha$ , IL-6 và IL-10. TNF- $\alpha$ , IL-6 là những cytokin trợ viêm làm hoạt hoá đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và gây tổn thương trực tiếp hoặc gián tiếp cơ thể. IL-10 là cytokin kháng viêm, có vai trò bất hoạt đại thực bào và nhiều hiệu quả kháng viêm khác trong nhiễm khuẩn huyết [83]. Các miRNA có vai trò điều chỉnh tổng hợp các thụ thể tiếp nhận dạng chuông TLRs và hoạt động của NF- $\kappa$ B, thông qua đó kiểm soát tình trạng mất cân bằng viêm trong nhiễm khuẩn huyết. Việc kích hoạt các tế bào gây nhiễm qua các TLR làm hoạt hóa các miRNA, sau đó điều chỉnh các thành phần tín hiệu TLR khác nhau, ví dụ như cơ chế phản hồi lặp âm tính[84], [11].

Các miRNA-125b, let-7i, miRNA-155 thông qua ức chế các phản ứng âm tính, tăng khởi phát và sao chép các cytokine của đáp ứng tiền viêm, thực hiện giai đoạn đầu của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu- giai đoạn đáp ứng viêm tại chỗ. Các miRNA-146a, miRNA-132, miRNA-9 khởi phát đáp ứng viêm sớm thông qua ức chế các thành phần của con đường truyền tín hiệu thụ thể

nhận dạng TLR, ức chế hoạt hóa NF- $\kappa$ B bào tương (cytosolic nuclear factor  $\kappa$ B), ngăn ngừa khởi phát và sao chép các cytokine gây viêm, dẫn đến mất cân bằng phản ứng viêm ở giai đoạn đáp ứng viêm sớm. Mức độ biểu hiện của miRNA let-7i và miRNA-125b giảm có thể góp phần vào hiệu ứng này do thiếu sự ức chế các mục tiêu tương ứng của chúng là TLR-4 và yếu tố hoại tử khối u (TNF). Tiếp theo đó, biểu hiện của miR-146a và miR-9 tăng ức chế phản ứng tiền viêm bằng cách nhắm mục tiêu là những thành phần chính của con đường dẫn truyền tín hiệu thụ thể tiếp nhận dạng chuông TLR, yếu tố nhân chuỗi nhẹ kappa tăng hoạt hóa tế bào B(NF- $\kappa$ B) p50, sau đó, miRNA-21 được cảm ứng và làm tăng biểu hiện IL-10 bằng cách ức chế quá trình chết tế bào TCD4 theo chương trình (PDCD4), có thể góp phần gây ra phản ứng chống viêm thông qua việc ức chế miRNA-155. miRNA-147b cũng thúc đẩy phản ứng chống viêm bằng cách ức chế sản xuất cytokine gây viêm.



**Hình 1.2. Vai trò của miRNA ở phản ứng viêm[11]**

Một số miRNA điều chỉnh các cytokine tiền viêm và cải thiện kết quả trong sốc nhiễm khuẩn và nhiễm khuẩn huyết. Sự điều chỉnh miRNA-146a ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết làm tăng nồng độ cytokine viêm IL-6 [84]. Đồng thời, sự gia tăng nồng độ của các cytokine trợ viêm như IL-6, TNF- $\alpha$  cũng làm tăng biểu hiện của miRNA-155 trong NKH [85]. Đồng thời, miRNA-155 tăng làm hoạt hóa đường dẫn truyền tín hiệu Kinase Janus (JAK) –đường dẫn truyền quan trọng để hoạt hóa quá trình tổng hợp một số cytokine và các chất trung gian gây viêm trong NKH[15]. MiRNA-223 ức chế phản ứng viêm thông qua hoạt hóa một số cytokin, được gọi là cytokin kháng viêm, ức chế sự sản xuất TNF- $\alpha$  và IL-6 ở BNNKH[86].

Việc hoạt hóa các đường dẫn của phản ứng tiền viêm, như NF-KB hoặc yếu tố phản ứng tăng trưởng nội mô sớm có thể gây rối loạn nội mô và tổn thương các cơ quan trong NKH[15]. Hơn nữa, sự hoạt hóa của NF- $\kappa$ B trong các tế bào nội mô tác động tới các gien gây tiền viêm, như các gien mã hóa cho các cytokine gây viêm và các phân tử bám dính [23]. MiRNA-146-3p ngăn cản phản ứng rối loạn nội mô bằng cách ức chế tổng hợp protein liên kết RNA (HuR)- protein có vai trò thúc đẩy hoạt động nội mô[87]. MiRNA-147b cải thiện chức năng nội mô giúp tăng tính thấm thấu nội mô khi bị nhiễm trùng và nhiễm khuẩn huyết, do đó ngăn ngừa rối loạn chức năng nội mô trong nhiễm khuẩn huyết[88].

### ***1.2.7. Các nghiên cứu về miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết***

Nhiễm khuẩn huyết là phản ứng viêm quá mức của cơ thể với nhiễm trùng đe dọa đến tính mạng kèm theo rối loạn chức năng nội tạng [89]. Sinh bệnh học của nhiễm khuẩn huyết liên quan đến vai trò của yếu tố vi khuẩn PAMPS, yếu tố vật chủ DAMPS, rối loạn bổ thể, đông máu và hoạt hóa nội mô, giảm tiểu cầu, giảm bạch cầu, ức chế miễn dịch, tăng hiện tượng thực bào và hậu quả là rối loạn chức năng đa cơ quan và tử vong [36], trong đó nhân

mạnh đến vai trò của mất cân bằng đáp ứng miễn dịch, cytokin gây viêm, chống viêm cũng như vai trò của miRNA là gen quy định các quá trình đó. Các nghiên cứu trên thế giới gần đây đã bắt đầu nghiên cứu về vai trò và giá trị của các miRNA ở BN NKH. Hầu hết các nghiên cứu đều khẳng định mức độ biểu hiện của một số miRNA thay đổi ở nhóm BN NKH so với nhóm chứng và thay đổi theo mức độ nặng của NKH, từ đó đề xuất sử dụng các miRNA với vai trò là dấu ấn sinh học trong chẩn đoán và tiên lượng NKH, tuy vậy, các kết quả vẫn còn chưa thống nhất với nhau. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự rối loạn miRNA tương ứng với các triệu chứng lâm sàng của nhiễm trùng nặng và NKH.

Kingsley SMK nhận thấy miRNA tham gia vào cả hai đáp ứng của cơ thể là đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch mắc phải, do đó tham gia vào hầu hết các giai đoạn trong cơ chế bệnh sinh của nhiễm khuẩn huyết [15]. MiRNA-146a ngăn cản kích hoạt nội mô bằng cách ức chế dịch mã protein thúc đẩy hoạt động nội mô thông qua hoạt hóa con đường tín hiệu NF- $\kappa$ B [84]. Nghiên cứu của Ryan M.O'Connell khẳng định miRNA-155 gây ra đáp ứng viêm thông qua đại thực bào [90]. Tác giả Gangliu và cộng sự đã chứng minh vai trò của miRNA-147 làm giảm đáp ứng viêm của đại thực bào thông qua TLR [12]. Tác giả Konstantin D.Tagonov và David Baltimore đã chứng minh miRNA-146 có vai trò ức chế protein cảm ứng NF- $\kappa$ B của đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, do đó ức chế biểu hiện của các cytokin viêm [56]. Tác giả Edel M Quinn cũng chứng minh rằng miRNA-146a được điều chỉnh theo phản ứng với lipoprotein của vi khuẩn và kích thích của vi khuẩn ở cả tế bào chưa tiếp xúc với BLP [84]. Trong tương lai, miRNA-146 có thể là một mục tiêu để điều chỉnh dung nạp ngoại sinh ở vật chủ đáp ứng miễn dịch bẩm sinh đối với nhiễm khuẩn. MiRNA-223 có vai trò quan trọng trong điều hòa phản ứng miễn dịch thông qua điều chỉnh toàn bộ sự thay đổi của các gen có vai trò tốt trong việc điều hòa phản ứng miễn dịch [70]. Theo đó, chuột đột

biến tăng miRNA-223 hiển thị phản ứng miễn dịch tăng lên đối với các tác nhân gây bệnh như *Candida albicans* và cho thấy sự hủy hoại mô tăng cao đáp ứng với LPS. MiRNA có thể đóng vai trò như những dấu ấn sinh học khả dụng và có thể giúp phân biệt các giai đoạn khác nhau của NKH. Kết quả phân tích một số miRNA: miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-182 và miRNA-584 đã được tìm thấy trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của bệnh nhân NKH[91].

**Bảng 1.4. Vai trò của miRNA trong cơ chế bệnh sinh của nhiễm khuẩn huyết**

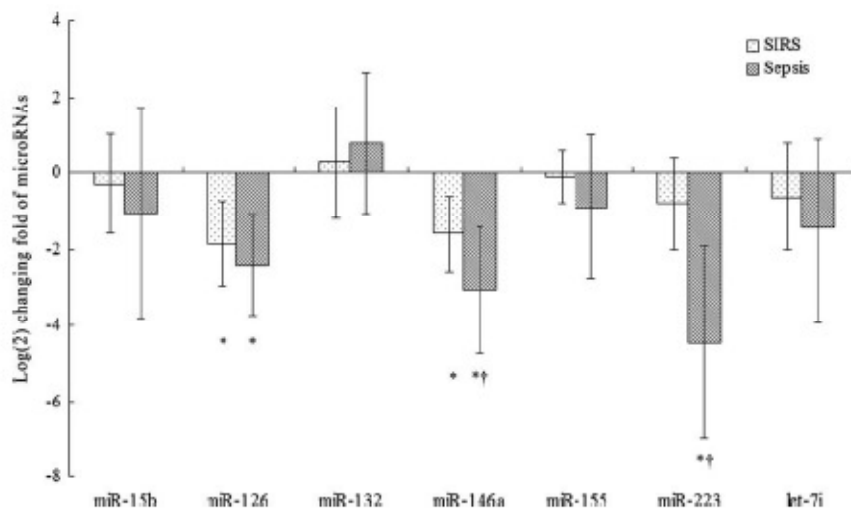
<b>MiRNA</b>	<b>Mô hình</b>	<b>Mục tiêu</b>	<b>Liên quan đến NKH</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
MiRNA-146a	Người	<b>THP-1 IL-6</b>	Tương quan nghịch với tăng nồng độ của IL6	[92]
	Người	<b>Lympho Th</b>	Điều hòa sản xuất Th1 qua trung gian tế bào Treg	[93]
	Chuột	<b>TNF-<math>\alpha</math>, iNoS</b>	MiR-146a làm giảm biểu hiện của <b>TNF-<math>\alpha</math>, iNoS</b> ,	[84]
MiRNA-147	Chuột	<b>TLRs</b>	miR-147, kiểm soát phản ứng viêm ở đại thực bào của chuột thông qua TLRs	[12]
MiRNA-155	Chuột	<b>TLRs,</b>	MiR-155 kiểm soát phản ứng viêm ở đại thực bào	[90]

Wang và cộng sự đã sử dụng giải trình tự Solexa và nhận diện được sáu miRNA để tiên lượng bệnh nhân NKH trong đó có miRNA-146a, miRNA-223 [94]. Nồng độ miRNA-223 được tìm thấy ở những bệnh nhân NKH còn

sống cao hơn ở nhóm tử vong, còn miRNA-15a, miRNA-193b, miRNA-122 và miRNA-483-5p lại thấp hơn. Biểu hiện của miRNA-297 trong huyết tương bệnh nhân NKH đã tử vong cao hơn so với trong huyết tương bệnh nhân còn sống. MiRNA-574-5p huyết tương cao hơn ở những người sống sót và biểu hiện của nó tương quan với tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân NKH[95].

Huang và cộng sự phân tích gộp kết quả một số nghiên cứu về miRNA liên quan đến NKH dưới dạng mạng lưới trắc đồ đã cho thấy miRNA có thể là dấu ấn sinh học của NKH. Theo kết quả này, miRNA-122, miRNA-146a, miRNA-223 và miRNA-499-5p được đề xuất là chỉ dấu sinh học trong chẩn đoán NKH còn miRNA-193b, miR483-5p và miRNA-574- 5p có thể là chỉ dấu tiên lượng sóc hoặc tiên lượng tử vong của bệnh nhân NKH[96].

Wang và các đồng nghiệp thấy mức độ biểu hiện của miRNA-223 trong huyết tương bệnh nhân NKH giảm thấp hơn so với bệnh nhân có SIRS hoặc người khỏe mạnh [94].



**Hình 1.3. Mức độ biểu hiện của một số miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và SIRS [94]**

Wang nghiên cứu trên 166 bệnh NKH thấy mức độ biểu hiện của miRNA-223 trong huyết thanh những bệnh nhân này cao hơn ở nhóm chứng là người khỏe mạnh và mức độ miRNA-223 tăng cao liên quan đến mức độ

nghiêm trọng của nhiễm khuẩn huyết [97]. MiRNA-223 tăng lên tương quan với sự tăng lên của nồng độ TNF $\alpha$  và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Nghiên cứu của LiuDan và cộng sự phát hiện ra miRNA-223 có thể đóng vai trò như một yếu tố bảo vệ trong NKH bằng cách giảm quá trình thực bào và tăng cường tăng sinh tế bào trong tế bào lympho [98]. Ngược lại, một nghiên cứu khác lại có kết quả ngược lại, mức độ biểu hiện của miRNA-223 huyết tương ở nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết nặng không khác biệt so với ở nhóm BN nặng không do nhiễm trùng.

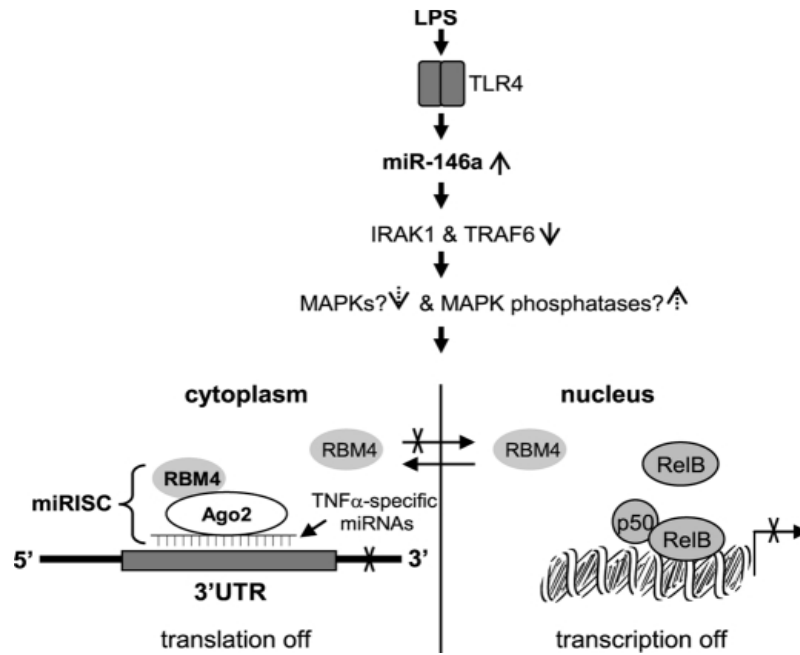
Cơ chế bệnh sinh của nhiễm khuẩn huyết rất phức tạp, trong đó miRNA đã chứng minh được sự tham gia của mình ở cấp độ phân tử thông qua các hoạt động ở các giai đoạn của đáp ứng miễn dịch trong nhiễm khuẩn huyết. Chẩn đoán và điều trị kháng sinh đặc hiệu sớm sẽ làm giảm tỷ lệ tử vong đáng kể ở nhóm bệnh nhân này.

#### *1.2.7.1. MiRNA-146a*

MiRNA-146a-3p là một miRNA nhỏ, có chiều dài gồm 22 nucleotide, tham gia vào quá trình sinh học cấp độ phân tử của nhiễm khuẩn huyết ở các giai đoạn khác nhau [56],[ 84],[ 99].

Nội độc tố của vi khuẩn hoạt hóa TLR4 làm tăng biểu hiện của miRNA-146, dẫn đến giảm hoạt hóa protein IRAK-1 và TRAF-6, trải qua một loạt các quá trình gây ra hậu quả ức chế dịch mã một số protein quan trọng quy định phản ứng viêm. Do đó, miRNA-146a có khả năng điều hòa quan trọng trong quá trình điều chỉnh tạm thời các phản ứng viêm toàn thân cấp tính, chẳng hạn như NKH, giúp đảo ngược các quá trình, đây là cơ sở để nghiên cứu các liệu pháp điều trị NKH mới.



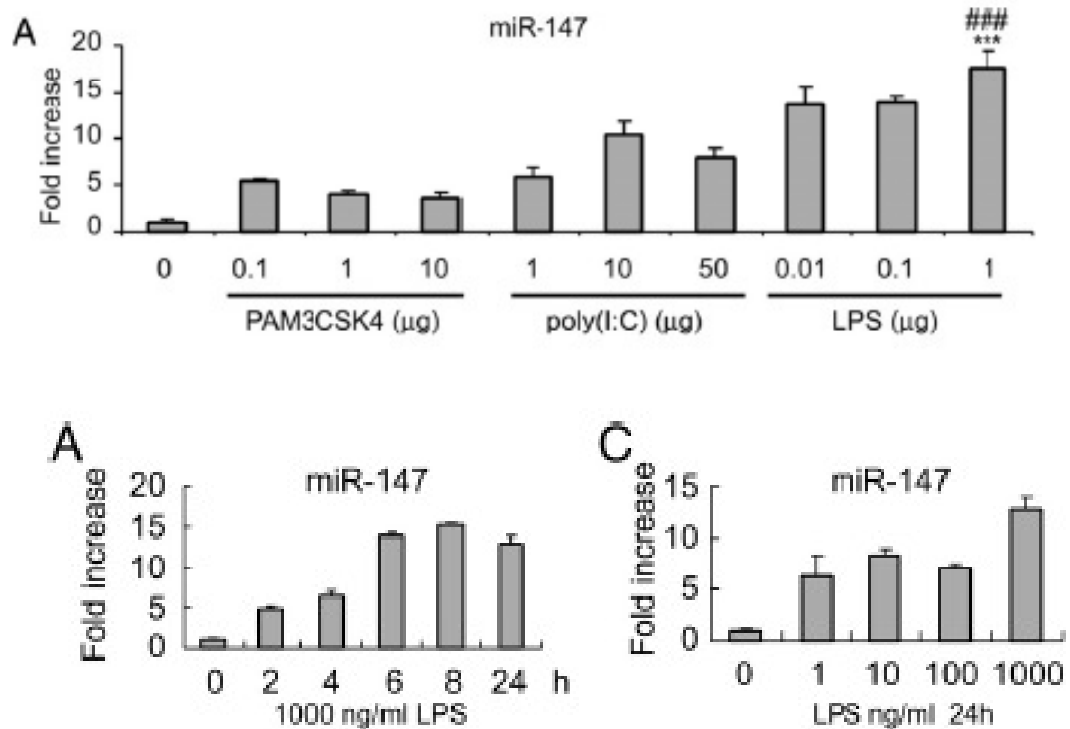


**Hình 1.4. Vai trò miRNA-146a trong ức chế dịch mã tế bào  
dung nạp nội độc tố [99]**

Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA-146a ở cả huyết thanh và huyết tương đóng vai trò như một chỉ dấu nhiễm khuẩn huyết [94],[100]. Thụ thể tiếp nhận dạng chuồng TLR là một thành phần quan trọng trong nhận biết các tác nhân gây bệnh, khởi đầu của phản ứng miễn dịch bẩm sinh đối với nhiễm trùng. MiRNA điều chỉnh quá trình truyền tín hiệu của TLR. Cụ thể, miRNA-146a đóng một vai trò quan trọng trong kiểm soát enzym liên kết thụ thể interleukin-1 (IRAK-1) gây dung nạp nội độc tố vi khuẩn, truyền tín hiệu tới TLR-2 làm tăng khả năng dung nạp lipoprotein của vi khuẩn (BLP) cũng như khả năng kháng chéo với vi khuẩn [84].

#### 1.2.7.2. MiRNA- 147b

Vai trò của miRNA-147b trong phản ứng viêm bắt đầu được nghiên cứu trên chuột thực nghiệm bởi tác giả Gangliu vào năm 2009. MiRNA-147b có cấu trúc gồm 21 nucleotide. MiRNA-147b đóng vai trò quan trọng trong cả hệ thống miễn dịch tế bào và hệ thống miễn dịch bẩm sinh, thông qua đó tham gia vào các giai đoạn của quá trình nhiễm khuẩn huyết [12].



**Hình 1.5. Động học miRNA-147b**

MiRNA-147b, được tạo ra trong các đại thực bào đóng vai trò khởi động và tăng sao chép các thụ thể tiếp nhận dạng chuông TLRs, do đó kích hoạt con đường truyền tín hiệu trong tế bào dẫn đến hoạt hoá NF-κB bào tương. NF-κB được hoạt hoá di chuyển từ bào tương vào nhân gắn vào vị trí khởi phát sao chép và tăng sự sao chép những cytokin như: TNF-α, IL-6 và IL-10, dẫn đến đáp ứng viêm. Đồng thời miRNA-147b cũng đóng vai trò kiểm soát phản hồi âm tính của các tín hiệu liên quan đến TLRs. Trên thực nghiệm đã chứng minh được sự tăng biểu hiện của miRNA-147b làm giảm phản ứng viêm của các đại thực bào thông qua hoạt hoá các thụ thể dạng chuông TLR2, TLR3 hoặc TLR4 [12]. Ở giai đoạn muộn của nhiễm khuẩn huyết, miRNA-147b tăng cao làm ức chế sản xuất các sản phẩm của cytokin gây viêm, thông qua đó khởi phát đáp ứng chống viêm, kiểm soát các đáp ứng viêm quá mức [12]. Mặt khác, miRNA-147b có vai trò tiềm năng trong việc điều chỉnh chức năng hàng rào nội mô thông qua kiểm soát mục tiêu là các protein liên quan [88].

### 1.2.7.3. *MiRNA-155*

MiRNA-155 là miRNA duy nhất trong số các miRNA được nghiên cứu có mức độ biểu hiện tăng lên đáng kể bởi cả hai kích thích bao gồm thụ thể dạng chuông TLR phối hợp với protein MYD 88 (Myeloid differentiation primary response 88- Protein phản ứng biệt hóa dòng tủy sơ cấp 88) và hoạt hóa tín hiệu TNF- $\alpha$  [90]. Do vậy, miRNA-155 được mô tả như một mục tiêu chung của một loạt các chất trung gian gây viêm.

MiRNA-155 có thể làm tình trạng viêm nặng hơn trong nhiễm khuẩn huyết. Nghiên cứu thực nghiệm trên chuột cho thấy miRNA-155 nhắm mục tiêu là protein liên kết yếu tố chuyển dạng tăng trưởng được sinh ra sau khi bị kích thích bởi nội độc tố LPS, từ đó gián tiếp làm giảm số lượng chất ức chế NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B, do đó tạo điều kiện hoạt hóa NF $\kappa$ B thành hạt nhân và sản xuất các cytokine tiền viêm [101],[ 102]. Đồng thời, mức độ biểu hiện của miRNA-155 cũng bị tăng lên bởi tác động của các cytokine gây viêm như IL-6, TNF- $\alpha$  ở BN NKH [14],[ 68],[ 85]. Đồng thời, miRNA-155 ức chế trực tiếp tổng hợp protein và hậu quả là tăng tín hiệu thụ thể dạng chuông TLR4 [90], qua đó tham gia vào quá trình kiểm soát đáp ứng viêm trong nhiễm khuẩn huyết.

Vai trò của miRNA-155 còn được thể hiện ở giai đoạn ức chế miễn dịch và thực bào của nhiễm khuẩn huyết muện. Giai đoạn này được đặc trưng bởi sự sản xuất quá mức các cytokine ức chế miễn dịch, làm tăng số lượng tế bào T nhận diện (Treg) và cạn kiệt tế bào lympho T [103],[ 104]. Tỷ lệ tế bào Treg + TCD4 + TCD25+ cũng tăng cao ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết [105].

Mức độ biểu hiện của miRNA-155 tăng lên ở những bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tăng tỷ lệ thuận với số lượng tế bào Treg CD39+. Nghiên cứu thực nghiệm cho thấy ức chế mức độ biểu hiện của miRNA-155 ở chuột bị nhiễm khuẩn huyết làm giảm số lượng của các tế bào Treg CD39+ [14]. Điều này cho thấy miRNA-155 có thể tăng sản xuất các tế bào Treg trong nhiễm

khuẩn huyết và gây ra suy giảm miễn dịch. Tế bào Treg thường ít bị chết theo chương trình, và do đó, số lượng tế bào có xu hướng tăng cao trong giai đoạn cuối của nhiễm khuẩn huyết [106]. Mức độ biểu hiện của miRNA-155 được tăng lên cùng với sự tăng nồng độ của các cytokine viêm, như IL-6 [68].

#### *1.2.7.4. MiRNA-223*

MiRNA-223 có vai trò trong điều hòa phản ứng miễn dịch thông qua kiểm soát dịch mã các gen quy định phản ứng miễn dịch [107],[89]. Theo đó, trên chuột bị NKH, mức độ biểu hiện của miRNA-223 giảm đột ngột so với chuột khỏe mạnh, đồng thời, Essandoh và cộng sự cũng chứng minh chuột rằng, mức độ biểu hiện của miRNA-223 giảm có ý nghĩa ở nhóm nhiễm khuẩn nặng, suy hô hấp và tử vong cao hơn nhóm còn lại [108],[ 109].

Mặt khác, miR-223 có mục tiêu là Sema3A, một chất kích hoạt cơn bão cytokine và một chất chống hóa chất thần kinh cho các sợi trục giao cảm. Ngoài ra, miRNA-223 điều chỉnh âm tính biểu hiện của STAT-3 và IL-6 trong tim chuột [86]. Tổng hợp lại, những dữ liệu này chỉ ra rằng mất miRNA-223/-223\* làm tình trạng NKH nặng hơn, tăng khả năng rối loạn chức năng cơ tim và tử vong ở BN NKH [86]. MiRNA cũng có thể đóng vai trò như một yếu tố bảo vệ trong NKH bằng cách giảm quá trình chết tế bào theo chương trình và tăng cường sự tăng sinh tế bào trong tế bào lympho [98].

Sử dụng miRNA là dấu ấn sinh học lưu hành cho nhiễm khuẩn huyết vẫn còn ở giai đoạn sơ khai, do vậy tiếp tục nghiên cứu về các miRNA với vai trò chỉ dấu sinh học lưu hành cho nhiễm khuẩn huyết vẫn còn ở giai đoạn sơ khai, do vậy tiếp tục nghiên cứu về các miRNA với vai trò là chỉ dấu sinh học trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết là rất cần thiết.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Nhóm bệnh: 125 bệnh nhân được chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết theo tiêu chuẩn Sepsis-3

- Nhóm chứng: 71 người khỏe mạnh và 69 bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue

#### 2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân nghiên cứu

##### 2.1.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

- Bệnh nhân  $\geq 18$  tuổi, điều trị nội trú tại các địa điểm nghiên cứu trong thời gian nghiên cứu

- Được chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết theo hướng dẫn quốc tế về quản lý NKH và sốc nhiễm khuẩn 2016 [1]

- Bằng chứng nhiễm trùng trên lâm sàng:

- Viêm phổi
- Viêm đường tiết niệu
- Nhiễm khuẩn tiêu hóa
- Nhiễm khuẩn da, niêm mạc
- Nhiễm trùng thần kinh trung ương

- Điểm SOFA tăng  $\geq 2$  điểm so với điểm SOFA ban đầu

- Đồng ý tham gia nghiên cứu

##### 2.1.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn nhóm chứng

\* Tiêu chuẩn lựa chọn nhóm chứng là người khỏe mạnh

- Gồm 71 người khỏe mạnh tham gia hiến máu tình nguyện hoặc đến khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện TƯQĐ 108, thỏa mãn đủ các điều kiện sau:

- Không mắc các bệnh mạn tính trong tiền sử
- Kết quả xét nghiệm HBsAg âm tính, Anti HCV âm tính, Anti HIV âm tính.
- Không mắc các bệnh cấp tính tại thời điểm lấy máu
- Đồng ý tham gia nghiên cứu

\* *Tiêu chuẩn lựa chọn nhóm chứng là bệnh nhân Sốt xuất huyết Dengue*

Bệnh nhân được chẩn đoán sốt xuất huyết Dengue theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới WHO (2011) khi có sốt  $\leq 7$  ngày kèm theo ít nhất một trong hai tiêu chuẩn sau: kháng nguyên NS1Dengue dương tính hoặc ELISA IgM Dengue dương tính [110].

### *2.1.1.3. Tiêu chuẩn chẩn đoán sốc nhiễm khuẩn*

Theo Sepsis-3 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết được chẩn đoán sốc nhiễm khuẩn khi có đủ 02 tiêu chuẩn sau [1]:

- Rối loạn vận mạch không đáp ứng với điều trị bù dịch và phải dùng vận mạch để duy trì huyết áp động mạch trung bình  $\geq 65$ mmHg
- Kết hợp với rối loạn chuyển hóa tế bào (lactate máu  $> 2$ mmol/l).

### *2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.*

- Bệnh nhân  $< 18$  tuổi
- Phụ nữ có thai
- Bệnh nhân nhiễm trùng HIV/AIDS, nhiễm vi rút viêm gan B, nhiễm vi rút viêm gan C
- Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu

## **2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu**

### *2.2.1. Địa điểm nghiên cứu*

Nghiên cứu được tiến hành tại 02 bệnh viện

- Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
- Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp, Hải Phòng

### *2.2.2. Thời gian nghiên cứu*

- Nghiên cứu được tiến hành trong 3 năm, từ tháng 12 năm 2014 đến tháng 12 năm 2017.

## **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

### *2.3.1. Thiết kế nghiên cứu*

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, có so sánh bệnh chứng theo tỷ lệ  $\approx 2$  bệnh/1 chứng là người khỏe mạnh/1 chứng là người mắc SXH Dengue

Phương pháp tính cỡ mẫu: Chọn mẫu theo phương pháp thuận tiện có chủ đích.

### **2.3.2. Phương pháp tiến hành nghiên cứu**

#### **2.3.2.1. Phương pháp lấy mẫu**

- Với bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

Bệnh nhân vào viện với chẩn đoán nghi ngờ nhiễm khuẩn huyết lâm sàng sẽ được lấy máu làm các xét nghiệm thường quy như: công thức máu, chức năng đông máu, đánh giá chức năng gan, thận, đo nồng độ các chỉ dấu sinh học như PCT, CRP, lactat hoặc khí máu động mạch, kèm theo các xét nghiệm chẩn đoán hình ảnh, đồng thời, mỗi bệnh nhân sẽ được cấy 02-03 mẫu máu tại thời điểm sốt cao hoặc rét run cùng với 04 ml máu chứa trong ống EDTA K2 để sử dụng làm xét nghiệm PCR đa mồi và lưu huyết tương để định lượng tương đối miRNA

- Với nhóm chứng là người khỏe mạnh

Người cho máu hoặc đi khám sức khỏe định kỳ sẽ được hỏi tiền sử bệnh mạn tính, thăm khám loại trừ bệnh cấp tính, sau đó lấy máu để định nhóm máu, kiểm tra loại trừ mắc bệnh lây truyền qua đường máu như: HCVAb âm tính, HbsAg âm tính, Anti HIV âm tính, đồng thời được lấy thêm 02ml máu chứa trong ống EDTA K2 để định lượng tương đối mức độ biểu hiện của miRNA huyết tương.

- Với nhóm chứng là bệnh nhân SXH Dengue

Bệnh nhân vào viện với chẩn đoán nghi ngờ SXH Dengue sẽ được chỉ định lấy máu để làm các xét nghiệm cơ bản như: công thức máu, chức năng đông máu, chức năng gan thận..., xét nghiệm NS1Ag hoặc ELISA IgM Dengue, loại trừ mắc bệnh lây truyền qua đường máu như: HCVAb âm tính, HbsAg âm tính, Anti HIV âm tính đồng thời lấy thêm 02ml máu đựng trong ống EDTA K2 để chuẩn bị cho định lượng tương đối mức độ biểu hiện của miRNA huyết tương.

### 2.3.2.2. Phương pháp xử lý, bảo quản và lưu trữ mẫu

- Tại Bệnh viện TƯQĐ 108

Các mẫu máu đựng trong ống EDTA K2 được để ở nhiệt độ phòng trong thời gian ngắn nhất có thể, sau đó được chuyển lên khoa Sinh học phân tử.

Tại đây, các ống máu được ly tâm 5000 vòng trong vòng 15 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó hút phần huyết tương pha trên chuyển sang ống Ependor, ghi lại các thông tin về mẫu bệnh phẩm và lưu trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ âm 20 độ C.

- Tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp, Hải Phòng

Các mẫu máu đựng trong ống EDTA K2 được để ở nhiệt độ phòng trong thời gian ngắn nhất có thể, sau đó được chuyển lên khoa Vi sinh.

Tại đây, các ống máu được ly tâm 5000 vòng trong vòng 15 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó hút phần huyết tương pha trên chuyển sang ống Ependor, ghi lại các thông tin về mẫu bệnh phẩm và lưu trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ âm 20 độ C.

Sau mỗi tuần, chúng tôi sẽ chuyển mẫu sang hộp giữ nhiệt có chứa đá khô và vận chuyển lên Khoa SHPT Bệnh viện TƯQĐ 108, sau đó tiếp tục lưu trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ âm 20 độ C

Ở giai đoạn đầu của nghiên cứu, các mẫu huyết tương này được tiến hành định lượng miRNA theo từng đợt, phân tích kết quả theo từng nhóm, sau khi đã ổn định về kỹ thuật xét nghiệm, các mẫu huyết tương được tiến hành đo các miRNA hàng loạt và tiến hành phân tích kết quả.

Mỗi lần xét nghiệm tối đa là 96 giếng, tương đương với 19 mẫu.

### 2.3.2.3. Phương pháp định lượng miRNA

- Tách chiết ARN, lưu ở nhiệt độ -20°C cho đến khi dùng để tổng hợp cDNA. Tổng hợp cDNA, sử dụng kit thương mại tổng hợp cDNA của hãng Themor.



- Điều kiện chạy PCR:

25 <sup>0</sup> C	10 phút
42 <sup>0</sup> C	60 phút
70 <sup>0</sup> C	5 phút

- cDNA sau khi tổng hợp xong được pha loãng trong nước RNA,DNA free để được tổng thể tích 100µl. Sử dụng 5µl cho mỗi phản ứng realtime PCR.

- *Lựa chọn miRNA làm nội chuẩn*

Từ kết quả pha sàng lọc và thử nghiệm, chúng tôi đã lựa chọn miRNA-16 làm nội chuẩn.

- Mỗi: chúng tôi sử dụng cặp mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu cho 5 miRNA: miRNA-16, miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223 của hãng IDT.

**Bảng 2.1. Trình tự mỗi của các miRNA**

MiRNA	Mã miRNA trên ngân hàng	Trình tự mỗi xuôi	Chiều dài (bp)
miRNA-146-3p	MIMAT0004608	GGTGTGCCTCTGAAATTCAGTT	22
miRNA-147b	MIMAT0004928	GTGTTGTGTGCGGAAATGC	21
miRNA-223	MIMAT0004570	TGGTTTTGGGGCGTGTATTTGACAA	23
miRNA-155	MIMAT0000646	GTTGGGGTTAATGCTAATCGTGAT	22
miRNA-16	MIMAT0000069	CGCGTAGCAGCAGTAAAT	22
Mỗi ngược chung cho cả 5 miRNA		GTGCAGGGTCCGAGGT	16

- Thành phần phản ứng cho mỗi phản ứng:

Master mix SYBR luminar của Themor: 5 $\mu$ l, Primer mix – FR: 1 $\mu$ l/miRNA (miRNA-16, miRNA- 146-3p, miRNA- 147b, miRNA-155, miRNA-223), cDNA: 5  $\mu$ l. Primer mix được sản xuất bởi IDT.

- Thực hiện phản ứng qRT-PCR:Sử dụng SYBR-Green và các bộ môi tự thiết kế để chạy realtime PCR các miRNA-16, miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223

- Điều kiện chạy realtimePCR:

50 <sup>0</sup> C - 2 phút	Lặp lại 1 chu kì
95 <sup>0</sup> C - 10 phút	Lặp lại 1 chu kì
95 <sup>0</sup> C - 15 giây	Lặp lại 45 chu kì
58 <sup>0</sup> C - 1 phút	

- Toàn bộ các phản ứng được thực hiện trên hệ thống máy realtime PCR Agilent Agilent.

- Xét nghiệm định lượng miRNA được thực hiện tại khoa sinh học phân tử Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Mỗi mẫu xét nghiệm được lặp lại 2 lần và lấy kết quả trung bình cộng của chu kỳ ngưỡng (Ct) để nghiên cứu.

- *Phân tích kết quả*

- Mức độ biểu hiện của các miRNA dựa trên tỷ lệ giữa các miRNA nghiên cứu và nội chuẩn theo công thức Livac [111]

Công thức tính mức độ biểu hiện của miRNA

$$\text{MiRNA} = 2^{-\Delta\text{Ct}} (\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA NC}} - \text{Ct}_{\text{miRNA-16}}), \text{ trong đó:}$$

- Ct<sub>miRNANC</sub> là chu kỳ ngưỡng của 4 miRNA (miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223),
- Ct<sub>miRNA-16</sub>: chu kỳ ngưỡng của miRNA nội chuẩn.
- Quy trình định lượng miRNA được trình bày trong sơ đồ 2.1 dưới đây

**SƠ ĐỒ 2.1. QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG TƯƠNG ĐỐI MỨC ĐỘ  
BIỂU HIỆN MIRCRONA HUYẾT TƯƠNG**

**Bước 1. Tách RNA từ huyết tương.**

300 $\mu$ L huyết tương + 700 $\mu$ l Trizol

vortex, spin, ủ 15 phút

↓

400 $\mu$ l chloroform

↓ vortex

Ly tâm 13200 rpm, 15 phút, 4°C

↓

Thu pha trên + isopropranolon (tỷ lệ 1:1)

↓ invert

Ly tâm 13200 rpm, 30 phút, 4°C

↓

Thu cặn, rửa bằng 600 $\mu$ l cồn 70°C

↓

Ly tâm 13200 rpm, 10 phút, 4°C

↓

Thu cặn, rửa lần 2

↓

Ly tâm 13200 rpm, 15 phút, 4°C

↓

Làm khô

↓

Elute H<sub>2</sub>O (500 $\mu$ l)

↓

ủ 65°C, 3 phút → RNA, giữ ở -20°C

**Bước 2: Quy trình tổng hợp cDNA****1. Thành phần mix (1 kit )**Buffer: 4 $\mu$ ldNTP: 1  $\mu$ lSterm loop: 1  $\mu$ lRT: 0,5  $\mu$ lInhibitor: 0,5  $\mu$ lRNA: 15  $\mu$ l**2. Chu trình tổng hợp cDNA**

25°C- 10'

42°C- 60'

70°C: 10'

Pha loãng 5 lần

**Bước 3. Chạy Realtime- PCR SYBR GREEN.****1. Thành phần mix**- Master mix SYBR luminar: 5  $\mu$ l- Primer mix – FR: 1  $\mu$ l/ microR (miRNA-16, miRNA- 146-3p, miRNA- 147b, , miRNA-155, miRNA-223)- c DNA: 5  $\mu$ l**2. Chu trình nhiệt chạy SYBR, 45 cycles**

- 50°C- 2'

- 95°C- 10'

- 95°C- 15s

- 58°C-1'

- 95°C- 15s

- 60°C-1'

- 95°C-15s.

## **2.4. Nội dung nghiên cứu**

Lựa chọn tất cả những bệnh nhân nhập viện trong thời gian nghiên cứu có đủ tiêu chuẩn như mục 2.1. Mỗi bệnh nhân có một bệnh án riêng có đầy đủ các mục đáp ứng với mục tiêu nghiên cứu, bao gồm các tham số về dịch tễ, lâm sàng và kết quả điều trị (phụ lục 1).

Dựa theo tiêu chuẩn của SSC- 2016 về chẩn đoán, phân loại mức độ nặng của nhiễm khuẩn huyết, chúng tôi chia bệnh nhân thành 2 nhóm:

- Nhóm 1: Nhiễm khuẩn huyết không sốc
- Nhóm 2: Nhiễm khuẩn huyết có sốc

### **2.4.1. Chỉ tiêu nghiên cứu**

#### **2.4.1.1. Các đặc điểm chung về lâm sàng**

- Phân bố về tuổi và giới, thời gian
- Các bệnh mạn tính đã mắc
  - Bệnh phổi mạn tính tắc nghẽn
  - Viêm phế quản mạn
  - Tiểu đường
  - Suy thận không phải giai đoạn cuối
  - Xơ gan còn bù

Tất cả các bệnh lý trên được xác định trên cơ sở hỏi bệnh, thăm khám lâm sàng, cận lâm sàng, chẩn đoán của các bác sỹ chuyên khoa.

- Đặc điểm lâm sàng: chẩn đoán, ổ nhiễm khuẩn tiên phát, các cơ quan bị tổn thương.
- Mức độ nặng của bệnh đánh giá theo thang điểm SOFA tại thời điểm chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết
- Thời gian bị bệnh trước khi đến viện: tính từ thời điểm xuất hiện các triệu chứng bệnh đầu tiên cho đến khi bệnh nhân đến các cơ sở y tế để khám bệnh.

- Triệu chứng về ý thức: kích thích vật vã, li bì/lơ mơ, hôn mê, đánh giá theo thang điểm Glassgow.

*Biểu hiện hô hấp*

- Xác định dấu hiệu ho, tính chất cơn ho, đờm: màu sắc, số lượng
- Biểu hiện đau ngực,
- Đánh giá tính chất khó thở : tần số thở, mức độ khó thở , thở Oxy, thở máy (nếu có), SpO<sub>2</sub>.
- Thăm khám phổi: thông khí giảm, ral phế quản

*Biểu hiện da, niêm mạc*

- Biểu hiện trên da: tím tái, xuất huyết, ban trên da...
- Tổn thương da và các mô dưới da: vị trí, thời điểm và hoàn cảnh xuất hiện theo lời kể của bệnh nhân; xác định mức độ, tính chất của tổn thương (nếu có).

*Biểu hiện tiêu hoá, tiết niệu.*

- Triệu chứng tiêu chảy và đau bụng theo lời kể của bệnh nhân (nếu có): số lần tiêu chảy, số ngày bị tiêu chảy, vị trí đau bụng.
- Vàng da, vàng mắt: được xác định dựa vào thăm khám lâm sàng của bác sỹ khám bệnh và xét nghiệm bilirubin máu tăng  $> 17\mu\text{mol/l}$ .
- Gan to, lách to: Được xác định khi sờ thấy dưới bờ sườn, diện đục to hơn bình thường hoặc siêu âm có hình ảnh gan to, lách to.
- Theo dõi số lượng nước tiểu, phát hiện thiếu niệu hoặc vô niệu, nước tiểu  $< 500\text{ ml}/24\text{ giờ}$  (dưới  $20\text{ml}/\text{giờ}$  – qua sonde tiểu).

*Đánh giá tiên lượng bệnh*

Thang điểm SOFA được sử dụng để đánh giá tiên lượng bệnh nhân tại thời điểm đánh giá

- Thẻ bệnh nhiễm khuẩn huyết: nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn huyết có sốc, rối loạn chức năng cơ quan, rối loạn chức năng đa cơ quan.

- Số ngày điều trị tại bệnh viện.
- Số ngày thở máy và các can thiệp khác nếu có.
- Kết quả điều trị (sống, tử vong).

#### 2.4.1.2. Các chỉ tiêu về cận lâm sàng.

- *Các biến đổi về huyết học*

- Thay đổi chỉ số Hemoglobin để đánh giá tình trạng thiếu máu. Phân độ thiếu máu theo tiêu chuẩn đánh giá mức độ thiếu máu của Tổ chức Y tế thế giới (WHO)

- Thay đổi số lượng bạch cầu
- Thay đổi số lượng tiểu cầu
- Đánh giá rối loạn chức năng đông máu dựa vào tỷ lệ prothrombin

**Bảng 2.2. Đánh giá các biến đổi về chỉ số huyết học**

Chỉ số	Ngưỡng xét nghiệm	Đánh giá
<b>Hemoglobin</b>	>120g/L	Không thiếu máu
	90g/l-120g/L	Thiếu máu mức độ nhẹ
	60g/l-90g/L	Thiếu máu mức độ trung bình
	<60 g/L	Thiếu máu mức độ nặng
<b>Bạch cầu</b>	>12G/L	Tăng
	4G/L-12G/L	Bình thường
	<4G/L	Giảm
<b>Tiểu cầu</b>	>150G.L	Bình thường
	100G/L-149G/L	Giảm nhẹ
	50G/L-100G/L	Giảm trung bình
	<50G/L	Giảm nặng
<b>Tỷ lệ prothrombin</b>	70%-140%	Bình thường
	50%-69%	Giảm nhẹ
	<50%	Giảm nặng

- *Các biến đổi về sinh hóa máu*

- + *Rối loạn điện giải*

- Biến đổi điện giải khi được xác định khi có sự thay đổi nồng độ của  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  và  $\text{Cl}^-$  so với nồng độ bình thường trong máu ( $\text{Na}$ : 135 – 145 mmol/L;  $\text{K}^+$ : 3,5 – 5 mmol/L;  $\text{Cl}^-$ : 98 – 106 mmol/L).

- + *Đánh giá biến đổi chức năng gan*

- Bilirubin máu
- Albumin máu
- Biến đổi enzym gan

- + *Đánh giá biến đổi chức năng thận*

- Tăng ure máu
- Tăng creatinin máu

**Bảng 2.3. Các biến đổi về chỉ số sinh hóa máu**

<b>Chỉ số</b>	<b>Ngưỡng xét nghiệm</b>	<b>Đánh giá</b>
<b>Bilirubin toàn phần</b>	$\leq 17\mu\text{mol/l}$	Bình thường
	$>17\mu\text{mol/l}$	Tăng
<b>Enzym gan (AST)</b>	$\leq 40\text{U/l- } 37^\circ\text{C}$	Bình thường
	$>40\text{U/l- } 37^\circ\text{C}$	Tăng
<b>Enzym gan(ALT)</b>	$\leq 40\text{U/l- } 37^\circ\text{C}$	Bình thường
	$>40\text{U/l- } 37^\circ\text{C}$	Tăng
<b>Albumin</b>	$\geq 35\text{g/l}$	Bình thường
	$<35\text{g/l}$	Giảm
<b>Chức năng thận</b>	Creatinin $< 120\mu\text{mol/l}$ (nam) Creatinin $< 100\mu\text{mol/l}$ (nữ)	Bình thường
	Creatinin $\geq 120\mu\text{mol/l}$ (nam) Creatinin $\geq 100\mu\text{mol/l}$ (nữ)	Tăng
	Ure $\leq 7,5\text{mmol/l}$	Bình thường
	Ure $>7,5\text{mmol/l}$	Tăng



+ *Đánh giá rối loạn chuyển hóa mô*

Tăng lactate máu > 2mmol/l

+ *Tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết*

Bằng chứng về vi sinh vật là kết quả cấy máu, đờm, nước tiểu, dịch khác...; chủng loại vi khuẩn cấy được, và/hoặc kết quả xét nghiệm realtime PCR đa môi trên bệnh phẩm là máu và các dịch khác.

+ *Đánh giá các chỉ dấu sinh học*

- Procalcitonin: nồng độ procalcitonin trong huyết tương (ng/ml), đo bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang (LUMItest PCT của hãng Brahms Diagnostica, CHLB Đức). Ngưỡng phát hiện là 0,05 ng/ml, hệ số biến thiên ở nồng độ thấp và nồng độ cao lần lượt là 12% và 5%.

- MiRNA: Đánh giá mức độ biểu hiện của các miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223. Xét nghiệm được tiến hành bằng phương pháp khuếch đại chuỗi gen định lượng theo thời gian thực trên hệ thống máy PCR 7500 và Agilent (mục 2.).

#### **2.4.2. Định nghĩa các biến số cần thu thập**

• *Nhiễm khuẩn huyết*: Là một rối loạn chức năng cơ quan đe dọa tính mạng do đáp ứng không được điều phối của cơ thể đối với nhiễm trùng.

Để thuận tiện cho thực hành lâm sàng thì rối loạn chức năng cơ quan có thể được xác định bằng sự gia tăng ít nhất 2 điểm trong thang điểm SOFA liên quan đến NKH (*Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment* – *Đánh giá rối loạn chức năng tạng*).

Nếu điểm SOFA tăng ít nhất 2 điểm so với điểm nền thì coi như BN có rối loạn chức năng cơ quan. Điểm SOFA nền thường là 0 điểm nếu BN không có những rối loạn chức năng cơ quan (cấp hoặc mạn) đã biết trước khởi điểm của nhiễm trùng.

• *Sốc nhiễm khuẩn*: Là một phân nhóm của NKH trong đó có sự hiện diện của những bất thường đặc biệt nặng nề về tuần hoàn, chuyển hóa tế bào.

Những bất thường này làm tăng cao nguy cơ tử vong hơn so với NKH đơn thuần.

**Bảng 2.4. Tiêu chuẩn rời loạn chức năng cơ quan theo Knaus**

<b>RLCN tim mạch:</b> Cần ít nhất 1 trong số các tiêu chuẩn sau
Nhịp tim $\leq 54$ lần/ phút HA tâm thu $< 60$ mmHg Nhịp tim nhanh hoặc rung thất pH máu động mạch $\leq 7,24$ và $\text{PaCO}_2 \leq 40$ mmHg
<b>Suy hô hấp:</b> Cần ít nhất 1 trong số các tiêu chuẩn sau
Tần số hô hấp $< 5$ lần/ phút hoặc $> 49$ lần/ phút ( trẻ em $> 2$ tuổi và người lớn) Phế nang động mạch khác biệt trong $\text{O}_2 > 350$ mmHg hoặc $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 200$ (không có tổn thương tim bẩm sinh) Yêu cầu hỗ trợ thông khí cơ học $> 24$ giờ $\text{PaCO}_2 > 50$ mmHg và $\text{pH} < 7,25$
<b>Suy thận:</b> Cần ít nhất 1 trong số các tiêu chuẩn sau
Khối lượng nước tiểu $9,3$ ml / kg trọng lượng cơ thể mỗi giờ hoặc Creatinine $> 266$ $\mu\text{mol} / \text{L}$ hoặc Urea nitrogen $> 1,00$ g / L hoặc urê $> 0,60$ g /L
<b>Rối loạn chức năng gan( cần cả 2 tiêu chuẩn sau):</b>
Bilirubin $> 60$ mg / L hoặc phosphatase kiềm tăng gấp đôi trong trong huyết thanh Thời gian prothrombin $> 4$ giây so với giới hạn trên của mức bình thường hoặc aspartate aminotransferase tăng gấp đôi trong huyết thanh
<b>Rối loạn chức năng huyết học:</b> Cần ít nhất 1 trong số các tiêu chuẩn sau
Bạch cầu $< 1500 / \text{mL}$ hoặc $> 40000 / \text{mL}$ Tiểu cầu $< 20.000 / \text{mL}$ hoặc bằng chứng về đông máu nội mạch
<b>Tổn thương thần kinh</b>
Thang điểm Glasgow $< 6$ (không có thuốc an thần)

Bệnh nhân được chẩn đoán sốc nhiễm khuẩn dựa vào những tiêu chí chẩn đoán NKH kèm với hạ huyết áp tồn tại cần phải sử dụng thuốc vận mạch để giữ HAĐM trung bình  $\geq 65\text{mmHg}$  và có lactate huyết thanh  $> 2\text{mmol/l}$  mặc dù đã được hồi sức bù dịch thoả đáng.

$$\text{MAP} = \text{DP} + 1/3(\text{SP} - \text{DP})$$

DP: huyết áp tâm trương; SP: huyết áp tâm thu

Đối với chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết ngoài những tiêu chuẩn chẩn đoán trên ta còn xét đến xét nghiệm cấy máu hoặc kết quả PCR đa môi dương tính

- Kết quả tử vong: được định nghĩa là những trường hợp bệnh nhân tử vong trong bệnh viện hoặc nặng được người nhà xin về để tử vong tại nhà.

- Rối loạn chức năng đa cơ quan:

Để đánh giá rối loạn chức năng cơ quan, chúng tôi áp dụng theo tiêu chuẩn rối loạn chức năng cơ quan theo Knaus[112].

## **2.5. Phương tiện, sinh phẩm, và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu**

### **2.5.1. Khám lâm sàng**

Khám lâm sàng hàng ngày do các bác sỹ lâm sàng tại địa điểm nghiên cứu thực hiện phối hợp với nghiên cứu viên, phát hiện các triệu chứng và ghi chép vào bệnh án nghiên cứu theo mẫu (phụ lục 1).

### **2.5.2. Các xét nghiệm huyết học và sinh hóa cơ bản.**

Các xét nghiệm huyết học và sinh hóa cơ bản được thực hiện theo quy trình chuẩn của các labo xét nghiệm tại các bệnh viện.

Cả bệnh viện đều sử dụng máy phân tích huyết học tự động Cell- Dyn 1800 của hãng Abbott, Hoa Kỳ với các hóa chất chính hãng

Các chỉ số sinh hóa cơ bản được thực hiện trên các máy sinh hóa tự động Hitachi 920 Automatic Analyzer của hãng Hitachi- Hightech Science system Corporation của Nhật Bản với các hóa chất do chính hãng cung cấp.

Tiêu chuẩn đánh giá một số chỉ số xét nghiệm được dựa theo hằng số sinh học của người Việt Nam [113].

### **2.5.3. Xét nghiệm PCT**

Nồng độ PCT huyết tương được xác định bởi kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay) trên các máy phân tích miễn dịch hoàn toàn tự động của Roche.

### **2.5.4. Cây khuẩn và định danh**

Mẫu máu: lấy 2 mẫu máu ở hai vị trí khác nhau, khi bệnh nhân sốt và chưa được sử dụng kháng sinh, mỗi mẫu máu lấy từ 8-10 ml máu vào bình cấy BD Bactec (đảm bảo quy trình vô trùng).

Các bệnh phẩm khác: đờm, dịch phế quản, nước tiểu...được lấy theo tiêu chuẩn của vi sinh do Bộ Y tế ban hành.

Các loại bệnh phẩm này đều được chuyển về khoa vi sinh vật và đặt trong máy ủ được báo kết quả tự động Bactec 9120 của hãng Becton Dickinson, Hoa Kỳ.

Khi máy báo kết quả dương tính, chủng vi khuẩn sẽ được cấy chuyển sang môi trường thạch YBEAW định danh vi khuẩn và phân lập khuẩn lạc.

### **2.5.5. Kỹ thuật multiplex PCR xác định DNA của vi khuẩn trong máu**

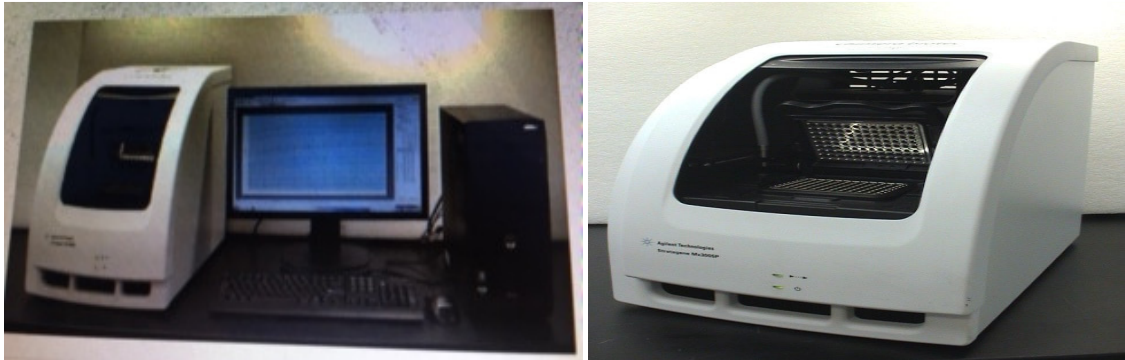
Xác định 13 tác nhân gây NKH bằng phương pháp khuếch đại chuỗi gen đa môi, định lượng theo thời gian thực, với bộ môi tự thiết kế của khoa sinh học phân tử, bệnh viện TƯQĐ 108 đã được cấp bằng sáng chế của Bộ khoa học, công nghệ năm 2016. Bệnh phẩm là máu, được lấy cùng thời điểm cấy máu, số lượng 2ml, chứa trong ống EDTAK2, sau đó gửi về khoa SHPT, tiến hành tách chiết DNA vi khuẩn và xác định trên máy Realtime PCR FAST 7500, kết quả trả về khoa lâm sàng sau 12-24 giờ [114]

## **2.6. Phương tiện nghiên cứu**

- Máy Agilent Technologies Stratagiene Mx3005p Real Time PCR để định lượng tương đối mức độ biểu hiện của 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223 so với nội chuẩn miRNA-16 dựa trên khả năng phát màu huỳnh quang của SYBRgreen gắn trên các mạch

đôi DNA được tổng hợp trong mỗi chu kỳ của phản ứng PCR dựa theo thời gian thực

- Máy xét nghiệm sinh hóa, huyết học, khí máu động mạch, máy chụp chẩn đoán hình ảnh học, máy cấy vi sinh.
- Các bảng điểm sử dụng trong nghiên cứu: SOFA, Glasgow.



**Hình 2.1. Máy Agilent Technologies Stratagene Mx3005p Real Time PCR**

## 2.7. Xử lý số liệu

- Số liệu được quản lý bằng phần mềm Excel 2010
- Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS phiên bản 22.0

Mức độ biểu hiện của MiRNA được tính toán theo công thức Livak

$$\text{MiRNA} = 2^{-\Delta\text{Ct}} \quad (\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA NC}} - \text{Ct}_{\text{miRNA-16}})$$

$$\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{miRNA nghiên cứu}}) - (\text{Ct}_{\text{miRNA-16}}) .$$

Ct là ngưỡng chu kỳ cho một mẫu.

Các biến định lượng được kiểm định phân phối chuẩn bằng kiểm định Normal, biến được coi là phân phối chuẩn khi  $p > 0,05$  và được coi là không tuân theo phân phối chuẩn khi  $p < 0,05$ . Có thể biểu diễn các biến định lượng dưới dạng biểu đồ Boxplot.

Các biến định lượng tuân theo phân phối chuẩn được trình bày dưới dạng trung bình ( $\bar{X}$ ) và độ lệch chuẩn (SD), giá trị nhỏ nhất (min)- lớn nhất (max). Các giả thuyết thống kê được kiểm định bằng kiểm định T-test student khi so sánh giữa hai biến định lượng và dùng kiểm định Anova khi so sánh từ 3 nhóm trở lên.

Các biến định lượng không tuân theo luật phân phối chuẩn được trình bày dưới dạng trung vị (median) và khoảng tứ phân vị (25%-75%). Kiểm định phi tham số được sử dụng để so sánh các biến không tuân theo phân phối chuẩn, trong đó kiểm định so sánh trung vị giữa hai biến được bằng thuật toán Mann-Whitney, so sánh từ 3 biến trở lên bằng thuật toán Kruskal- Wallis H

Đường cong ROC (Receiver Operating Characteristic Curve), diện tích dưới đường cong (AUC) được sử dụng để xác định giá trị của các miRNA và SOFA, PCT trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết, diện tích dưới đường cong ROC càng lớn thì mô hình càng có giá trị chẩn đoán và tiên lượng tốt [115].

**Ý nghĩa của giá trị AUC:** Ví dụ minh họa: nếu chọn một cặp đối tượng (chọn một cách ngẫu nhiên từ một quần thể), một người có bệnh và một người không có bệnh và cả hai người đều được xét nghiệm bằng một phương pháp có  $AUC = 0.85$ , thì điều này có nghĩa là xác suất mà người có bệnh có kết quả xét nghiệm với giá trị cao hơn người không mắc bệnh là 85%. Theo qui ước thì giá trị AUC của phương pháp xét nghiệm như sau:

AUC:  $> 0,90 \rightarrow$  Rất tốt

AUC:  $0,80 - 0,90 \rightarrow$  Tốt

AUC:  $0,70 - 0,80 \rightarrow$  Khá

AUC:  $0,60 - 0,70 \rightarrow$  Tạm được

AUC:  $0,50 - 0,60 \rightarrow$  Không giá trị

Xác định điểm cắt, chúng tôi sử dụng chỉ số Youden (Youden index = J) để xác định mức độ biểu hiện của miRNA có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhất [115].

$$J = \max(Se+Sp - 1).$$

Với Se là độ nhạy và Sp là độ đặc hiệu và phải chọn Se và Sp thế nào cho J có trị số cao nhất.

Tất cả phân tích thống kê sử dụng phần mềm SPSS 22.0 (IBM, Armonk, NY).

## **2.8. Đạo đức nghiên cứu**

Đề cương nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng khoa học và đạo đức nghiên cứu Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược lâm sàng 108 và Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp, Hải Phòng.

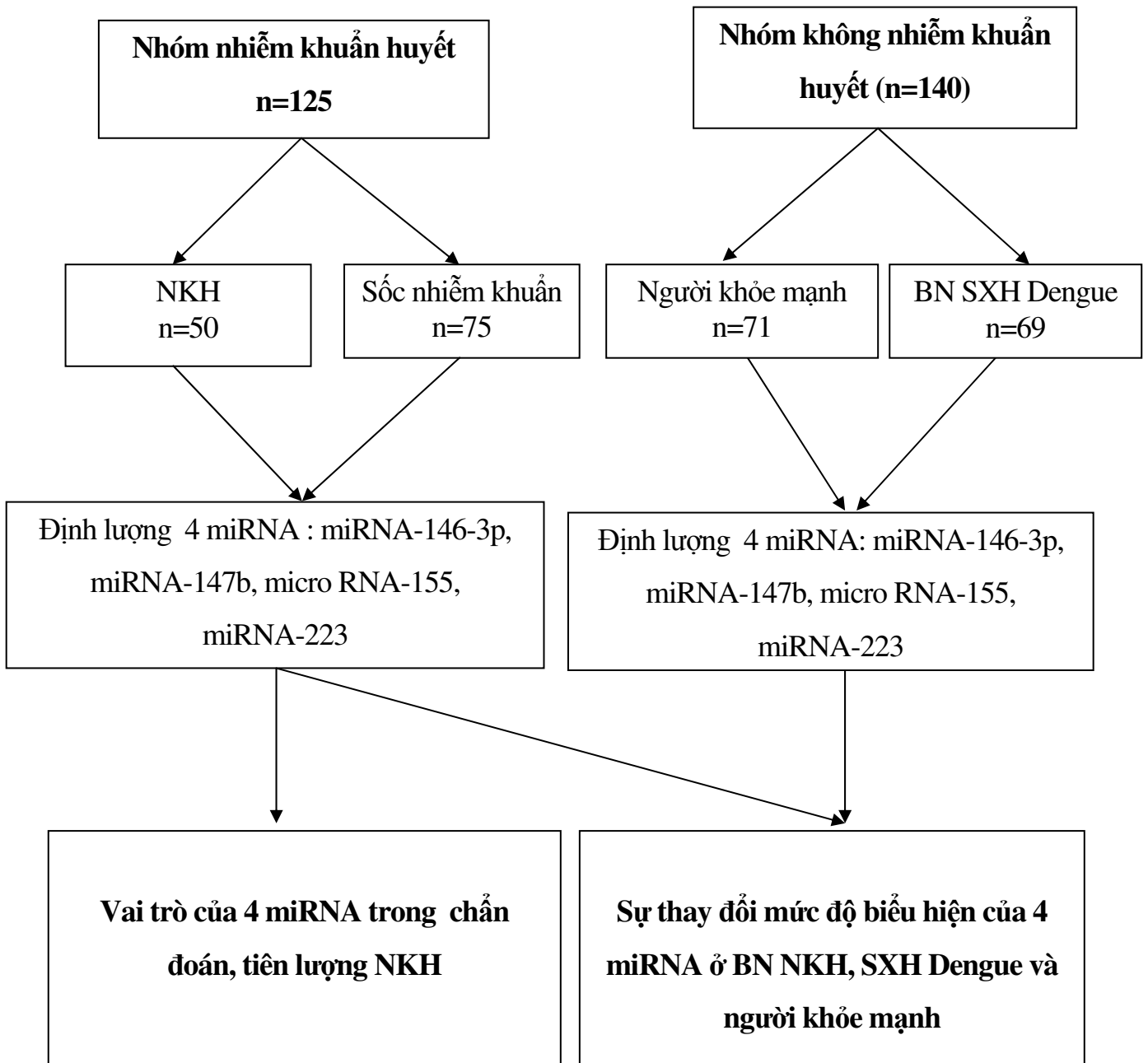
Đối tượng nghiên cứu được tư vấn về vấn đề nghiên cứu

Các thông tin có được do đối tượng nghiên cứu cung cấp hoặc được thu thập từ hồ sơ bệnh án được giữ bí mật.

Nghiên cứu chỉ sử dụng các kết quả xét nghiệm cơ bản nhằm mục đích chẩn đoán, tiên lượng điều trị bệnh nhân mà không sử dụng bất kỳ một thủ thuật xâm lấn hay can thiệp vào quá trình chẩn đoán và điều trị bệnh.

Kết quả nghiên cứu được ghi nhận nhưng không can thiệp làm thay đổi kết quả chẩn đoán và phương thức điều trị bệnh nhân.

Bệnh nhân không phải chi trả bất kỳ một khoản nào liên quan đến xét nghiệm nghiên cứu.



*Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu*



**Chương 3**  
**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**3.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng**

**3.1.1. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

*Bảng 3.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết*

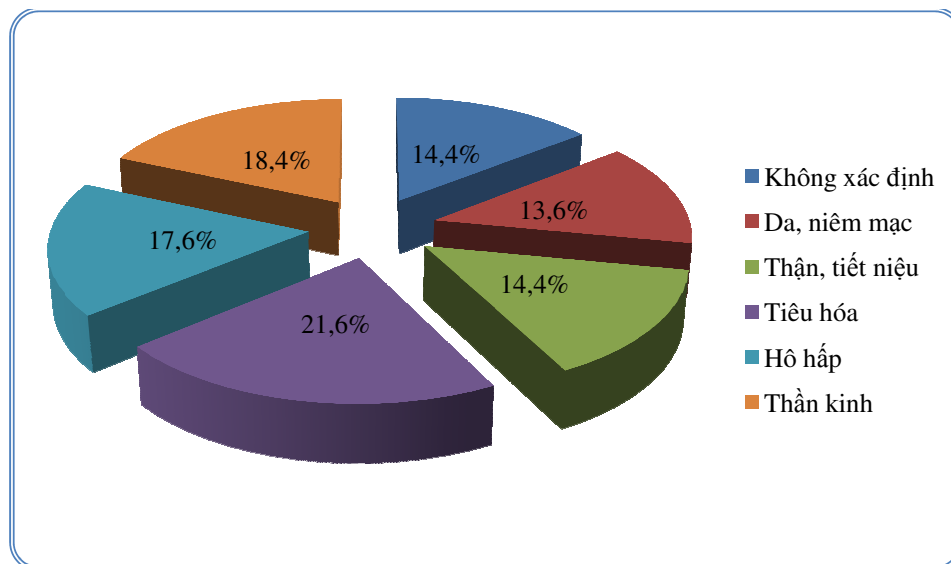
Đặc điểm	Số bệnh nhân (n=125)	Tỷ lệ (%)
Tuổi (X±SD) (năm) (nhỏ nhất – lớn nhất)	57,6 ± 17,5 (18-87)	
Giới (nam)	90	72,6
Thời gian khởi phát bệnh (ngày)	3 (1- 7)	
Thời gian nằm viện (ngày)	12 (5 - 19)	
Điểm SOFA (điểm)	6,1±4,1	
Thở máy	37	29,6
Lọc máu	27	21,6
Cấy máu dương tính	100	80
Sốc nhiễm khuẩn	50	40
Tử vong	45	36,0

Nhận xét: Tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân NKH là 57,6 năm (thấp nhất là 18 tuổi, cao nhất là 87 tuổi). Đa phần là nam giới (72,6%). Tỷ lệ bệnh nhân phải thở máy và lọc máu lần lượt là 29,6% và 21,6%. Tỷ lệ SNK và tử vong chung của nhóm nghiên cứu lần lượt là 40% và 36,0%.

**Bảng 3.2. Các bệnh lý nền ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

Đặc điểm		Số bệnh nhân (n=125)	Tỷ lệ (%)
Không mắc bệnh lý nền		39	31,2
Có mắc bệnh lý nền		86	68,8
Bệnh lý nền	Đái tháo đường	32	37,2
	Tăng huyết áp	24	27,9
	Bệnh lý tiêu hóa	16	18,6
	Bệnh lý miễn dịch	19	22,1
	Bệnh lý thần kinh	7	8,1
	Bệnh lý hô hấp	5	5,8
	Bệnh lý thận-tiết niệu	2	2,3

Nhận xét: Số BN mắc ít nhất 1 bệnh lý nền chiếm 68,8%. Đái tháo đường, tăng huyết áp là những bệnh lý hay gặp nhất (37,2% và 27,9%).

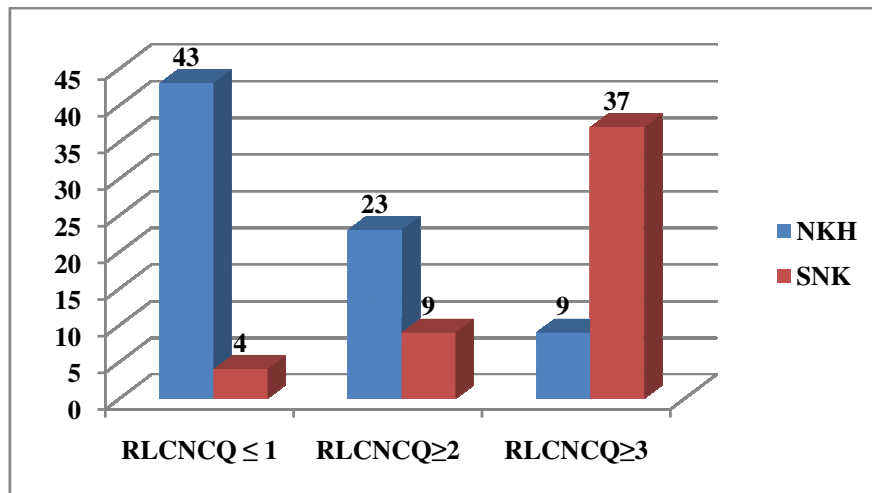
**Biểu đồ 3.1. Ổ nhiễm khuẩn tiên phát của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

Nhận xét: Ổ nhiễm khuẩn tiên phát hay gặp là tiêu hóa (21,6%), thần kinh (18,4%) và hô hấp (17,6%). Có 14,4% BN không xác định được ổ nhiễm khuẩn tiên phát.

**Bảng 3.3. Đặc điểm suy chức năng các cơ quan**

Suy chức năng cơ quan	Số bệnh nhân (n=125)	Tỷ lệ (%)
Tim mạch	51	40,8
Hô hấp	46	36,8
Gan	41	32,8
Thận	35	28,0
Đông máu	33	26,4
Thần kinh	27	21,6

Nhận xét: Biểu hiện suy chức năng cơ quan hay gặp nhất là suy chức năng tim mạch (40,8%), tiếp theo suy hô hấp (36,8%), suy chức năng gan (32,8%). Rối loạn chức năng đông máu và thần kinh là 26,4% và 21,6%.

**Biểu đồ 3.2. Rối loạn chức năng các cơ quan ở bệnh nhân nghiên cứu**

Nhận xét: Ở nhóm sốc nhiễm khuẩn, tỷ lệ suy tạng từ 3 tạng trở lên chiếm tỷ lệ cao nhất với 37/50(74,0%), ở nhóm nhiễm khuẩn huyết, tỷ lệ suy dưới 1 tạng hay gặp hơn với 43/75 (57,3%) ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. Một số đặc điểm cận lâm sàng

**Bảng 3.4. Đặc điểm xét nghiệm huyết học**

Chỉ số	Giá trị	Số bệnh nhân (n=125)	Tỷ lệ (%)	$\bar{X} \pm SD$
<b>Hb (g/L)</b>	$\geq 120$	63	50,4	120,2 $\pm$ 22,5
	$\geq 90 - < 120$	44	35,2	
	$< 90$	18	14,4	
<b>Hồng cầu (T/L)</b>				3,9 $\pm$ 0,8
<b>Bạch cầu (G/L)</b>	$< 4$	8	6,4	15,5 $\pm$ 9,7
	$\geq 4 - < 10$	31	24,8	
	$\geq 10$	86	68,8	
<b>Tỷ lệ (%) bạch cầu đa nhân trung tính</b>				82,1 $\pm$ 14,5
<b>Tiểu cầu (G/L)</b>	$\geq 150$	53	42,4	155,2 $\pm$ 115,3
	$\geq 100 - < 150$	25	20,0	
	$\geq 50 - < 100$	21	16,8	
	$< 50$	26	20,8	

Nhận xét: 49,6% BN có nồng độ Hb  $< 120$  g/L. Số lượng bạch cầu trung bình là 15,5  $\pm$  9,7 G/L, phần lớn bệnh nhân có số lượng bạch cầu  $> 10$  G/L (68,8%). Có 57,6% bệnh nhân có tiểu cầu giảm  $< 150$  G/L, trong đó 20,8% số bệnh nhân có tiểu cầu  $< 50$  G/L.

**Bảng 3.5. Đặc điểm xét nghiệm sinh hóa máu**

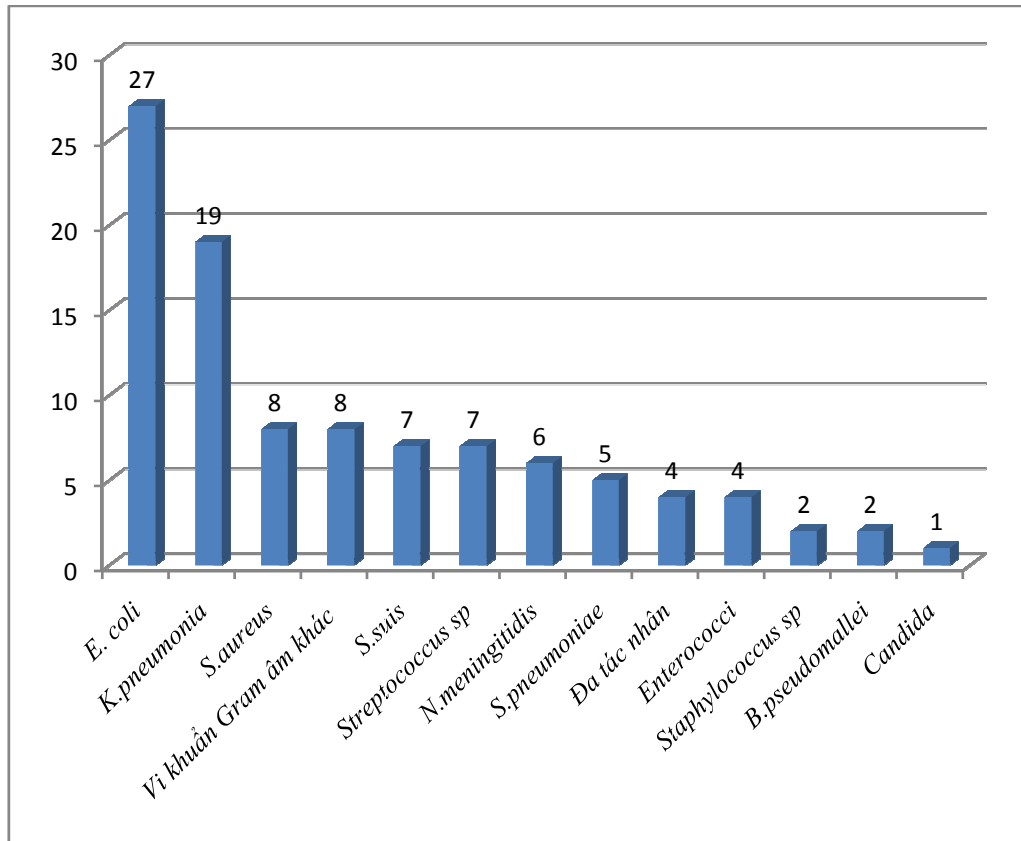
Chỉ số	Giá trị	Số bệnh nhân (n=125)	Tỷ lệ (%)	$\bar{X} \pm SD$ (min – max)
	AST (U/L)	<40	48	38,4
≥40		77	61,6	
ALT (U/L)	<40	37	29,6	88,6±98,9 (8-639)
	≥40	88	70,4	
BilirubinTP ( $\mu\text{mol/l}$ )	<20	64	51,2	45,5±82,3 (5-744)
	≥20	61	48,8	
Creatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	<120	66	52,8	158,7±157,1 (25-1194)
	≥120	59	47,2	

Nhận xét: Đa số BN có gia tăng hoạt độ AST và ALT (61,6% và 70,4%). Có 46,7% BN có nồng độ bilirubin TP $\geq$ 20 $\mu\text{mol/l}$ . Phần lớn BN có nồng độ creatinin huyết thanh <120  $\mu\text{mol/L}$  (52,8%).

**Bảng 3.6. Kết quả xét nghiệm lactat máu động mạch và Procalcitonin**

Chỉ số	Giá trị	Số bệnh nhân (n=86)	Tỷ lệ (%)	$\bar{X} \pm SD$ (min – max)
	Lactat (mmol/l)(n =86)	<2	21	24,4
≥2		65	75,6	
Procalcitonin (ng/ml)(n=125) (Trung vị, tứ phân vị)				15,4(4,9-48,1)

Nhận xét: 75,6% BN có nồng độ lactat máu động mạch >2 mmol/l. Nồng độ Procalcitonin trung bình là 15,4 (4,9-48,1) ng/ml.

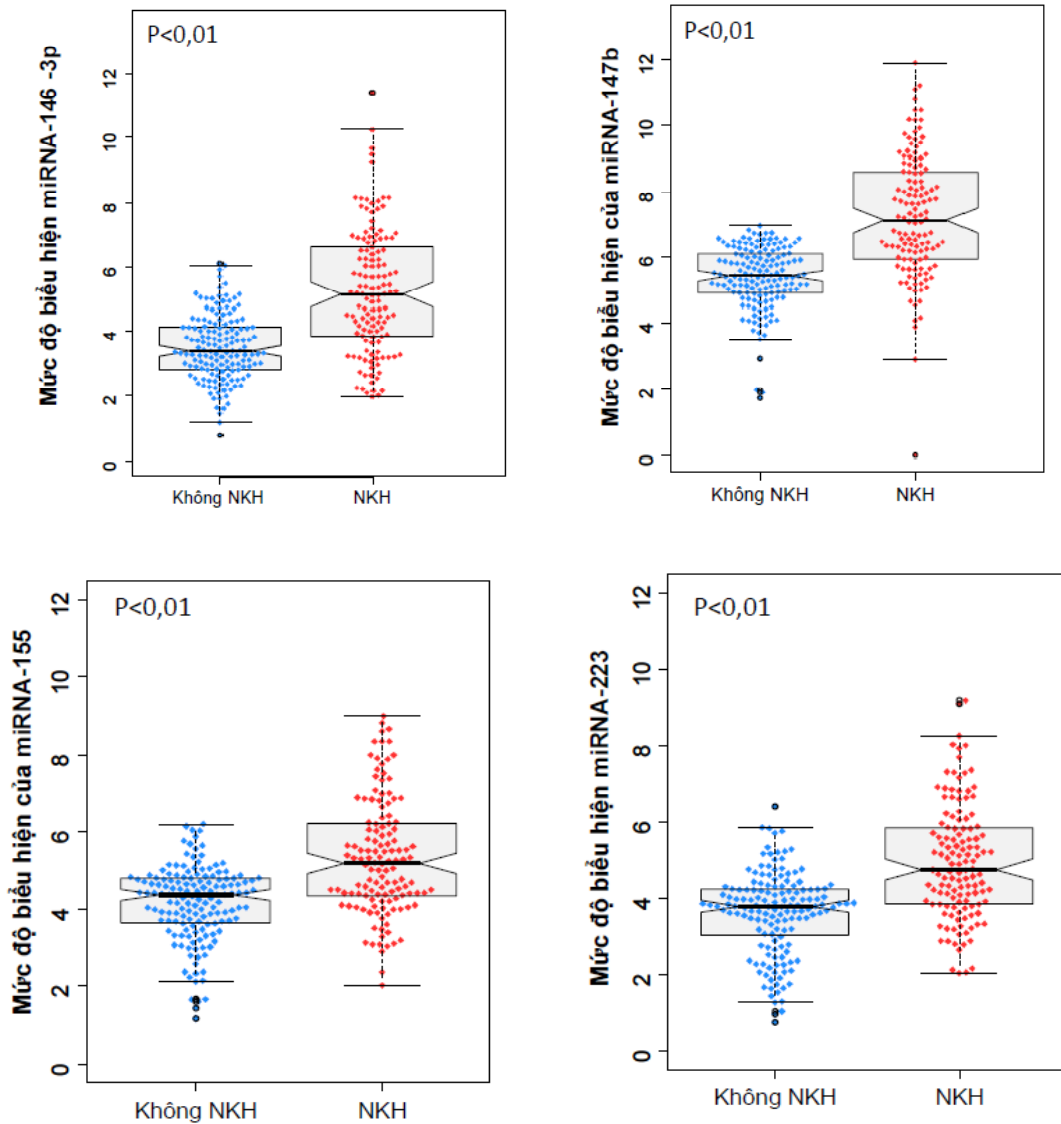


***Biểu đồ 3.3. Tác nhân được phát hiện trong máu***

Nhận xét: Căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết hay gặp nhất là nhóm khuẩn gram âm đường ruột (*E.coli*, *K.pneumonia*...). Căn nguyên gram dương hay gặp là *S.aureus*, *S.pneumoniae*, *S.suis*, *Enterococcus sp*. Có 4 mẫu máu phát hiện được đa tác nhân.

### 3.2. Mức độ biểu hiện của các miRNA

#### 3.2.1. Mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết so với nhóm chứng.



**Biểu đồ 3.4: Mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân NKH và nhóm chứng (không NKH)**

Nhận xét: Mức độ biểu hiện của 4 miRNA ở nhóm có NKH cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (người khỏe mạnh và BN SXH Dengue ( $p < 0,01$ )).

**Bảng 3.7. So sánh mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với người khỏe mạnh**

miRNA	Nhóm nghiên cứu		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	NKH (n=125)	Người khỏe mạnh (n=71)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,02(0,0007-0,63)	0,0002(0,00007-0,001)	0,000
<b>miRNA-147b</b>	2,12(0,07-50,07)	0,0173(0,0059-0041)	0,000
<b>miRNA-155</b>	0,023(0,002-0,24)	0,0025(0,00076-0,0072)	0,000
<b>miRNA-223</b>	0,0055(0,0008-0,06)	0,0008(0,0004-0,0014)	0,000

Nhận xét: Mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p huyết tương ở nhóm NKH là 0,020, cao hơn so với nhóm người khỏe mạnh là 0,0002 với  $p < 0,05$ .

Mức độ biểu hiện của miRNA-147b huyết tương ở nhóm NKH là 2,12 cao hơn so với nhóm người khỏe mạnh là 0,0173) với  $p < 0,05$ .

Mức độ biểu hiện của miRNA-155 huyết tương ở nhóm NKH là 0,023, cao hơn so với nhóm người khỏe mạnh (0,0025) với  $p < 0,05$ .

Mức độ biểu hiện của miRNA-223 ở nhóm NKH là 0,0055, cao hơn so với nhóm người khỏe mạnh (0,0008) với  $p < 0,05$ .



**Bảng 3.8. So sánh mức độ biểu hiện của các miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue**

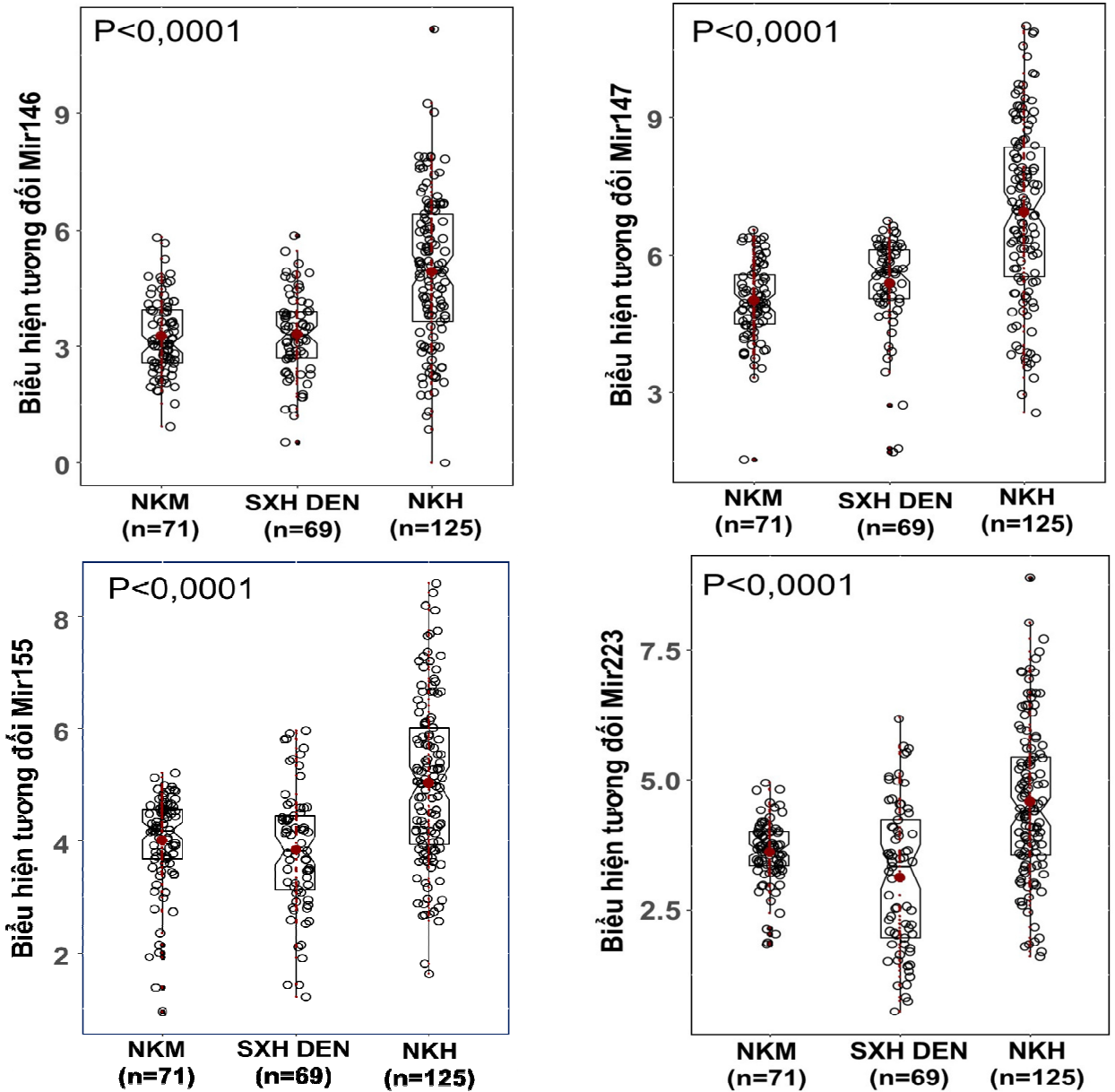
miRNA	Nhóm nghiên cứu		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	NKH (n=125)	SXH Dengue (n=69)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,02(0,0007-0,63)	0,0004(0,0001-0,002)	0,000
<b>miRNA-147b</b>	2,12(0,07-50,07)	0,091(0,021-0,290)	0,000
<b>miRNA-155</b>	0,023(0,002-0,24)	0,0014(0,0003-0,0065)	0,000
<b>miRNA-223</b>	0,0055(0,0008-0,06)	0,0005(0,00001-0,0044)	0,000

Nhận xét: Mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p huyết tương ở nhóm NKH là 0,020, cao hơn so với nhóm SXH Dengue (0,0004) với  $p < 0,01$ .

Mức độ biểu hiện của miRNA-147b huyết tương ở nhóm NKH là 2,12, cao hơn so với nhóm SXH Dengue (0,091) với  $p < 0,01$ .

Mức độ biểu hiện của miRNA-155 huyết tương ở nhóm NKH là 0,023, cao hơn so với nhóm SXH Dengue (0,0014) với  $p < 0,01$ .

Mức độ biểu hiện của miRNA-223 huyết tương ở nhóm NKH là 0,0055, cao hơn so với nhóm SXH Dengue (0,0005) với  $p < 0,01$ .



***Biểu đồ 3.5. Mức độ biểu hiện của 4 miRNA huyết tương ở người khỏe mạnh, bệnh nhân SXH Dengue và nhiễm khuẩn huyết***

Nhận xét: Mức độ biểu hiện so với nội chuẩn miRNA-16 của cả 4 miRNA (miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223) huyết tương ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bệnh nhân SXH Dengue và người khỏe mạnh ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 3.9. Mối tương quan giữa các miRNA với tuổi ở từng nhóm nghiên cứu**

MiRNA	Nhóm Người khỏe mạnh (n=72)		SXH Dengue (n=68)		NKH (n=125)	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
MiRNA-146-3P	0,17	0,16	0,005	0,06	0,14	0,12
MiRNA-147	0,16	0,17	0,63	0,63	0,15	0,08
MiRNA-155	-0,20	0,08	-0,17	0,16	0,16	0,09
MiRNA-223	-0,11	0,35	-0,009	0,94	0,12	0,18

Nhận xét: Không có mối tương quan giữa tuổi của bệnh nhân nghiên cứu với mức độ biểu hiện của 4 miRNA (Kiểm định Pearson với  $r \leq 2$ ,  $p > 0,05$ ).

### 3.2.2. Liên quan mức độ biểu hiện của miRNA với biểu hiện lâm sàng

**Bảng 3.10. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết có bệnh lý nền.**

miRNA	Bệnh lý nền		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	Mắc (n=83)	Không mắc (n=42)	
miRNA-146-3p	0,008 (0,0002-0,216)	0,008 (0,0005-0,311)	0,14
miRNA-147b	0,470 (0,0308-28,44)	1,000 (0,064-17,645)	0,14
miRNA-155	0,006 (0,0064-0,136)	0,002 (0,00156-0,154)	0,42
miRNA-223	0,003 (0,0002-0,037)	0,004 (0,0008-0,0507)	0,38

Nhận xét: Không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện 4 miRNA ở nhóm có bệnh lý nền so với nhóm không mắc bệnh lý nền ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.11. Mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p và miRNA-147b theo vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát**

<b>Ổ nhiễm khuẩn tiên phát</b>	<b>MiRNA-146-3p</b> Trung vị ( <i>tứ phân vị</i> )	<b>MiRNA-147b</b> Trung vị ( <i>tứ phân vị</i> )
Không xác định (n= 18)	0,03125 (0,00204-0,61168)	2,59523 (0,0666-67,828)
Da, niêm mạc (n=17)	0,00643 (0,0007-0,4190)	6,868 (0,0981- 37,456)
Hô hấp (n=22)	0,26045 (0,00210-1,0717)	17,645 (0,8099-261,686)
Tiêu hóa (n=27)	0,0279 (0,000169-0,6877)	6,4980 (0,0268-71,506)
Tiết niệu (n=18)	0,002456 (0,00021-0,13162)	0,3358 (0,0799-8,3790)
Thần kinh (n=23)	0,004157 (0,00022-0,0748)	0,48971 (0,03349-7,78123)
p	0,19	0,29

Nhận xét: Không có sự thay đổi về mức độ biểu hiện của miRNA-146-3P, miRNA-147b ở bệnh nhân NKH theo ổ nhiễm khuẩn tiên phát ( $p>0,05$ ).

**Bảng 3.12. Mức độ biểu hiện miRNA-155 và miRNA-223 theo vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát**

<b>Ổ nhiễm khuẩn tiên phát</b>	<b>MiRNA-155</b> Trung vị ( <i>tứ phân vị</i> )	<b>MiRNA-223</b> Trung vị ( <i>tứ phân vị</i> )
Không xác định (n= 18)	0,02587 (0,00504-0,12228)	0,01839(0,00103-0,1005)
Da, niêm mạc (n=17)	0,0252 (0,000911-0,1843)	0,00612(0,00037-0,1096)
Hô hấp (n=22)	0,11435 (0,007366-1,000)	0,0283(0,00134-0,667)
Tiêu hóa (n=27)	0,0245 (0,001419-0,30145)	0,008789(0,000911-0,0497)
Tiết niệu (n=18)	0,00444 (0,00162-0,0985)	0,00413(0,00112-0,07527)
Thần kinh (n=23)	0,004128 (0,00034-0,02179)	0,0022(0,00034-0,02179)
p	0,9	0,4

Nhận xét: Không có sự thay đổi về mức độ biểu hiện của miRNA-155 và miRNA-223 ở bệnh nhân NKH theo vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát ( $p>0,05$ ).

### 3.2.3. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA với suy chức năng cơ quan

**Bảng 3.13. Mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH có suy hô hấp**

miRNA	Suy hô hấp		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	Có suy (n=46)	Không suy (n=79)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,034(0,0025-1,018)	0,0075(0,0002-0,2606)	0,028
<b>miRNA-147b</b>	7,732(0,456-100,480)	0,6925(0,0308-16,912)	0,019
<b>miRNA-155</b>	0,042(0,0046-0,751)	0,0089(0,0013-0,136)	0,030
<b>miRNA-223</b>	0,0113(0,00134-0,475)	0,0043(0,0005-0,0415)	0,046

Nhận xét: Mức độ biểu hiện 4 miRNA ở bệnh nhân NKH có suy hô hấp cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không có suy hô hấp ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 3.14. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH có rối loạn chức năng tim mạch**

miRNA	Rối loạn chức năng tim mạch		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	Có RLCN (n=51)	Không RLCN (n=74)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,0621(0,0013-1,00)	0,0060(0,0006-0,228)	0,13
<b>miRNA-147b</b>	7,78(0,057-187,403)	0,67(0,067-18,54)	0,09
<b>miRNA-155</b>	<b>0,0418(0,0032-1,000)</b>	<b>0,008(0,0005-0,12)</b>	<b>0,04</b>
<b>miRNA-223</b>	0,008(0,0005-0,12)	0,0044(0,0008-0,056)	0,70

Nhận xét: Mức độ biểu hiện của miRNA-155 ở bệnh nhân NKH có rối loạn chức năng tim mạch cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không rối loạn chức năng tim mạch. Mức độ biểu hiện 3 miRNA còn lại ở bệnh nhân NKH có rối loạn chức năng tim mạch cao hơn không có ý nghĩa so với nhóm không rối loạn chức năng tim mạch.

**Bảng 3.15. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH  
Có rối loạn chức năng thận**

miRNA	Rối loạn chức năng thận		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	Có RLCN (n=34)	Không RLCN (n=91)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,063 (0,0016-2,89)	0,006 (0,0005-0,36)	0,051
<b>miRNA-147b</b>	<b>8,86 (0,27-297,78)</b>	<b>0,074 (0,056-35,26)</b>	<b>0,048</b>
<b>miRNA-155</b>	<b>0,035 (0,004-1,07)</b>	<b>0,009 (0,002-0,14)</b>	<b>0,046</b>
<b>miRNA-223</b>	0,018 (0,0008-0,78)	0,003 (0,0005-0,067)	0,096

Nhận xét: miRNA-147b, miRNA-155 có mức độ biểu hiện ở nhóm NKH có suy thận cao hơn so với nhóm NKH không suy thận ( $p < 0,05$ )

### 3.2.4. Sự thay đổi biểu hiện của miRNA theo mức độ nhiễm khuẩn huyết

**Bảng 3.16. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA theo mức độ nhiễm khuẩn huyết**

miRNA	Mức độ bệnh		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	Sốc nhiễm khuẩn (n=50)	Nhiễm khuẩn huyết (n=75)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,105(0,006-4,026)	0,0036(0,0002-0,085)	0,0003
<b>miRNA-147b</b>	14,477(0,675-420,44)	0,47(0,031-10,93)	0,0001
<b>miRNA-155</b>	0,075(0,0064-1,392)	0,0067(0,001-0,079)	0,0015
<b>miRNA-223</b>	0,020(0,002-0,573)	0,003(0,0005-0,0354)	0,0073

Nhận xét: Mức độ biểu hiện của 4 miRNA ở nhóm SNK cao hơn có ý nghĩa so với nhóm NKH ( $p < 0,01$ ).

**3.2.5. Mức độ biểu hiện miRNA ở BN NKH theo kết quả phát hiện tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết**

**Bảng 3.17. Mức độ biểu hiện của miRNA theo kết quả phát hiện tác nhân**

miRNA	Kết quả phát hiện tác nhân Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		P
	Dương tính (n=100)	Âm tính (n=25)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,021(0,001-0,435)	0,0026(0,0002-0,487)	0,26
<b>miRNA-147b</b>	1,986(0,111-53,445)	0,805(0,004-20,558)	0,25
<b>miRNA-155</b>	0,023(0,0028-0,172)	0,0103(0,001-0,4595)	0,36
<b>miRNA-223</b>	0,0056(0,0013-0,067)	0,0054(0,0003-0,078)	0,42

Nhận xét: Không có sự thay đổi về mức độ biểu hiện 4 của miRNA ở nhóm phát hiện được tác nhân gây NKH so với nhóm không phát hiện được tác nhân ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.18. Mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH theo nhóm tác nhân gây bệnh**

miRNA	Nhóm tác nhân Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		P
	VK Gram dương (n=34)	VK Gram âm (n=66)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,031(0,004-0,614)	0,017(0,00044-0,349)	0,18
<b>miRNA-147b</b>	2,595(0,383-71,882)	1,756(0,0615-27,188)	0,27
<b>miRNA-155</b>	0,027(0,0041-0,311)	0,0185(0,0017- 0,1314)	0,17
<b>miRNA-223</b>	0,006(0,0021-0,123)	0,005(0,0009-0,066)	0,45

Nhận xét: Không thấy sự thay đổi về mức độ biểu hiện của cả 4 miRNA ở nhóm NKH do vi khuẩn Gram âm với nhóm NKH do vi khuẩn Gram dương.

### 3.2.6. Mức độ biểu hiện của miRNA theo kết quả điều trị

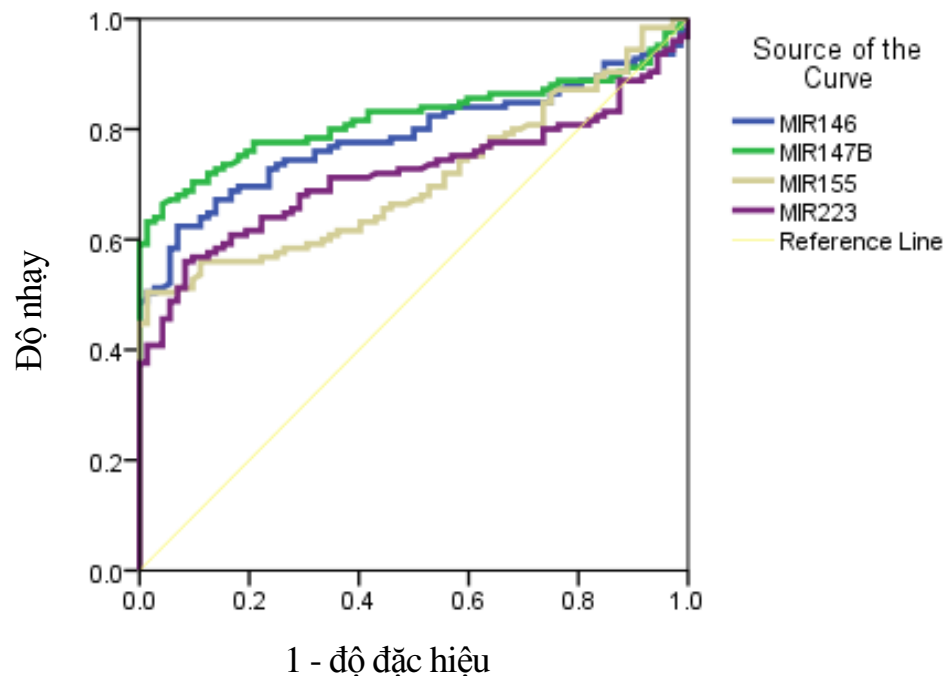
**Bảng 3.19. Mức độ biểu hiện của miRNA theo kết quả điều trị**

miRNA	Kết quả điều trị		P
	Trung vị (Khoảng tứ phân vị)		
	Khỏi (n=80)	Tử vong (n=45)	
<b>miRNA-146-3p</b>	0,007(0,0006-0,2606)	0,032(0,0009-1,000)	0,20
<b>miRNA-147b</b>	0,747(0,081-23,425)	7,16(0,032-228,06)	0,18
<b>miRNA-155</b>	0,027(0,0041-0,311)	0,013(0,0016-0,136)	0,38
<b>miRNA-223</b>	0,0044(0,0012-0,0461)	0,014(0,0003-0,129)	0,73

Nhận xét: Không có sự thay đổi về mức độ biểu hiện của 4 miRNA huyết tương ở nhóm NKH có kết quả điều trị khỏi với nhóm tử vong ( $p > 0,05$ )

### 3.3. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết

#### 3.3.1. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết



**Biểu đồ 3.6. Đường cong ROC của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là người khỏe mạnh**



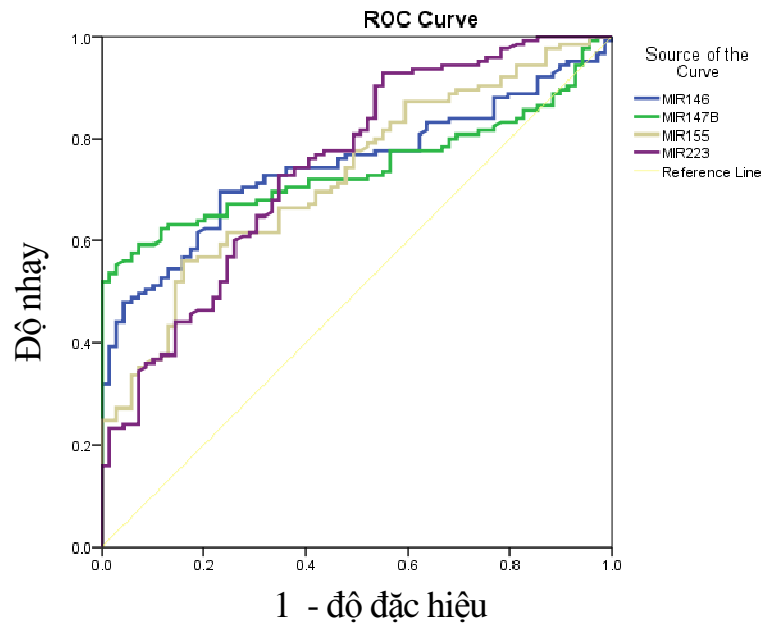
**Bảng 3.20. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là người khỏe mạnh**

<b>MiRNA</b>	<b>AUC</b>	<b>Điểm cắt</b>	<b>Độ nhạy %</b>	<b>Độ đặc hiệu %</b>
MiRNA-146-3p	0,786	0,00325	62,4	93,1
MiRNA-147b	0,821	0,2325	68,0	93,1
MiRNA-155	0,709	0,0222	50,4	98,6
MiRNA-223	0,718	0,0037	56,8	98,6

Nhận xét: Điểm cắt của miRNA-146-3p để chẩn đoán NKH là 0,00325 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,786, độ nhạy là 62,4%, độ đặc hiệu 93,1%.

Điểm cắt của miRNA-147b để chẩn đoán NKH là 0,2325 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,821, độ nhạy là 68,0%, độ đặc hiệu 93,1%,  $p < 0,01$ . Điểm cắt dùng để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết của miRNA-155 là 0,0222 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,709, độ nhạy là 50,4%, độ đặc hiệu lên tới 98,6%.

Điểm cắt dùng để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết của miRNA-223 là 0,0037 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,718, độ nhạy là 56,8%, độ đặc hiệu 98,6%.



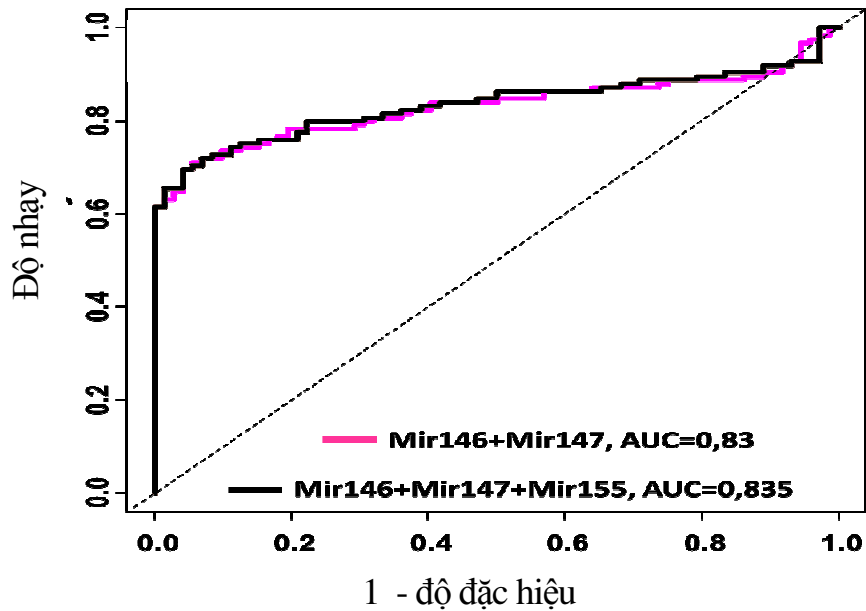
**Biểu đồ 3.7. Đường cong ROC của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là SXH Dengue**

**Bảng 3.21. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là SXH Dengue**

miRNA	AUC	Điểm cắt	Độ nhạy %	Độ đặc hiệu %
miRNA-146-3p	0,746	0,0018	69,6	76,8
miRNA-147b	0,742	0,755	55,2	97,1
miRNA-155	0,725	0,01137	56,0	84,1
miRNA-223	0,746	0,001	72,8	65,2

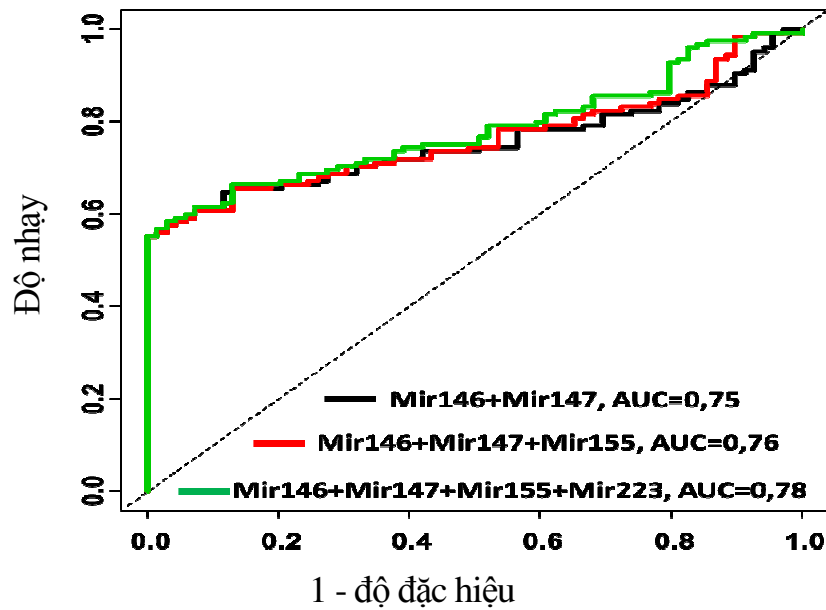
Nhận xét: Điểm cắt của miRNA-146-3p để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết là 0,0018 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,746, độ nhạy là 69,6%, độ đặc hiệu 76,8%. Điểm cắt của miRNA-147b để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết là 0,755 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,742, độ nhạy là 55,2%, độ đặc hiệu 97,1%. Điểm cắt dùng để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết của miRNA -155 là 0,01137 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,725, độ

nhảy là 56,0%, độ đặc hiệu là 84,4%. Điểm cắt dùng để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết của miRNA -223 là 0,001 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,746, độ nhạy là 72,8%, độ đặc hiệu 65,2%.



***Biểu đồ 3.8. Giá trị của các miRNA kết hợp trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là người khỏe mạnh***

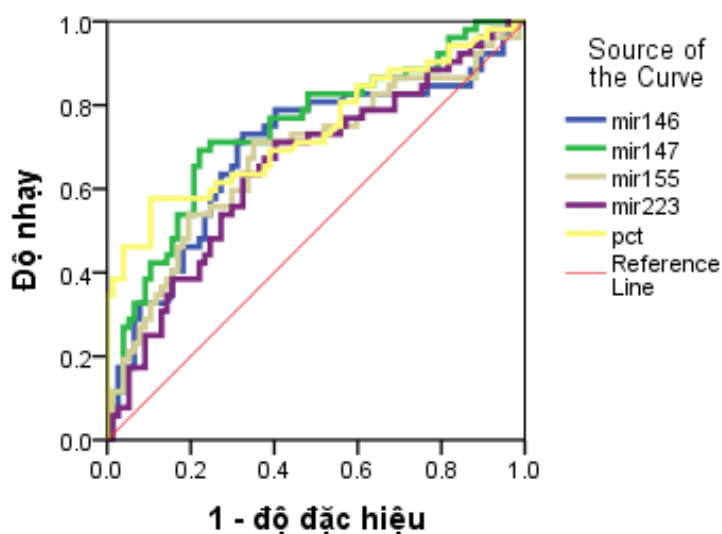
Nhận xét: Khi kết hợp miRNA-146-3p với miRNA-147b để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết thì diện tích dưới đường cong AUC là 0,83. Khi kết hợp 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 cùng nhau thì khả năng chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết so với nhóm chứng là người khỏe mạnh không khác biệt nhiều với diện tích dưới đường cong AUC là 0,835.



***Biểu đồ 3.9. Giá trị của các miRNA kết hợp trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với nhóm SXH Dengue***

Nhận xét: Khi kết hợp miRNA-146-3p với miRNA-147b để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết so với nhóm chứng là bệnh nhân SXH Dengue thì diện tích dưới đường cong AUC là 0,75. Khi kết hợp 3 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 cùng nhau thì khả năng tiên đoán nhiễm khuẩn huyết với SXH Dengue không khác biệt nhiều với diện tích dưới đường cong AUC là 0,76. Khi kết hợp cả 4 miRNAs: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 cùng nhau thì khả năng chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với SXH Dengue không khác biệt nhiều với diện tích dưới đường cong AUC= 0,78.

### 3.3.2. Giá trị của miRNA trong tiên lượng bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.



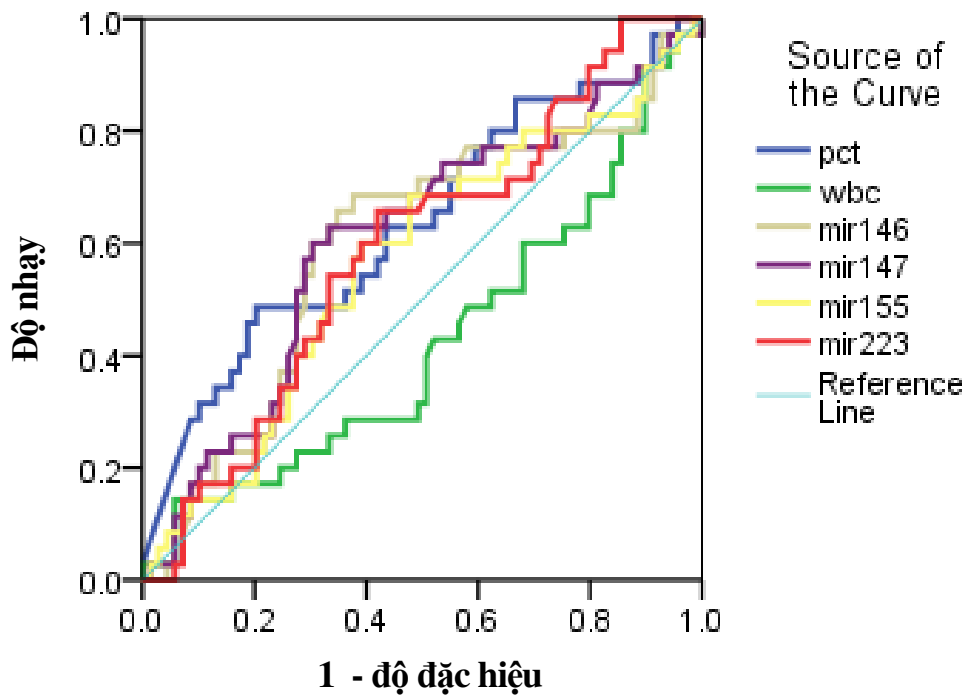
**Biểu đồ 3.10. Giá trị của miRNA và PCT trong tiên lượng sốc ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

**Bảng 3.22. Giá trị của miRNA trong tiên lượng sốc ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

miRNA	AUC	Điểm cắt	Độ nhạy %	Độ đặc hiệu %
miRNA-146-3p	0,691	0,021	70,0	68,0
miRNA-147b	0,704	4,51	68,0	72,0
miRNA-155	0,668	0,0029	90,0	42,7
miRNA-223	0,642	0,0051	70,0	60,0
PCT	0,725	44,44	57,7	89,6

Nhận xét: Điểm cắt của miRNA-146-3p để tiên lượng sốc nhiễm khuẩn huyết là 0,021 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,691, độ nhạy là 70,0%, độ đặc hiệu 68,0%. Điểm cắt của miRNA -147b để tiên lượng sốc nhiễm khuẩn là 4,51 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,704, độ nhạy là

68,0%, độ đặc hiệu 72%. Điểm cắt dùng để tiên lượng sức nhiễm khuẩn của miRNA -155 là 0,0029 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,668, độ nhạy là 90%, độ đặc hiệu lên tới 42,7%. Điểm cắt dùng để tiên lượng sức nhiễm khuẩn của miRNA -223 là 0,0051 với diện tích dưới đường cong AUC là 0,642, độ nhạy là 70%, độ đặc hiệu 60%. PCT có khả năng tiên lượng sức nhiễm khuẩn với diện tích dưới đường cong AUC là 0,725, độ nhạy là 57,7%, độ đặc hiệu 89,6%.

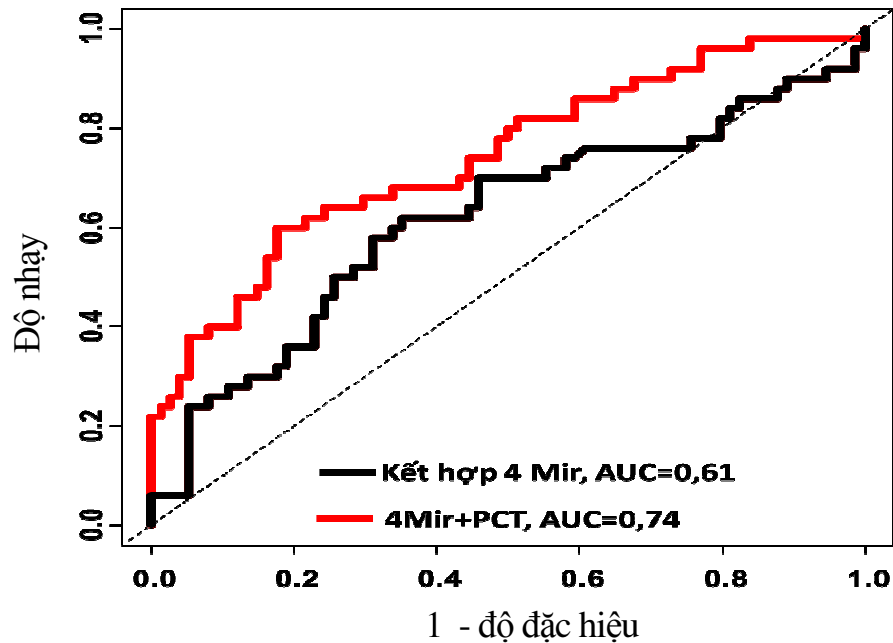


***Biểu đồ 3.11. Giá trị của miRNA, PCT, bạch cầu trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết***

**Bảng 3.23. Giá trị của miRNA, PCT, bạch cầu trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

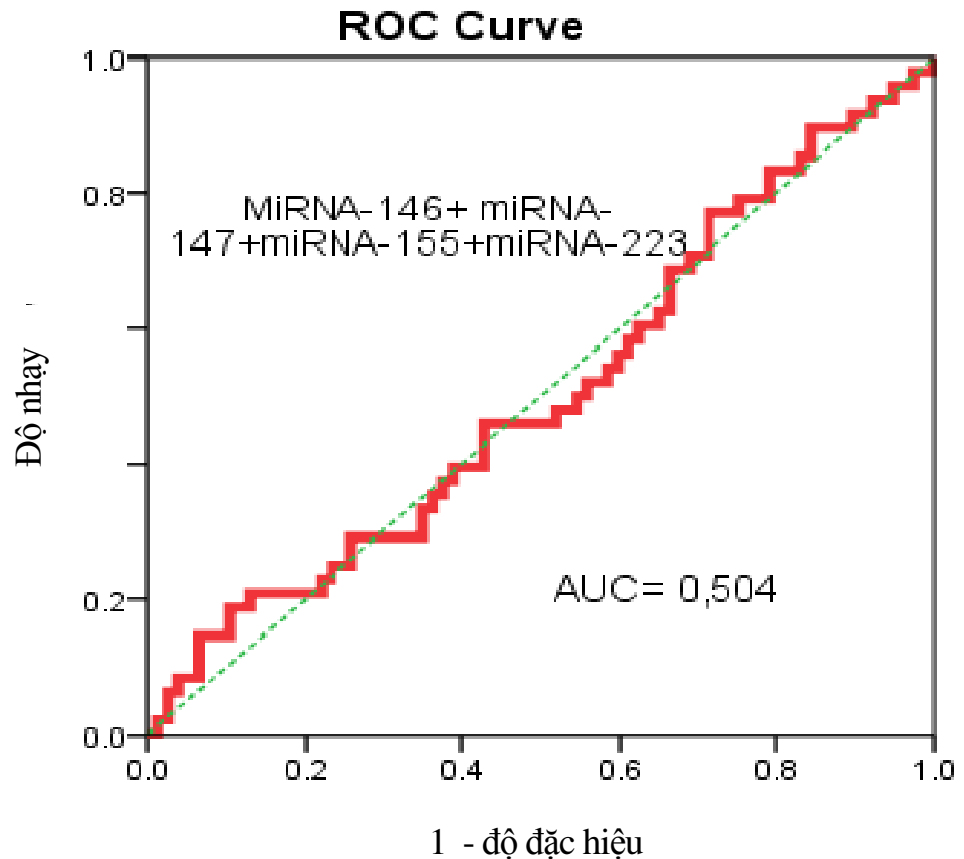
Xét nghiệm	AUC	95% CI (giá trị thấp nhất- giá trị cao nhất)
miRNA-146-3p	0,608	0,490-0,727
miRNA-147b	0,616	0,500-0,732
miRNA-155	0,578	0,461-0,695
miRNA-223	0,599	0,487-0,712
WBC(Bạch cầu)	0,460	0,353-0,567
PCT	0,618	0,532-0,764

Nhận xét: 4 miRNA (miRNA -146-3p, miRNA -147b, miRNA -155, miRNA -223) có AUC lần lượt là 0,608; 0,616; 0,578 và 0,599, xấp xỉ AUC của bạch cầu và PCT.



**Biểu đồ 3.12. Đường cong ROC của miRNA kết hợp và miRNA+PCT trong tiên lượng sức ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

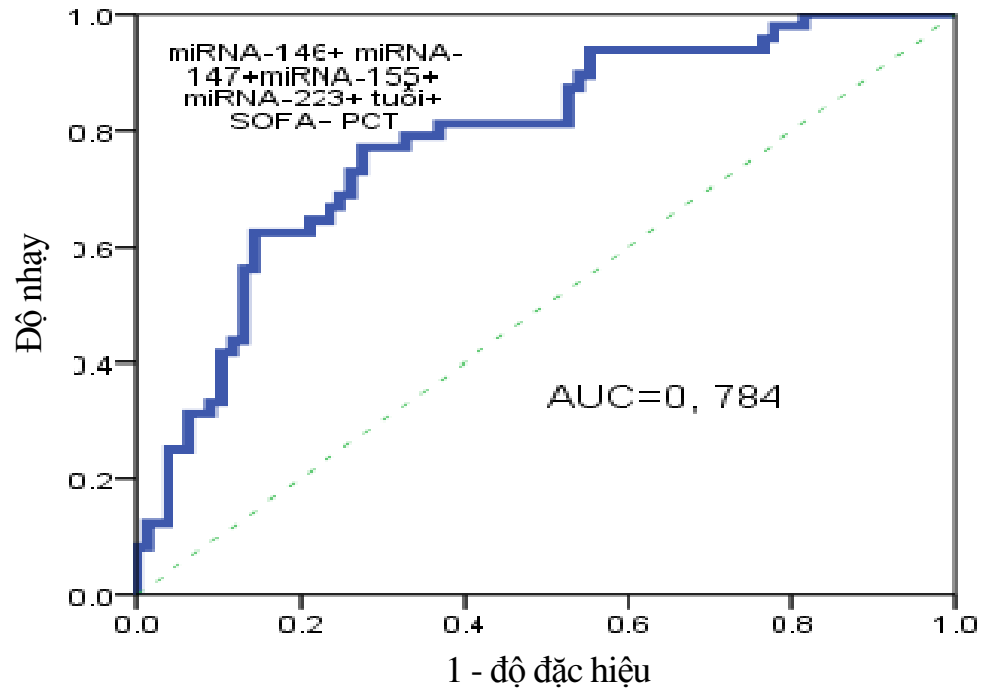
Nhận xét: Khi kết hợp cả 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 cùng nhau thì khả năng tiên đoán sức nhiễm khuẩn từ nhiễm khuẩn huyết không thay đổi với  $AUC= 0,61$ . Khi kết hợp cả 4 miRNAs: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 cùng nhau và cùng PCT thì AUC là 0,74.



***Biểu đồ 3.13. Đường cong ROC của miRNA kết hợp trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết***

Nhận xét: Sự kết hợp của 4 miRNA không có giá trị trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết (diện tích dưới đường cong  $AUC= 0,504$ ).





***Biểu đồ 3.14. Đường cong ROC của miRNA kết hợp với PCT, SOFA và tuổi trong tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết***

Nhận xét: Sự kết hợp của các miRNA với tuổi, PCT và điểm SOFA làm tăng khả năng tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với diện tích dưới đường cong AUC là 0,784.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

##### 4.1.1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

*Phân bố về tuổi và giới:*

Tỷ lệ NKH tăng lên một cách không cân xứng ở nhóm bệnh nhân lớn tuổi và cũng là một yếu tố độc lập dự báo về tỷ lệ tử vong do NKH. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng tuổi  $\geq 55$  là yếu tố nguy cơ mắc nhiều bệnh lý khác nhau, trong đó có NKH. Lý giải cho tình trạng này có thể do sự khác biệt liên quan đến tuổi tác trong chức năng miễn dịch, từ xử lý kháng nguyên không thành công của bạch cầu đến thay đổi biểu hiện của các cytokine viêm[27]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân NKH là  $57,6 \pm 17,5$  (năm) (18-87). Kết quả nghiên cứu này tương tự với tác giả Phạm Thị Ngọc Thảo nghiên cứu trên những bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết nặng có tuổi trung bình là  $58,2 \pm 18,8$  [6]. Kết quả của chúng tôi cao hơn so với tác giả Vũ Quốc Đạt nghiên cứu tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương [48 (36-60)] [116].

Nhiều nghiên cứu dịch tễ học đã chứng minh sự khác biệt về giới tính có ảnh hưởng đến sự phát triển của các biến chứng của NKH và tình trạng suy các tạng. Lý giải cho điều này, nhiều tác giả cho rằng nó liên quan đến sự khác biệt về hormone sinh dục giữa 2 giới[117]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ nam giới mắc NKH là chủ yếu (72,6%). Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của tác giả Vũ Quốc Đạt, tỷ lệ nam giới mắc NKH chiếm tỷ lệ 72,3% [116].

*Đặc điểm bệnh lý nền:*

Tỷ lệ BN có mắc ít nhất 1 bệnh lý nền chiếm 68,8%, trong đó đái tháo đường, tăng huyết áp là những bệnh lý hay gặp nhất (37,2% và 27,9%). Nhiều

nghiên cứu chỉ ra rằng bệnh lý nền là một trong những yếu tố nguy cơ làm làm tăng khả năng mắc NKH. NKH có nhiều khả năng xảy ra ở những người mắc đái tháo đường, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, ung thư, bệnh thận và gan mạn tính. Ngoài ra, cũng có một số yếu tố nguy cơ khác như cư trú tại các cơ sở chăm sóc dài hạn, suy dinh dưỡng, sử dụng thuốc ức chế miễn dịch và đặt thiết bị nhân tạo xâm nhập [28]. Kết quả này của chúng tôi cũng tương tự kết quả của một số nghiên cứu khác. Nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Thảo thấy 52% BN NKH nặng có tiền sử mắc ít nhất một trong các bệnh lý nền như đái tháo đường, bệnh gan mạn tính và ung thư[6]. Nghiên cứu của Lie và cộng sự thấy tăng huyết áp, đái tháo đường, bệnh thận mạn tính là các bệnh lý nền hay gặp ở BN NKH ở Đông Nam Á[118]. Các bệnh lý nền này làm cho chiến lược điều trị BN NKH trở nên khó khăn, phức tạp với sự tham gia của nhiều chuyên khoa liên quan, đồng thời cũng làm cho tiên lượng BN xấu đi.

*Vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát:*

Việc phát hiện ra ổ nhiễm khuẩn tiên phát là rất cần thiết, không những giúp cho chẩn đoán bệnh mà còn định hướng cho việc dự đoán căn nguyên gây bệnh, lựa chọn loại kháng sinh thích hợp trong điều trị và còn là một trong những yếu tố tiên lượng bệnh [119], [120]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, ổ nhiễm khuẩn tiên phát hay gặp là tiêu hóa (21,6%), thần kinh (18,4%) và hô hấp(17,6%). Kết quả này của chúng tôi có sự khác biệt so với các nghiên cứu khác như SOAP, Phạm Thị Ngọc Thảo với nhiễm khuẩn hô hấp là ổ nhiễm khuẩn tiên phát hay gặp nhất [6],[ 25]. Lý giải điều này, chúng tôi cho rằng có thể liên quan đến địa điểm nghiên cứu và tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân. Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện tại các khoa truyền nhiễm với đặc điểm BN NKH có nguồn gốc nhiễm khuẩn từ cộng đồng nên ổ nhiễm khuẩn tiên phát sẽ đa dạng hơn so với các nghiên cứu được tiến hành chỉ ở các đơn vị chăm sóc tích cực với nguồn gốc chủ yếu của nhiễm khuẩn huyết là từ bệnh viện [24]. Trong nghiên cứu của chúng tôi có 14,4% BN NKH không xác

định được vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát. Kết quả này gây khó khăn cho việc chẩn đoán NKH và lựa chọn kháng sinh ban đầu, do đó phần nào cũng ảnh hưởng đến kết quả điều trị BN. Đây là vấn đề tồn tại đòi hỏi việc phát triển các phương pháp chẩn đoán sớm NKH, từ đó nâng cao chất lượng điều trị, giảm tỷ lệ tử vong, hạn chế các biến chứng do NKH gây ra.

*Đặc điểm suy chức năng các cơ quan và kết quả điều trị bệnh nhân NKH:*

Bảng 3.4 và biểu đồ 3.2 cho thấy, biểu hiện rối loạn chức năng cơ quan gặp nhiều nhất trong nghiên cứu là suy chức năng tim mạch chiếm 40,8%, tiếp theo là suy hô hấp (36,8%), suy chức năng gan (32,8%). Tỷ lệ SNK ở BN NKH của nghiên cứu là 40%. Trong nhóm SNK, tỷ lệ suy tạng từ 3 tạng trở lên chiếm tỷ lệ cao nhất với 37/50(74%), ở nhóm nhiễm khuẩn huyết, tỷ lệ suy từ 1 tạng trở xuống hay gặp hơn với 43/125 (57,3%). Kết quả này tương đồng báo cáo của Jean Louis Vincent và cộng sự trong nghiên cứu SOAP với số bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết là 3.147 thì đưa ra kết quả tương tự chúng tôi với suy tuần hoàn chiếm 36,2%-62,6%, suy hô hấp chiếm 44,4%-49,8%, suy thận chiếm 49,6%-51,2%[25]. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Thảo với 82,1% bệnh nhân có suy chức năng từ 3 cơ quan trở lên, thứ tự suy của các cơ quan lần lượt là hô hấp (88,6%), tuần hoàn (83,7%), thận (69,9%), gan (49,6%). Lý giải cho sự khác biệt này, chúng tôi cho rằng do sự khác biệt về địa điểm nghiên cứu, chúng tôi thu nhận bệnh nhân từ Khoa Truyền nhiễm và Viện Truyền nhiễm, trong khi tác giả này thu thập tại khoa HSCC, nơi thu nhận những bệnh nhân nặng và rất nặng đe dọa nghiêm trọng đến tính mạng bệnh nhân. Mức độ suy các tạng được đánh giá với nhiều hệ thống thang điểm khác nhau, dựa vào sự thay đổi kết quả lâm sàng, dữ liệu xét nghiệm hoặc can thiệp điều trị. Tuy nhiên, thang điểm đang được sử dụng phổ biến hiện nay là SOFA. Theo đồng thuận quốc tế lần thứ 3 về NKH thì SOFA là thang điểm đánh giá mức độ suy tạng đe dọa đến tính mạng; gia tăng điểm SOFA  $\geq 2$  làm tăng tỷ lệ tử vong  $\geq 10\%$  [1].

Cũng trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ SNK và tử vong chung của nhóm nghiên cứu lần lượt là 40% và 36,0%. Kết quả này cũng tương tự như kết quả của các nghiên cứu khác trên thế giới. Tỷ lệ tử vong do NKH và SNK được trích dẫn dao động từ 20% đến 50%. Các thử nghiệm lâm sàng từ thập kỷ trước cho thấy tỷ lệ tử vong liên quan đến SNK nằm trong khoảng từ 24% đến 41% [121], [122], [123], [124]. Trong một nghiên cứu về NKH ở 172 đơn vị hồi sức tích cực ở Australia và New Zealand giai đoạn từ 2000 đến 2013 cho thấy tỷ lệ tử vong ở nhóm NKH có SIRS là 36,1% và 27,7% ở nhóm NKH không có SIRS [125]. Nghiên cứu của tác giả Rangel-Frausto cho thấy tỷ lệ tử vong tăng dần ở các nhóm bệnh nhân SIRS, NKH, NKH nặng, SNK với tỷ lệ lần lượt là 7%, 16%, 20%, và 46% [126]. Một nghiên cứu lưu ý rằng tỷ lệ tử vong tại bệnh viện do NKH ở Hoa Kỳ (28%) thấp hơn đáng kể so với ở châu Âu (41%) nhưng khi được điều chỉnh theo mức độ nghiêm trọng của bệnh thì không có sự khác biệt đáng kể [123].

#### ***4.1.2. Đặc điểm cận lâm sàng nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết***

##### *Đặc điểm xét nghiệm huyết học:*

Sự thay đổi số lượng BC là biểu hiện thường gặp ở BN NKH nặng. Số lượng BC  $\geq 12,0 \times 10^9/L$ ,  $\leq 4,0 \times 10^9/L$ , hoặc chuyển trái với  $>10\%$  tế bào non ở máu ngoại vi là một trong bốn tiêu chí SIRS thiết lập chẩn đoán NKH [21]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, giá trị trung bình của chỉ số bạch cầu là  $15,5 \pm 9,7$  G/L, kết quả này cũng tương tự một số nghiên cứu khác như Dong Wook Jekarl, chỉ số bạch cầu trung bình ở nhóm NKH là  $13,4 \pm 7,9$  G/L [127], tiểu cầu không thay đổi với  $227 \pm 120$  G/L, Kim Westerdijk thấy trung vị của bạch cầu ở BN NKH là  $12,7(7,8-18,6)$  G/L [128] hay Sabrina Buoro ( $13,65(12,98-14,57)$ ) G/L [129].

Chỉ số tiểu cầu là một trong 6 tiêu chuẩn đánh giá rối loạn chức năng cơ quan. Số lượng tiểu cầu trung bình ở nghiên cứu của chúng tôi là  $155,2 \pm 115,3$  G/L và có 57,6% BN có tiểu cầu giảm dưới 150 G/L. Kết quả này của

chúng tôi thấp hơn số lượng tiểu cầu ở nhóm BN NKH được lựa chọn với tiêu chuẩn cấy máu dương tính của Sridhar Mangalesh với số lượng tiểu cầu ở bệnh nhân NKH còn sống và tử vong lần lượt là  $175,69 \pm 43,07$  G/L và  $158,39 \pm 45,83$  G/L [130]. Lý giải cho sự khác biệt này, chúng tôi cho rằng sự khác biệt về tiêu chuẩn lựa chọn BN, nghiên cứu của chúng tôi lựa chọn BN theo tiêu chuẩn Sepsis-3, tức là trong tiêu chuẩn đánh giá chọn BN dựa vào điểm SOFA có 1 tiêu chuẩn là tiểu cầu  $\leq 150$  tế bào/mm<sup>3</sup>. Tuy nhiên, kết quả này cao hơn kết quả nghiên cứu của Zheng Liang-Peng (2018) với số lượng tiểu cầu ở BN NKH tại ICU là 92.50 (50.00–163.75)[131], sở dĩ có sự khác biệt này là do đối tượng nghiên cứu của chúng tôi được thu nhận chủ yếu từ các Khoa Truyền nhiễm của bệnh viện Việt Tiệp, Hải Phòng và Viện Truyền nhiễm của Bệnh viện TƯQĐ 108, trong khi đối tượng của tác giả này là ở các đơn vị chăm sóc tích cực với đặc trưng bệnh nhân đều rất nặng.

Trong nghiên cứu này có 49,6% số BN nồng độ Hb giảm  $<120$  g/L. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với cơ chế bệnh sinh và diễn biến của nhiễm khuẩn huyết, mặt khác các đối tượng bệnh nhân của chúng tôi có  $>50\%$  mắc bệnh lý nền nên thiếu máu là dấu hiệu hay gặp.

*Đặc điểm xét nghiệm sinh hóa:*

Đa số BN trong nghiên cứu của chúng tôi có sự gia tăng hoạt độ ALT và AST (61,6% và 70,4%). Có 53,3% số BN có nồng độ bilirubin toàn phần trong giới hạn bình thường và 46,7% BN có nồng độ bilirubin toàn phần  $\geq 20 \mu\text{mol/l}$ . Chỉ số creatinin máu  $\geq 120 \mu\text{mol/L}$  gặp ở 37,1% số BN. Nghiên cứu của PTN Thảo có kết quả creatinin máu cao hơn ( $2,28 \pm 1,57 \text{mg\%}$ ). Theo đó, nồng độ creatinin máu cũng thay đổi theo mức độ nặng của bệnh, ở SNK chỉ số creatinin là  $2,52 \pm 2,29 \text{mg\%}$  cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm NKH với nồng độ của creatinin là  $1,3 \pm 1,05 \text{mg\%}$  [6]. Tác giả Garcia-Simon nghiên cứu trên 64 BNNKH nặng và SNK thấy nồng độ creatinin máu trung bình là 1,6 (0,9–2,5) và không có sự khác biệt giữa nhóm BN còn sống với BN tử vong [132]. Nghiên cứu đa trung tâm của Sykes (2018) cho thấy tỷ lệ suy thận cấp gặp nhiều nhất ở BN NKH (31,8%) [133]. Nghiên cứu BEST Kidney,

SNK là nguyên nhân gây suy thận cấp thường gặp nhất (48%). Hơn nữa, theo một nghiên cứu đa trung tâm trên 120.123 BN nhập HSCC, tỷ lệ BN tổn thương thận cấp trong 24 giờ đầu nhập ICU là 27,8% và tổn thương thận cấp làm gia tăng nguy cơ tử vong cao hơn gấp 1,6 lần và tương quan với mọi giai đoạn suy thận cấp theo phân loại RIFLE [134].

*Nồng độ Procalcitonin và lactat máu động mạch:*

Nồng độ trung bình của PCT trong nghiên cứu của chúng tôi là  $30,4 \pm 36,1$  ng/ml. Kết quả này tương tự nghiên cứu đa trung tâm của Endo với nồng độ procalcitonin ở BN NKH nặng là 36,1mg/l [135]. Nghiên cứu của Dong Wook Jekarl trên 185 BN NKH thấy nồng độ PCT trung bình là  $10,2 \pm 24,5$ , thấp hơn kết quả nghiên cứu của chúng tôi [127]. Các nghiên cứu đã chứng minh nồng độ PCT tăng ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết [136],[ 137] và có thể đặc biệt hữu ích trong việc phân biệt vi khuẩn với các dạng nhiễm trùng khác [138]. Trong một phân tích gộp có tính hệ thống và tổng quan, PCT cho thấy giá trị cao hơn trong chẩn đoán phân biệt bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết nhập viện khi so sánh với CRP (độ đặc hiệu 81% [95% CI: 67-90%]) so với 67% [95% CI: 56-77%] của CRP) để phân biệt sự nhiễm khuẩn ở bệnh nhân nhập viện. Giá trị điểm cắt trung bình của PCT trong phân tích gộp này là 1.1ng/mL (khoảng tứ phân vị: 0.5-2.0 ng /ml) [139]. Tuy nhiên, chưa thống nhất được giá trị xác định của PCT hướng dẫn chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết hoặc lựa chọn kháng sinh, do vậy, độ nhạy và độ đặc hiệu của PCT để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết chịu ảnh hưởng bởi các giá trị cắt khác nhau. Các giá trị PCT cần được đánh giá thêm theo các vị trí nhiễm trùng, vật chủ và mầm bệnh khác nhau. Hiện tại, PCT cũng đang được sử dụng với vai trò định hướng sử dụng kháng sinh để giảm việc sử dụng kháng sinh không phù hợp [140],[ 141]. Tuy nhiên, mặc dù có những tác động có lợi cho phương pháp tiếp cận này đối với việc sử dụng kháng sinh trong nhiều nghiên cứu, nhưng không thấy vai trò của PCT đối với kết quả điều trị của bệnh nhân.

Kết quả nghiên cứu thấy có 75,6% BN có nồng độ lactat máu động mạch  $\geq 2$  mmol/l và nồng độ lactat máu trung bình là  $4,8 \pm 4,1$  (mmol/l). Nồng

độ lactat máu tăng là chỉ số quan trọng để đánh giá giảm tưới máu tổ chức và mô. Kết quả này cũng tương tự các nghiên cứu khác ở Việt Nam và trên thế giới như Phạm Thị Ngọc Thảo, Trần Thị Như Thúy, Vincent và cộng sự, các tác giả này đều cho kết quả nồng độ lactat máu trung bình ở BN NKH đã chỉ ra rằng sự gia tăng nồng độ lactat máu là một trong những yếu tố tiên lượng tử vong ở BN SNK[6],[16],[142]. Đặc biệt, có nghiên cứu đưa ra kết luận, đo nồng độ lactate huyết thanh trong 6 giờ có thể là một công cụ dễ dàng và hiệu quả hơn để tiên lượng điều trị BN SNK và nồng độ lactate lớn hơn hoặc bằng 2 mmol / L có độ nhạy cao nhất (85,3%)[143]. Nghiên cứu của [143] nghiên cứu nồng độ lactat và độ thanh thải lactats huyết thanh trên 1060 bệnh nhân sốc nhiễm khuẩn từ năm 2010-2016 cho thấy nồng độ lactat máu trung bình sau 6h ở bệnh nhân sốc nhiễm khuẩn còn sống thấp hơn ở nhóm tử vong (2,5mmol/l so với 4,6mmol/l). Việc đo nồng độ lactate huyết thanh thường được kết hợp trong theo dõi và điều trị bệnh hiểm nghèo, đặc biệt trong NKH và SNK [4]. Các hướng dẫn về chẩn đoán, điều trị và quản lý NKH gần đây (Sepsis-3) đã khuyến cáo với nồng độ lactat huyết thanh trên 2 mmol/L, mặc dù đã được hồi sức đầy đủ, nên được đưa vào như một tiêu chí lâm sàng mới để chẩn đoán SNK, như vậy, lactat huyết thanh thường được sử dụng để đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh, đáp ứng điều trị và tiên lượng NKH và SNK [1].

#### *Kết quả phân lập tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết*

Tất cả 125 BN nghiên cứu đều được cấy máu và/hoặc làm PCR đa môi để tìm tác nhân, có 100 mẫu dương tính với 1 hoặc cả 2 phương pháp, chiếm tỷ lệ 80%. Căn nguyên gây NKH hay gặp nhất là trực khuẩn gram âm (*Escheria coli, Klepsiella pneumonia...*). Căn nguyên gram dương hay gặp là *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus suis, Enterococcus sp.* Kết quả này tương tự như kết quả vi sinh được công bố tại hai bệnh viện này. Sự phân bố mầm bệnh gây NKH thay đổi theo thời gian. Ở Hoa Kỳ, vi khuẩn Gram dương được xác định thường xuyên nhất ở BN NKH, mặc dù số ca NKH gây ra do căn nguyên vi khuẩn Gram âm cũng chiếm một tỷ lệ



đáng kể. Ở Việt Nam cũng có nhiều nghiên cứu về việc xác định các tác nhân gây bệnh NKH. Theo Vũ Quốc Đạt và cộng sự khi nghiên cứu các đối tượng NKH điều trị tại bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương thời gian từ tháng 1/2011 tới tháng 12/2013, các mầm bệnh được phân lập chủ yếu là *Klebsiella pneumoniae*, *Escheriacoli* và *Staphylococcus aureus* với tỷ lệ lần lượt là 17,5%, 17,3% và 14,9% [116].

## **4.2. Mức độ biểu hiện miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết**

### **4.2.1. Mức độ biểu hiện miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng là người khỏe mạnh và bệnh nhân SXH Dengue**

Biểu đồ 3.4 và kết quả bảng 3.8 & 3.9 cho thấy mức độ biểu hiện của 4 miRNA ở nhóm NKH đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không NKH. Cụ thể, mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p trong huyết tương bệnh nhân NKH là 0,02, cao hơn so với nhóm chứng là người khỏe mạnh (0,0002) và bệnh nhân SXH-Dengue ((0,004)  $p < 0,005$ ). Mức độ biểu hiện của miRNA-147b trong huyết tương bệnh nhân nhiễm NKH là 2,12, cao hơn so với người khỏe mạnh (0,0173), bệnh nhân SXH Dengue (0,091) ( $p < 0,001$ ). MiRNA-155 có mức độ biểu hiện trong huyết tương bệnh nhân NKH là 0,023, cao hơn so với người khỏe mạnh (0,0025) và bệnh nhân SXH-Dengue (0,0014) ( $p < 0,001$ ). Mức độ biểu hiện của miRNA-223 trong huyết tương bệnh nhân NKH, người khỏe mạnh và SXH-Dengue lần lượt là 0,005, 0,0008, 0,0005 ( $p < 0,005$ ).

Kết quả này cũng tương đối phù hợp với các kết quả đã được công bố trên các tạp chí. Zhou, J và cộng sự phân tích 1163 miRNA trong máu ngoại biên thấy mức độ biểu hiện của các miRNA-182, miRNA-143, miRNA-145, miRNA-146a, miRNA-150 và miRNA-155 bị rối loạn điều hòa ở BN NKH. Mức độ biểu hiện của miRNA-146a tương quan nghịch với tăng biểu hiện IL-6 và tăng sinh bạch cầu đơn nhân [91]. Kết quả nghiên cứu của Vasilescu (2017) cũng cho thấy mức độ biểu hiện trung bình của các miRNA như: miRNA-146, miRNA-155, miRNA-223 ở nhóm nhiễm khuẩn huyết cao hơn nhóm chứng là người khỏe

mạnh và bệnh nhân SIRS [144]. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Andrew J. Goodwin (2015) [145]. Lina Wang xác nhận mức độ biểu hiện của miRNA-146a ở những bệnh nhân NKH cao hơn so với nhóm chứng là người khỏe mạnh [100]. Benet B Dhas thấy miRNA-223 có mức độ biểu hiện ở nhóm NKH cao hơn so với nhóm chứng là bệnh nhân SIRS và người khỏe mạnh [146]. Kết quả nghiên cứu của Benet B Dhas, Vijaya R Dirisala, và B Vishnu Bhat cũng tương tự chúng tôi với miRNA-146 và miRNA-223 ở nhóm nhiễm khuẩn huyết có mức độ biểu hiện cao hơn có ý nghĩa so với ở người khỏe mạnh, đồng thời mức độ biểu hiện của miRNA-146 cũng rất thấp ở cả nhóm nhiễm khuẩn huyết và người khỏe mạnh [146]. Nghiên cứu của Wu Y; Li C và cộng sự trên 40 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng gồm 20 SIRS và 15 người khỏe mạnh với nội chuẩn được lựa chọn là miRNA-16 cũng đưa ra kết quả miRNA-146a ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cao hơn người khỏe mạnh và SIRS [73]. Huang, J.; Sun, Z. và cộng sự cũng đưa ra kết quả mức độ biểu hiện của miRNA-146 tăng cao hơn ở nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết so với nhóm chứng là người khỏe mạnh và SIRS [96].

Chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết với các bệnh lý truyền nhiễm khác có hội chứng đáp ứng viêm hệ thống và rối loạn chức năng tạng là một việc tương đối khó khăn trên lâm sàng. Chúng tôi lựa chọn nhóm chứng là bệnh nhân SXH Dengue. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ biểu hiện của cả 4 miRNA trong huyết tương bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết đều cao hơn có ý nghĩa thống kê trong huyết tương bệnh nhân SXH Dengue ( $p < 0,01$ ).

Theo kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi thấy mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p trong huyết tương của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tăng có ý nghĩa so với trong huyết tương bệnh nhân mắc SXH-Dengue. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu khác đã được công bố. Nghiên cứu thực nghiệm trên chuột bị nhiễm khuẩn huyết của Md A Nahid và

cộng sự đã định lượng được mức độ biểu hiện của miRNA-146a tăng tới 15 lần trong 24 giờ so với chuột không bị nhiễm khuẩn huyết [147].

Lina Wang nghiên cứu trên nhóm NKH và SIRS cũng cho thấy miRNA-146 có biểu hiện ở nhóm NKH cao hơn SIRS ( $p < 0,05$ ) [100]. Mức độ biểu hiện của miRNA-146a ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cao hơn so với biểu hiện ở người khỏe mạnh [145]. Tác giả Wu, Y; Li, C (2014) nghiên cứu trên 40 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng gồm 20 SIRS và 15 người khỏe mạnh với nội chuẩn miRNA-16 cũng đưa ra kết quả miRNA-146a ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cao hơn người khỏe mạnh và SIRS [73]. Huang, J.; Sun, Z. và cộng sự cũng cho kết quả mức độ biểu hiện của miRNA-146a tăng cao hơn ở nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết so với nhóm chứng là người khỏe mạnh và SIRS [96].

Tuy nhiên, cũng có nghiên cứu đưa ra kết quả khác biệt với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, theo đó, miRNA-146 ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết có mức độ biểu hiện thấp hơn so với người khỏe mạnh [97],[ 100]. Lý giải cho kết quả này, chúng tôi cho rằng có thể liên quan đến sự khác biệt về thời điểm lấy máu để định lượng miRNA và sự khác biệt về nội chuẩn được lựa chọn. Thời điểm lựa chọn lấy máu của chúng tôi rất sớm, khi bệnh nhân nghi ngờ nhiễm khuẩn huyết có chỉ định cấy máu thì được lấy đồng thời thêm 1 mẫu máu để làm nghiên cứu, còn các nghiên cứu của các tác giả trên thì mẫu máu được lấy sau khi chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết trong vòng 24 giờ, trong khi miRNA-146-3p đã được chứng minh sự có mặt ngay ở giai đoạn sớm của nhiễm khuẩn huyết- giai đoạn khởi viêm[11]. Liên quan đến nội chuẩn, hiện tại vẫn chưa thống nhất được nội chuẩn chung để chuẩn hóa định lượng các miRNA. Trong nghiên cứu của chúng tôi miRNA-16 được sử dụng làm nội chuẩn, khác với các tác giả sử dụng U6SRN là nội chuẩn. Trong nghiên cứu của Fabian Benz về U6SRNA, tác giả này đã chứng minh rằng, mức độ của U6 lưu hành trong huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh hiểm nghèo và NKH

có thay đổi đáng kể so với nhóm chứng và nhóm có hội chứng đáp ứng viêm, từ đó kết luận rằng nồng độ U6SRNA trong huyết thanh bị rối loạn theo từng bệnh lý đặc hiệu, do đó, U6 không nên được sử dụng để chuẩn hóa dữ liệu của miRNA lưu hành trong các bệnh lý có phản ứng viêm [148]. Trong một nghiên cứu khác, tác giả Lange Tim đã nghiên cứu và khẳng định miRNA-16 là gen tham chiếu nội sinh ổn định và phù hợp nhất trong bộ dữ liệu về miRNA nội chuẩn mà nhóm nghiên cứu đã sàng lọc [149]. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thử nghiệm và lựa chọn được lựa chọn miRNA-16 làm nội chuẩn [150].

*Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết theo tuổi và tiền sử mắc bệnh lý mạn tính*

Nghiên cứu của chúng tôi chưa có sự tương đồng về tuổi ở nhóm BN NKH và nhóm chứng là BN SXH-Dengue và người khỏe mạnh, do vậy chúng tôi đã sử dụng kiểm định Pearson để đánh giá mối tương quan với tuổi với mức độ biểu hiện của 4miRNA huyết tương ở từng nhóm bệnh- chứng tương ứng (bảng 3.10), kết quả cho thấy với  $r \leq 2$ ,  $p > 0,05$  thì không có mối tương quan giữa mức độ biểu hiện của cả 4 miRNA với tuổi ở từng nhóm bệnh nhân nghiên cứu. Điều này cho thấy tuổi không ảnh hưởng đến sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA.

Bảng 3.11 đánh giá sự thay đổi mức độ biểu hiện của 4 miRNA huyết tương của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với bệnh lý mạn tính, kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của 4 miRNA (miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223) ở nhóm có bệnh lý mạn tính không có sự khác biệt với nhóm không có bệnh nền ( $p > 0,05$ ).

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ BN NKH mắc ít nhất một bệnh lý mạn tính là 68,8%, và theo một vài nghiên cứu cũng chỉ ra có một số miRNA có biểu hiện thay đổi ở người mắc bệnh mạn tính như tiểu đường, suy thận, viêm gan [17], do vậy chúng tôi đã phân tích mức độ biểu hiện của miRNA ở từng nhóm bệnh mạn tính khác nhau, kết quả cho thấy mức độ biểu

hiện của các miRNA không có sự khác biệt giữa nhóm có bệnh lý nền và nhóm không có bệnh nền ( $p > 0,05$ ). Mỗi miRNA đều có thể là mục tiêu của nhiều gen khác nhau và một miRNA có thể bị chi phối bởi nhiều gen khác nhau. MiRNA-223 là một miRNA đặc hiệu của tế bào máu với vai trò quan trọng trong sự phát triển của các dòng tủy, biệt hóa bạch cầu hạt và ức chế sự biệt hóa tế bào hồng cầu, đại thực bào trong một mô hình cụ thể, do đó ngăn chặn khỏi các tình trạng như viêm do chế độ ăn kiêng và kháng insulin [151]. MiRNA-223 có thể giảm hoạt động của đại thực bào [152], liên quan đến nhiễm khuẩn huyết, viêm khớp dạng thấp (RA), và thiếu máu cục bộ gan [153].

#### ***4.2.2. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA theo vị trí ổ nhiễm khuẩn tiên phát của nhiễm khuẩn huyết***

Xác định ổ nhiễm khuẩn ban đầu có thể giúp các bác sĩ định hướng vi khuẩn và từ đó lựa chọn kháng sinh thích hợp. Chúng tôi đã khảo sát sự thay đổi về mức độ biểu hiện của từng miRNA theo các ổ nhiễm khuẩn tiên phát khác nhau và biểu diễn kết quả trong các bảng 3.1, 3.12, 3.13, 3.14. Theo các bảng này, mức độ biểu hiện của 4 miRNA (miRNA-1463p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223) huyết tương so với nội chuẩn miRNA-16 ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết theo ổ nhiễm khuẩn ban đầu không có sự khác biệt đáng kể với  $p > 0,05$ .

Tuy nhiên, chúng tôi chỉ ghi nhận kết quả này mà không bàn luận do cỡ mẫu ít nên thống kê chưa đủ mạnh và cũng chưa loại trừ được các yếu tố nhiễu khác.

#### ***4.2.3. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết theo rối loạn chức năng cơ quan***

Rối loạn chức năng cơ quan là một trong những biến chứng nguy hiểm của nhiễm khuẩn huyết, do đó việc phát hiện sớm nguy cơ RLCNCQ ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết là rất cần thiết để tiên lượng cũng như xử trí bệnh nhân. Khảo sát mức độ biểu hiện của miRNA ở nhóm NKH có RLCN nhiều

cơ quan cao hơn có ý nghĩa so với nhóm RLCN ít cơ quan hơn. Mức độ biểu hiện của miRNA-147b, miRNA-223 tăng tỷ lệ thuận với số cơ quan bị RLCN với giá trị p lần lượt là 0,026 và 0,031. MiRNA tham gia vào quá trình điều chỉnh rối loạn chức năng nội mô, thông qua đó đóng vai trò quan trọng trong tiến triển suy chức năng cơ quan của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết [154].

Trong khảo sát sự thay đổi mức độ biểu hiện của các miRNA ở BN NKH có rối loạn chức năng tim mạch thấy miRNA-155 có biểu hiện ở nhóm NKH có rối loạn chức năng tim mạch cao hơn so với nhóm không có rối loạn chức năng tim mạch ( $p=0,02$ ). Tuy nhiên, không có sự khác biệt nào về mức độ biểu hiện của 3 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b và miRNA-223 ở hai nhóm này. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Zhou Zu (2018), miRNA-155 làm rối loạn chức năng tim ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết giai đoạn muộn [155]. Rối loạn chức năng tim có tương quan với tiên lượng bất lợi của nhiễm trùng huyết và góp phần vào nguy cơ tử vong cao. Sau phản ứng quá viêm ban đầu, hầu hết bệnh nhân đều rơi vào trạng thái ức chế miễn dịch kéo dài (nhiễm trùng huyết muộn) làm thay đổi cả miễn dịch bẩm sinh và thích ứng. Những thay đổi của chức năng tim trong nhiễm trùng huyết muộn vẫn chưa được biết đến. MiRNA-155 trước đây được phát hiện đóng vai trò quan trọng trong cả các quy định về hoạt hóa miễn dịch và chức năng tim. Ở NKH giai đoạn muộn, miRNA-155 có mức độ biểu hiện tăng lên trong cơ tim, giảm nguy cơ rối loạn chức năng tim ở chuột thực nghiệm. MiRNA-155 làm giảm sự xâm nhập của đại thực bào và bạch cầu trung tính vào cơ tim và làm giảm phản ứng viêm thông qua việc ức chế con đường tín hiệu JNK, đồng thời giảm biểu hiện quá mức của protein đóng vai trò ức chế miễn dịch, do đó cải thiện khả năng sống sót [155].

Đánh giá sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA với suy chức năng hô hấp, chúng tôi quan sát thấy mức độ biểu hiện của cả 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223 trong huyết tương bệnh

nhân NKH có suy hô hấp ở nhóm nhiễm khuẩn huyết đều thay đổi có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm không suy hô hấp ( $p < 0,05$ ). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác. Shiquan Zhang và cộng sự khi nghiên cứu trên nhóm nhỏ BN NKH với 21 ca có suy hô hấp và 20 ca chứng đã thấy miRNA-574 và miRNA-146 có mức độ biểu hiện khác biệt đáng kể giữa hai nhóm [156]. Nghiên cứu của Cao, Y và cộng sự cũng nhận thấy mức độ biểu hiện của miRNA-155, miRNA-223 thay đổi ở bệnh nhân có suy hô hấp cấp và tổn thương phổi cấp tính, từ đó đề xuất vai trò của các miRNA trong tiên lượng suy hô hấp [157]. Zhou Feng- Wang cũng công bố kết quả tương tự chúng tôi, mức độ biểu hiện của miRNA-155 cao hơn có ý nghĩa trong huyết tương của bệnh nhân NKH có tổn thương phổi hội chứng suy hô hấp cấp, đồng thời nó có tương quan thuận với chức năng phổi và có thể được sử dụng để chẩn đoán sớm [158]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Tili với biểu hiện của miRNA-223 ở nhóm suy hô hấp cao hơn nhóm không suy hô hấp với  $p < 0,05$  [85].

Kết quả này gợi ý tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về vai trò của các miRNA trong đánh giá suy hô hấp ở BN NKH. Riêng với miRNA-147b, do chưa có nghiên cứu nào về miRNA này ở trên người bệnh nhiễm khuẩn huyết nên chúng tôi chỉ ghi nhận kết quả mà không có dữ liệu để so sánh.

Nhiễm khuẩn huyết là một trong những nguyên nhân quan trọng gây ra tổn thương thận cấp và các tổn thương thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cho các mô thận có vai trò quan trọng trong sự tiến triển của nhiễm khuẩn huyết [134]. Các miRNA có mức độ biểu hiện thay đổi phụ thuộc vào thời gian tổn thương thận cấp do nội độc tố LPS gây ra [159]. Một số miRNA trong huyết thanh, bao gồm miRNA-21, miRNA-494, miRNA-155, miRNA-210, miRNA-101-1, miRNA-127-3p, miRNA-126, miRNA-26b, miRNA-29a, miRNA-146a, miRNA-27a, miRNA-93 và miRNA-10a được xác định là dấu ấn sinh học để chẩn đoán suy thận cấp [160], [161], [162]. Nghiên cứu của chúng tôi trong bảng 3.18 cho thấy có sự thay đổi

đáng kể mức độ biểu hiện của các miRNA: miRNA-147b, miRNA-155 ở nhóm NKH có suy thận cấp với nhóm NKH không suy thận. Kết quả này cũng tương đối phù hợp với các nghiên cứu đã được công bố trên thế giới. Tác giả Quin MinGe và cộng sự đã thống kê và chứng minh một số miRNA có mức độ biểu hiện thay đổi đáng kể ở BN NKH có tổn thương thận cấp so với nhóm NKH không tổn thương thận và phần nào giúp nâng cao hiểu biết về mối quan hệ giữa miRNA trong huyết thanh và suy thận cấp do nhiễm trùng huyết đồng thời đặt nền tảng quan trọng để xác định thêm các cơ chế tiềm ẩn của suy thận cấp do nhiễm trùng huyết và stress oxy hóa và rối loạn chức năng ty thể [163]. MiRNA-146a tác động ngược với quá trình hoạt hóa NF- $\kappa$ B và bảo vệ chuột khỏi tổn thương thận trên thực nghiệm, do vậy mức độ biểu hiện của miRNA-146a thay đổi ở chuột bị suy thận [193]. Saikumar, J và cộng sự cũng công bố miRNA-21 và miRNA-155 có mức độ thay đổi ở BN có suy thận cấp, theo đó miRNA-155 giảm đi ở nhóm có tổn thương thận (n=22) so với nhóm chứng (n=25) [161].

Sốc nhiễm khuẩn là một phân nhóm của nhiễm khuẩn huyết với những bất thường đặc biệt nặng nề về vận mạch và chuyển hóa tế bào với tỷ lệ tử vong có thể tới 60% [1]. Nghiên cứu của Kumar và cộng sự đã kết luận tỷ lệ tử vong ở BN SNK tăng 7,6% sau mỗi giờ chậm điều trị kháng sinh thích hợp [164], do đó, phát hiện và điều trị sớm sốc nhiễm khuẩn là vấn đề liên quan mật thiết tới tiên lượng sống còn của BN NKH.

Bảng 3.19 và biểu đồ 3.3 đánh giá sự thay đổi về mức độ biểu hiện của 4 miRNA tại thời điểm chẩn đoán NKH và phân tích theo mức độ nặng của NKH, kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của cả 4 miRNA đều có xu hướng gia tăng ở nhóm BN SNK. Theo đó, ở nhóm SNK, mức độ biểu hiện của miRNA-1463p là 0,105 cao hơn có ý nghĩa so với nhóm NKH (0,0036), mức độ biểu hiện của miRNA-147 là 14,47, cao hơn so với nhóm NKH (0,47), miRNA-155 có mức độ biểu hiện là 0,075 cao hơn nhóm NKH (0,0067) ( $p < 0,01$ ) và mức độ biểu hiện của miRNA-223 là 0,020, cao hơn so với mức



độ biểu hiện ở nhóm NKH (0,003) với  $p=0,049$ . Kết quả này cũng tương đối phù hợp với một số nghiên cứu đã được công bố. Vasques-Nosvoa, Quina-Rodrigues và cộng sự nghiên cứu trên cả thực nghiệm và lâm sàng đều nhận thấy mức độ biểu hiện miRNA-155 ở nhóm SNK cao hơn có ý nghĩa so với nhóm NKH không sốc [165]. Ying chen cũng công bố mức độ biểu hiện của miRNA-155 cao hơn đáng kể trong tế bào T của bệnh nhân SNK so với ở người khỏe mạnh ( $P < 0,05$ )[166]. Wang cũng chỉ ra mức độ biểu hiện của miRNA-223 ( $p = 0,035$ ) và miR-499-5p ( $p < 0,001$ ) là khác biệt có ý nghĩa giữa BNNKH nhẹ, NKH nặng và SNK[167]. Tuy nhiên, cũng có nghiên cứu khác cho rằng không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của miRNA-223 ở nhóm NKH với SNK. Andrew J.Goodwin phân tích mức độ biểu hiện của miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-223 ở nhóm 29 BNNKH không sốc và 33 BN SNK cho thấy không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện ở 2 nhóm này ( $p > 0,05$ )[145].

Huang và cộng sự thấy không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p huyết tương ở nhóm BN NKH có sốc với không sốc và kết luận miRNA-146-3p ít giá trị trong tiên lượng sốc ở BN NKH[96]. Lý giải cho sự khác biệt này, chúng tôi cho rằng ở nghiên cứu của Andrew J.Goodwin chỉ tiến hành trên nhóm nhỏ nên số liệu chưa đủ độ tin cậy, mặt khác do tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân ở hai nghiên cứu là khác nhau nên có thể dẫn đến sự khác biệt về kết quả. Trong nghiên cứu của chúng tôi, miRNA-147b có mức độ biểu hiện cao ở nhóm SNK so với nhóm NKH, tuy nhiên kết quả này chúng tôi chỉ ghi nhận để tập trung phân tích làm rõ hơn vai trò của miRNA này trong chẩn đoán và tiên lượng NKH vì cho tới hiện tại, miRNA-147b mới được nghiên cứu ở NKH trên lĩnh vực thực nghiệm mà chưa có nghiên cứu nào được triển khai trên người.

Nhiễm khuẩn huyết có thể dẫn đến hội chứng rối loạn chức năng đa cơ quan (MODS) và tử vong. Tỷ lệ tử vong ở BN NKH có hạ huyết áp và giảm

tươi máu các cơ quan trong vòng 72 giờ là 21% [168]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh nhân tử vong tính đến thời điểm kết thúc điều trị là 36%. Phân tích mức độ biểu hiện của các miRNA ở hai nhóm tử vong và còn sống tại thời điểm ra viện, chúng tôi nhận thấy cả 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223 có mức độ biểu hiện thay đổi không đáng kể giữa 2 nhóm. Nghiên cứu của Puskarich, Michael A. đã tiến hành trên nhóm nhỏ gồm 32 BN NKH và 28 BN SNK, kết quả cho thấy không có sự khác biệt về biểu hiện của miRNA-146, miRNA-223 ở hai nhóm này cũng như ở nhóm BN NKH còn sống và nhóm tử vong [169]. Liu Dan cũng cho kết quả không đồng nhất với chúng tôi khi công bố mức độ biểu hiện của miRNA-223 ở bệnh nhân NKH còn sống cao hơn đáng kể so với nhóm còn sống [98]. Sự khác biệt về kết quả nghiên cứu giữa những nghiên cứu khác nhau có thể là do nhiều yếu tố như khác biệt về nhân chủng học ở các nghiên cứu được phân tích, mặt khác có thể do khác biệt về các nội chuẩn được áp dụng ở các nghiên cứu, hoặc chưa thể loại trừ được rằng một yếu tố chưa được biết đến ảnh hưởng đến nồng độ miRNA-223 và xu hướng một số kết quả được công bố. Mặt khác, lý giải cho sự khác biệt này, chúng tôi ghi nhận liên quan đến thời điểm lấy mẫu và thời điểm đánh giá kết quả điều trị rất xa nhau, có những bệnh nhân điều trị tới 3 tháng, mặt khác, liên quan đến nguyên nhân tử vong của các bệnh nhân có khi không liên quan tới nhiễm khuẩn mà liên quan đến các bệnh nền. Do vậy, để đánh giá chính xác hơn vai trò của 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223 với tiên lượng tử vong thì cần định lượng lại mức độ biểu hiện của các miRNA ở nhiều thời điểm để phân tích.

#### *Mức độ biểu hiện miRNA theo kết quả phân lập tác nhân gây bệnh*

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không thấy sự khác biệt về mức độ biểu hiện của 4 miRNA nghiên cứu có kết quả cấy máu dương tính với nhóm có kết quả cấy máu âm tính. Trong nhóm có kết quả cấy máu dương tính,

chúng tôi cũng không thấy sự khác biệt về mức độ biểu hiện của 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223 ở nhóm nhiễm khuẩn huyết do vi khuẩn gram âm với vi khuẩn gram dương hay giữa các tác nhân cụ thể.

### **4.3. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết**

#### **4.3.1. Vai trò của miRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết**

Chúng tôi tiến hành khảo sát mức độ biểu hiện của 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147-b, miRNA-155 và miRNA-223 trong huyết tương của 125 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết được lấy tại cùng thời điểm lấy máu khi nghi ngờ nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng gồm 71 người khỏe mạnh và 69 bệnh nhân mắc bệnh truyền nhiễm khác- SXH Dengue.

Sử dụng đường cong ROC để tìm hiểu giá trị của các miRNA trong chẩn đoán NKH với người khỏe mạnh, kết quả cho thấy AUC của miRNA-146-3p là 0,786, tại điểm cắt ở 0,00325 thì độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 62,4% và 93,1%,  $p < 0,01$ . Diện tích dưới đường cong ROC của miRNA-147b là 0,821, ở điểm cắt 0,2325 thì độ nhạy là 68,0%, độ đặc hiệu 93,1%,  $p < 0,01$ . MiRNA-155 diện tích dưới đường cong là 0,709, ở điểm cắt là 0,0222 thì độ nhạy là 50,4%, độ đặc hiệu lên tới 98,6%,  $p < 0,01$ . MiRNA-223 có diện tích dưới đường cong là 0,718 với điểm cắt là 0,0037 thì độ nhạy là 56,8%, độ đặc hiệu 98,6%,  $p < 0,01$ .

Khi phân tích giá trị của đường cong ROC của 4 miRNA trong chẩn đoán NKH với bệnh nhân SXH-Dengue, kết quả diện tích dưới đường cong và độ nhạy, độ đặc hiệu như sau: miRNA-146-3p có diện tích dưới đường cong ROC là 0,746, tại điểm cắt là 0,0018, độ nhạy là 69,6%, độ đặc hiệu 76,8%,  $p < 0,01$ . Diện tích dưới đường cong ROC của miRNA-147b là 0,755, tại điểm cắt là 0,742, độ nhạy là 55,2%, độ đặc hiệu 97,1%,  $p < 0,01$ . MiRNA-155 với diện tích dưới đường cong ROC là 0,725, tại điểm cắt là 0,01137 thì độ nhạy là 56,0%, độ đặc hiệu là 84,4%,  $p < 0,01$ . MiRNA-223

có diện tích dưới đường cong ROC là 0,746, tại điểm cắt 0,001 thì độ nhạy, độ đặc hiệu tương ứng là 72,8%, 65,2%,  $p < 0,01$ .

Ở bệnh nhân NKH, miRNA-146a điều hòa phản ứng viêm thông qua kiểm soát các mục tiêu gồm protein IRAK-1 và TRAF-6, lympho bào TCD40, có ý nghĩa trong việc sản xuất cytokine gây viêm và điều hòa tế bào T hiệu ứng[84],[93],[170].

Wang L nghiên cứu trên 1 nhóm nhỏ gồm 14 bệnh nhân SIRS và 14 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cho thấy miRNA-146a có khả năng chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết tốt với diện tích dưới đường cong là 0,813, độ nhạy là 60%, độ đặc hiệu là 87,5% [100]. Nghiên cứu của Wang JF và cộng sự trên 30 bệnh nhân SIRS và 50 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cũng cho kết quả tương tự với diện tích dưới đường cong là 0,804 (độ nhạy là 63,3%, độ đặc hiệu là 100%)[97]. Huang và cộng sự đã phân tích một mạng lưới quy định các microRNA với vai trò như một chỉ dấu sinh học của nhiễm khuẩn huyết, tác giả này sàng lọc và thấy miRNA-146a có thể dùng để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết [96]. Lina Wang đã phân tích đường cong (ROC) chỉ ra rằng diện tích dưới đường cong (AUC) của miRNA-146a là 0,813 và tại điểm cắt xác định ở 7,97, miRNA-146a mang lại độ đặc hiệu là 87,5% và độ nhạy là 60%, tương ứng.

Nghiên cứu của Liu J, Shi K (2015) tiến hành trên nhóm bệnh gồm 60 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng gồm 30 người khỏe mạnh thấy miRNA-155 có thể chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết với diện tích dưới đường cong ROC là 0,763 (độ nhạy 62,2%, độ đặc hiệu 90,1%) [14]. Trong một nghiên cứu khác, khi đo mức độ biểu hiện của một số miRNA ở 50 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết, 30 bệnh nhân SIRS và 20 người khỏe mạnh, Wang J.F., Yu M.L và cộng sự không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của miRNA-155 ở nhóm nhiễm khuẩn huyết với các nhóm còn lại [167]. Một nghiên cứu khác về mức độ biểu hiện của một số miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cũng cho kết quả tương tự [146]. Zhongyuan Sun, Qi Zhang khi nghiên cứu

một nhóm nhỏ với 12 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và 11 người khỏe mạnh thấy mức độ biểu hiện của miRNA-155 ở nhóm nhiễm khuẩn huyết cao hơn nhóm người khỏe mạnh ( $p < 0,05$ ) [171].

MiRNA-155 đóng vai trò trong nhiều giai đoạn khác nhau của nhiễm khuẩn huyết. Ở giai đoạn sớm của nhiễm khuẩn huyết- giai đoạn đáp ứng miễn dịch tế bào, miRNA -155 đã được tìm thấy trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết [91].

Nghiên cứu của Liu J, Shi K (2015) về miRNA-155 tiến hành trên nhóm bệnh gồm 60 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng gồm 30 người khỏe mạnh cho kết quả diện tích dưới đường cong ROC là 0,763 (độ nhạy 62,2%, độ đặc hiệu 90,1%) [14]. Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của chúng tôi, miRNA-155 có thể phân biệt giữa người khỏe mạnh và bn NKH ở mức độ khá.

Tác giả Wang HJ nghiên cứu mức độ biểu hiện của miRNA-223 trên nhóm 24 người khỏe mạnh và 166 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cho kết quả tương tự như chúng tôi với diện tích dưới đường cong của miRNA-223 là 0,608 (độ nhạy 38,21%, độ đặc hiệu 83,72%) khi phân biệt nhiễm khuẩn huyết với người khỏe mạnh [100]. Nghiên cứu của Jia- feng Wang trên một nhóm nhỏ hơn với 30 bệnh nhân SIRS và 50 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết thấy miRNA có khả năng chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết và SIRS tốt với diện tích dưới đường cong ROC 0,858 (độ nhạy 80%, độ đặc hiệu 100%) [172].

Essandoh và cộng sự nhận thấy chuột bị giảm biểu hiện của miRNA-223 thì tình trạng nhiễm khuẩn nặng hơn và tỷ lệ tử vong tăng lên so với nhóm chuột không bị giảm mức độ biểu hiện của miRNA-223 [173].

MiRNA-147b đã được nghiên cứu trên chuột bị nhiễm khuẩn huyết lần đầu tiên bởi Gangliu năm 2009. Nghiên cứu đã khẳng định miRNA-147 có vai trò quan trọng trong kiểm soát các đáp ứng khởi viêm và chống viêm

thông qua quy định khởi phát hệ thống miễn dịch tế bào và miễn dịch bẩm sinh, từ đó tham gia vào các giai đoạn sinh lý bệnh của nhiễm khuẩn huyết [12]. Các nghiên cứu tiếp theo cũng tiếp tục khẳng định vai trò quan trọng của miRNA-147 trong các phản ứng miễn dịch như: kích thích lên thụ thể TLRs và quy định phản ứng viêm ở đại thực bào chuột, hoạt hóa TLR-4 nhiều hơn so với TLR-2 hoặc TLR-3, ngăn ngừa đáp ứng viêm quá mức [12]. Bên cạnh đó, miRNA-147 còn tham gia vào cơ chế gây suy chức năng các cơ quan bằng cách nhắm vào mục tiêu là protein ADAM-15 và từ đó điều chỉnh chức năng hàng rào nội mô- một cơ chế quan trọng trong suy chức năng các cơ quan trong đó có sốc nhiễm khuẩn [88]. Căn cứ vào những cơ sở này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu miRNA-147 ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết. Kết quả cho thấy miRNA-147 biểu hiện ở nhóm nhiễm khuẩn huyết cao hơn so với 2 nhóm chứng còn lại. Tuy nhiên, các nghiên cứu về miRNA-147 trên bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết còn rất ít nên chúng tôi có rất ít tài liệu tham khảo về miRNA này.

Trong một nghiên cứu khác, khi đo mức độ biểu hiện của một số miRNA ở 50 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết, 30 bệnh nhân SIRS và 20 người khỏe mạnh, Wang J.F., Yu M.L và cộng sự thấy không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của miRNA-155 ở nhóm nhiễm khuẩn huyết với các nhóm còn lại [167]. Tác giả khi nghiên cứu về mức độ biểu hiện của một số miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cũng cho kết quả tương tự [146]. Zhongyuan Sun, Qi Zhang khi nghiên cứu một nhóm nhỏ với 12 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và 11 người khỏe mạnh thấy mức độ biểu hiện của miRNA-155 ở nhóm nhiễm khuẩn huyết cao hơn nhóm người khỏe mạnh ( $p < 0,05$ ) [171].

MiRNA-223 là một trong những miRNA được nghiên cứu sớm với vai trò là một dấu ấn sinh học trong chẩn đoán và nhiễm khuẩn huyết. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu còn chưa đồng thuận với nhau. Nghiên cứu của chúng

tôi đã phân tích mức độ biểu hiện của miRNA-223 ở các nhóm bệnh- chứng, và trong từng phân nhóm cụ thể.

Nghiên cứu của Lina Wang và cộng sự (2013) trên bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với cỡ mẫu đủ lớn có kết quả tương đồng nghiên cứu của chúng tôi, miRNA-223 tăng đáng kể trong nhóm nhiễm khuẩn huyết so với người bình thường [100]. Năm 2011, Wang JF nghiên cứu trên 166 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết thấy mức độ biểu hiện của miRNA-223 huyết tương ở nhóm bệnh nhân này cao hơn ở nhóm chứng là người khỏe mạnh và đáng chú ý là, cũng trong nghiên cứu này, mức độ miRNA-223 tăng cao liên quan đến mức độ nghiêm trọng của nhiễm khuẩn huyết [97]. Dimandis, Koberle và cộng sự đã chứng minh vai trò của miRNA-223 trong sinh lý bệnh học của nhiễm khuẩn huyết thông qua thực nghiệm trên chuột bị sự suy giảm mức độ biểu hiện của miRNA-223 có liên quan đến tình trạng nhiễm khuẩn nặng hơn ở phổi và tăng nguy cơ tử vong ở chuột thực nghiệm so với nhóm chuột không bị giảm biểu hiện của miRNA-223, làm nổi bật [108],[ 109]. MiRNA-223 tăng lên tương quan với sự tăng lên của nồng độ TNF $\alpha$  và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Hầu hết các nghiên cứu đều cho kết quả tương đồng nghiên cứu của chúng tôi, tuy nhiên cũng có một vài nghiên cứu có kết quả khác biệt. Wang JF và đồng nghiệp (2010) thấy mức độ biểu hiện của miRNA-223 ở 50 bệnh nhân bị nhiễm khuẩn huyết thấp hơn ở bệnh nhân có SIRS và người khỏe mạnh [94], và mức độ biểu hiện của miRNA-223 không bị ảnh hưởng bởi SIRS không do nhiễm trùng từ đó khẳng định miRNA-223 có thể là công cụ chẩn đoán để phân biệt giữa nhiễm khuẩn huyết và bệnh lý viêm không do nhiễm trùng. Trong một nghiên cứu khác của Puskaric và cộng sự, tác giả này lại đưa ra kết quả không thấy sự khác biệt về mức độ biểu hiện của cả miRNA-146a, miRNA-223 giữa các nhóm NKH, SIRS và người khỏe mạnh [169], tuy nhiên nghiên cứu này chỉ được tiến hành với một cỡ mẫu nhỏ với 24 người khỏe mạnh, 29 BN NKH và 40 BN SNK. Giải thích cho sự khác biệt này, chúng tôi cho rằng, sự khác biệt về cỡ mẫu nghiên cứu, tiêu chuẩn chọn bệnh nhân khác nhau sẽ dẫn đến kết quả khác nhau,

thậm chí, không thể loại trừ được khả năng có một yếu tố chưa được biết đến ảnh hưởng đến nồng độ miRNA-223 và xu hướng một số kết quả được công bố. Mặt khác, các quy trình thực nghiệm khác nhau đáng kể giữa các nghiên cứu: trong khi chúng tôi sử dụng miRNA-16 để chuẩn hóa mức độ miRNA-223 huyết thanh, các tác giả khác lại chuẩn hóa dữ liệu của họ bằng cách sử dụng các gien tham chiếu nội chuẩn. Tuy vậy, các kết quả nghiên cứu vẫn còn mâu thuẫn về mức độ biểu hiện miRNA-223 huyết thanh ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết làm nổi bật sự cần thiết phải nỗ lực hơn nữa trong việc chuẩn hóa trong các quy trình xét nghiệm.

#### ***4.3.2. Vai trò của miRNA trong tiên lượng nhiễm khuẩn huyết***

Sốc nhiễm khuẩn là một phân nhóm nặng của nhiễm khuẩn huyết với tỷ lệ tử vong lên tới 60%, do vậy, chẩn đoán sớm sốc nhiễm khuẩn là vô cùng quan trọng. Để đánh giá khả năng tiên lượng sốc nhiễm khuẩn của các miRNA, chúng tôi đã sử dụng biểu đồ ROC và diện tích dưới đường cong để tính độ nhạy, độ đặc hiệu và tìm các điểm cắt xác định cho các miRNA.

MiRNA-146a, miRNA-150 và miRNA-233 có ý nghĩa phức tạp trong tổn thương phân tử trong nhiễm trùng huyết[174], do đó các nghiên cứu tìm hiểu vai trò của miRNA trong tiên lượng NKH rất được chú trọng.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mặc dù mức độ biểu hiện của 4 miRNA đều tăng cao ở nhóm SNK so với nhóm NKH nhưng giá trị tiên lượng của các miRNA cần được nghiên cứu nhiều hơn. MiRNA-146-3p ít có giá trị trong tiên lượng sốc nhiễm khuẩn với diện tích dưới đường cong ROC 0,691, độ nhạy là 70,0%, độ đặc hiệu 68,0%,  $p < 0,01$ . Huang và cộng sự đã tiến hành một nghiên cứu gộp, thông qua phân tích các kết quả nghiên cứu đã công bố về miRNA với nhiễm khuẩn huyết đã xây dựng một mạng lưới các miRNA ứng viên với vai trò là chỉ dấu sinh học của nhiễm khuẩn huyết cũng như mối liên quan giữa các miRNA với nhau, miRNA-146a cũng được tác giả này đưa vào có mức độ biểu hiện ở nhóm nhiễm khuẩn huyết cao hơn so với ở người khỏe mạnh nhưng không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân nhiễm



khuẩn huyết có sốc và không sốc. Do vậy, tác giả này đề xuất sử dụng miRNA-146 làm dấu ấn sinh học trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết nhưng ít giá trị trong tiên lượng bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết [96].

MiRNA-147b có khả năng chẩn đoán sốc nhiễm khuẩn tốt nhất trong số 4 miRNA chúng tôi nghiên cứu với diện tích dưới đường cong ROC là 0,704, độ nhạy là 68,0%, độ đặc hiệu 72%,  $p < 0,01$ .

Vai trò của miRNA-147b ở BN NKH chưa được nghiên cứu nhiều trên thế giới, các nghiên cứu tập trung chủ yếu ở trong lĩnh vực thực nghiệm. Nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên tìm hiểu về vai trò của miRNA-147b trong chẩn đoán và tiên lượng NKH ở người, do vậy các tài liệu để so sánh gần như không có. MiRNA-147b kiểm soát các phản ứng viêm, do đó, mức độ biểu hiện của miRNA-147b trong máu ngoại vi của bệnh nhân nhiễm trùng huyết cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng là bệnh nhân SXH Dengue và người khỏe mạnh. Mức độ biểu hiện của miRNA-147b tăng sẽ ức chế sản xuất các cytokine gây viêm và ức chế quá trình chết tế bào theo chương trình. Ngược lại, mức độ biểu hiện của miRNA-147 giảm sẽ làm tăng tình trạng viêm và thúc đẩy quá trình chết tế bào theo chương trình. Bên cạnh đó, miRNA-147b còn có vai trò tiềm năng trong việc điều chỉnh chức năng hàng rào nội mô, làm tăng tính thấm trong tế bào nội mô mạch máu khi bị nhiễm khuẩn huyết, làm giảm đề kháng nội mô và tăng albumin nội mô do đó làm ngăn ngừa rối loạn chức năng nội mô trong nhiễm khuẩn huyết [88]. Mặt khác, miRNA-147 được chứng minh làm tăng nồng độ của các thụ thể dạng chuông: TLR2, TLR3, TLR4- các thụ thể chính cho phép các tế bào viêm nhận diện vi sinh vật xâm nhập, đồng thời miRNA-147b cũng có vai trò kiểm soát ngược làm ức chế sản xuất của các cytokine tiền viêm và thông qua đó ức chế quá trình đáp ứng viêm quá mức. Chính vì vậy, miRNA-147b có mức độ biểu hiện tăng lên ở phản ứng kháng viêm của đáp ứng viêm muộn trong quá trình sinh học của nhiễm khuẩn huyết [12]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi một lần nữa khẳng định mức độ

biểu hiện tăng của miRNA-147b ở bệnh nhân suy chức năng cơ quan và sốc nhiễm khuẩn có vai trò tiên lượng bệnh nhân NKH.

MiRNA-155 có khả năng chẩn đoán sốc nhiễm khuẩn ở mức trung bình với diện tích dưới đường cong ROC là 0,668, độ nhạy là 90%, độ đặc hiệu lên tới 42,7%,  $p < 0,01$ . Các nghiên cứu cho thấy, miRNA-155 làm tăng biểu hiện của các cytokine gây viêm, như IL-6, TLR4, IL-10, do đó miRNA-155 có thể tiên đoán sốc nhiễm khuẩn, ức chế miễn dịch và suy hô hấp [15].

MiRNA-223 có thể được sử dụng để phân biệt nhiễm khuẩn huyết nhẹ với nhiễm khuẩn huyết nặng và sốc nhiễm khuẩn [167]. Năm 2010, Hui-juan Wang nghiên cứu về biểu hiện của miRNA-223 trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và cho kết quả tương tự chúng tôi: mức độ biểu hiện của miRNA-223 ở bệnh nhân sốc nhiễm khuẩn cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhiễm khuẩn huyết, diện tích dưới đường cong ROC trong tiên lượng nhiễm khuẩn huyết với sốc nhiễm khuẩn là 0,608 (CI 95%, 0,519 - 0,697) với các điểm cắt được đặt ở 0,625, miR-223 có độ đặc hiệu cao nhất 83,72% [167]. Mặc dù có nhiều nghiên cứu về miRNA ở BN nhiễm khuẩn huyết, tuy nhiên giá trị của miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết còn chưa thống nhất với nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223 ít có khả năng tiên lượng tử vong ở BN NKH với diện tích dưới đường cong ROC lần lượt là 0,608, 0,616, 0,578 và 0,559 ( $p > 0,05$ ). Mức độ biểu hiện của 4 miRNA nghiên cứu cũng không thay đổi có ý nghĩa giữa nhóm NKH tử vong và còn sống ( $p > 0,05$ ). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Puskarich, Michael A [169]. Nghiên cứu của Fabian Benz và cộng sự cũng kết luận miRNA-223 ít có giá trị trong tiên lượng tử vong ở BN NKH so với nhóm BN mắc bệnh nặng khác [175].

*Mô hình kết hợp giữa các miRNA với nhau và với các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng.*

Nhiều dấu ấn sinh học đã được đánh giá để sử dụng lâm sàng trong nhiễm khuẩn huyết, với độ nhạy và độ đặc hiệu từ trung bình đến tốt để chẩn đoán và tiên lượng. Tuy nhiên, kết quả đo một dấu ấn sinh học duy nhất là không thuyết phục trong môi trường lâm sàng. Do hạn chế này, các phương pháp kết hợp đo lường nhiều dấu ấn sinh học gần đây đã được giới thiệu. Các hệ thống chấm điểm cũng được phát triển, sử dụng cả các dấu hiệu lâm sàng và xét nghiệm [176-178]. Một số ví dụ lâm sàng về sự kết hợp của dấu ấn sinh học và điểm cho nhiễm khuẩn huyết được thể hiện trong bảng 4.1[178-183].

Các dấu ấn sinh học kết hợp và bao gồm các hệ thống chấm điểm nhiễm khuẩn huyết cho thấy giá trị AUC-ROC tốt hơn so với dấu ấn sinh học đơn lẻ.

Về mặt lý thuyết, kết hợp nhiều dấu hiệu có thể cải thiện các giá trị chẩn đoán và tiên lượng, vì nhiễm khuẩn huyết bao gồm nhiều phản ứng miễn dịch với những thay đổi khác nhau trong cytokine và dấu ấn sinh học. Tuy nhiên, việc lựa chọn thông tin lâm sàng và dấu ấn sinh học phù hợp nhất vẫn cần thiết phải được đánh giá một cách toàn diện về hiệu quả, chi phí và giá trị trên lâm sàng.

*Giá trị của các yếu tố lâm sàng và xét nghiệm kết hợp trong chẩn đoán, tiên lượng nhiễm khuẩn huyết*

Từ kết quả phân tích đơn độc các yếu tố lâm sàng và xét nghiệm, chúng tôi đã sử dụng mô hình hồi quy logistic đơn biến và đa biến để tìm hiểu giá trị của các miRNA khi kết hợp với nhau và khi kết hợp với các yếu tố lâm sàng, xét nghiệm trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết.

Khi kết hợp 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 với nhau, khả năng chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết với người khỏe mạnh tăng lên với diện tích dưới đường cong là 0,835.

Khi kết hợp 2, 3 và 4 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 với nhau, khả năng chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết với bệnh nhân SXHD tăng lên không đáng kể với diện tích dưới đường cong ROC lần lượt là 0,75, 0,76 và 0,78.

Trong tiên lượng sốc nhiễm khuẩn và tử vong, giá trị tiên lượng của các miR khi kết hợp cùng nhau không cao với  $AUC < 0,7$ . Tuy nhiên, khi kết hợp cùng PCT, bạch cầu và SOFA thì mô hình có khả năng tiên lượng sốc nhiễm khuẩn tốt với  $AUC = 0,82$ . Trong mô hình tiên lượng tử vong, khi kết hợp 2 miRNA 146-3p, miRNA-147b với tuổi, PCT và SOFA thì giá trị tiên lượng tốt với  $AUC$  là 0,84. Bảng 4.1 dưới đây tổng hợp một số kết quả nghiên cứu về mô hình kết hợp trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết.

Mặc dù xu hướng kết hợp các chỉ dấu sinh học với các yếu tố lâm sàng đang là xu hướng mới nhưng các nghiên cứu được báo cáo liên quan đến kết hợp các miRNA trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết chúng tôi mới tìm thấy ở Andrew J. Goodwin với sự kết hợp của 13 miRNA trong đó có 3 miRNA: miRNA-146-3p, miRNA-155, miRNA-223 để chẩn đoán sốc nhiễm khuẩn từ nhiễm khuẩn huyết, diện tích dưới đường cong ROC đạt được là 0,78 [145]. Lý giải về kết quả của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Andrew J Goodwin, chúng tôi cho rằng nghiên cứu của tác giả này đã kết hợp 13 các miRNA với nhau, điều này có thể mang lại một kết quả tốt hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Bên cạnh đó, khi kết hợp các chỉ dấu sinh học với dấu hiệu lâm sàng cũng có ý nghĩa hơn trong chẩn đoán và tiên lượng NKH. Bảng 4.1 dưới đây tổng hợp một số kết quả nghiên cứu về mô hình kết hợp trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết.

**Bảng 4.1. Các nghiên cứu về mô hình kết hợp các chỉ số lâm sàng và xét nghiệm trong chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết**

Tác giả	Chỉ số	Mục đích	Kết quả
Bozza và cộng sự[179]	Đại thực bào, APACHE-II	Tiên lượng tử vong trong 28 ngày	AUC=0,87
Selberg và cộng sự[180]	PCT, Bộ thể C3a	Chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết và SIRS	AUC=0,93
Kofoed và cộng sự[181]	SuPaR, sTREM-1, MIF, CRP, PCT, Bạch cầu	Chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn với SIRS	AUC=0,88
Gibot và cộng sự[177]	sTREM, PCT, CD64	Chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết	AUC=0,95
Kofoed và cộng sự[181]	SuPaR, sTREM-I, MIF-1, tuổi	Tử vong trong 30 ngày và 180 ngày	AUC= 0,93 và AUC=0,87
Harbarth và cộng sự[183]	Nhiệt độ, nhịp thở, huyết áp, bạch cầu, PCT	Chẩn đoán phân biệt NKH và SIRS	AUC=0,94
Chúng tôi	miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223, PCT, SOFA,	Tiên lượng tử vong	AUC=0,784

Nhiều dấu ấn sinh học đã được đánh giá để sử dụng lâm sàng trong nhiễm khuẩn huyết, với độ nhạy và độ đặc hiệu từ trung bình đến tốt để chẩn đoán và tiên lượng. Tuy nhiên, kết quả đo một dấu ấn sinh học duy nhất là không thuyết phục trong lâm sàng. Do hạn chế này, các phương pháp kết hợp đo lường nhiều dấu ấn sinh học gần đây đã được giới thiệu. Các hệ thống chấm điểm cũng được phát triển, sử dụng cả các dấu hiệu lâm sàng và xét

nghiệm [176-178]. Một số ví dụ lâm sàng về sự kết hợp của dấu ấn sinh học và điểm cho nhiễm khuẩn huyết được thể hiện trong bảng 4.1. Các dấu ấn sinh học kết hợp và bao gồm các hệ thống chấm điểm nhiễm khuẩn huyết cho thấy giá trị diện tích dưới đường cong ROC tốt hơn so với dấu ấn sinh học đơn lẻ. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với các kết quả của các nghiên cứu trên, điều này cho thấy cho thấy sự kết hợp giữa các miRNA với nhau cần được nghiên cứu và đánh giá nhiều hơn và cần kết hợp thêm với các yếu tố lâm sàng và xét nghiệm khác để làm tăng giá trị chẩn đoán tiên lượng của chúng trong chẩn đoán và tiên lượng NKH.

## HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI

Mẫu nghiên cứu của chúng tôi gồm 125 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng là 71 người khỏe mạnh và 69 bệnh nhân nhiễm trùng không phải nhiễm khuẩn huyết (SXH Dengue), tuy nhiên, do đặc điểm của BN NKH hay xảy ra ở nhóm bệnh nhân lớn tuổi, và địa điểm lấy mẫu tại BV TƯQĐ 108 nên có sự mất cân bằng về giới, chưa đáp ứng được yêu cầu lựa chọn nhóm chứng tương đồng về tuổi và giới.

Do khó khăn về việc lấy bệnh phẩm và hạn chế về tài chính nên chúng tôi chưa có điều kiện khảo sát sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA theo thời gian ở các thời điểm khác nhau của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết để có thể đánh giá tốt hơn vai trò của các miRNA ở các giai đoạn của nhiễm khuẩn huyết.

## KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 125 bệnh nhân NKH và nhóm chứng gồm 69 bệnh nhân SXH Dengue, 71 người khỏe mạnh, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

### 1. Mức độ biểu hiện của miRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

*a, Mức độ biểu hiện của miRNA ở BN NKH tăng cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng là người khỏe mạnh và BN SXHDengue, cụ thể:*

-Mức độ biểu hiện của miRNA-146-3p và miRNA 147b ở BN NKH tương ứng là 0,0036 và 0,40 cao hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh (0,0002 và 0,014) và SXHDengue (0,0004 và 0,047) với  $p < 0,001$ .

-Tương tự miRNA-155, miRNA-223 có mức độ biểu hiện ở nhóm NKH lần lượt là 0,0189 và 0,00849 cao hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh (0,00552 và 0,00122) và nhóm SXHDengue (0,0052 và 0,000963) với  $p < 0,01$ .

*b, Trong nhóm NKH, miRNA tăng cao hơn có ý nghĩa ở nhóm có biểu hiện SNK hoặc suy tạng, cụ thể:*

-miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 ở nhóm SNK có mức độ biểu hiện tương ứng là 0,105; 14,477; 0,075 và 0,020 cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không sốc tương ứng là 0,0036; 0,47; 0,0067 và 0,003.

-miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 ở nhóm NKH có suy hô hấp có mức độ biểu hiện tương ứng là 0,034; 7,732; 0,042 và 0,0113 cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không sốc là 0,0075; 0,6925; 0,0089 và 0,0043.

-miRNA-155 ở nhóm rối loạn chức năng tim mạch có mức độ biểu hiện là 0,0418 cao hơn nhóm không rối loạn chức năng tim mạch là 0,00126.

-miRNA-147, miRNA-155 có mức độ biểu hiện ở nhóm có suy thận tương ứng là 8,86 và 0,035 cao hơn nhóm không suy thận là 0,074 và 0,009.

### 2. Giá trị của miRNA trong chẩn đoán, tiên lượng nhiễm khuẩn huyết



***a, Giá trị chẩn đoán của miRNA***

- miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155 và miRNA-223 có giá trị chẩn đoán chẩn đoán NKH so với nhóm chứng người khỏe mạnh với độ đặc hiệu 93,1% - 98,6% và diện tích dưới đường cong là 0,709 - 0,821; tuy nhiên độ nhạy 50,4% - 68,0%.

- miRNA 147b có giá trị chẩn đoán chẩn đoán NKH so với nhóm chứng SXH Dengue với độ đặc hiệu 97,1% và diện tích dưới đường cong là 0,742. Các miRNA-146-3p, miRNA-155 và miRNA-223 có độ đặc hiệu thấp hơn, giao động 65,2% -84,1%.

- Khi kết hợp các miRNA cùng nhau, làm tăng giá trị chẩn đoán NKH so với nhóm chứng với diện tích dưới đường cong là 0,835.

***b, Giá trị tiên lượng của miRNA***

- miRNA-147b có giá trị tiên lượng sốc nhiễm khuẩn với diện tích dưới đường cong là 0,704; độ nhạy 68,0% và độ đặc hiệu là 72,0%. Các miRNA-146-3p, miRNA-155 và miRNA-223 tiên lượng sốc nhiễm khuẩn thấp hơn với diện tích dưới đường cong tương ứng là 0,691; 0,668 và 0,692.

- Kết hợp các miRNA với SOFA, PCT, bạch cầu làm tăng giá trị tiên lượng sốc nhiễm khuẩn với diện tích dưới đường cong là 0,86.

- miRNA-146-3p, miRNA-147b có giá trị tiên lượng tử vong ở bệnh nhân NKH với diện tích dưới đường cong tương ứng là 0,608 và 0,616. miRNA-155, miRNA-223 không có giá trị tiên lượng tử vong ở bệnh nhân NKH với diện tích dưới đường cong tương ứng là 0,578 và 0,599.

## **KHUYẾN NGHỊ**

Từ kết quả nghiên cứu đã thu được, chúng tôi xin đưa ra khuyến nghị như sau:

- Định lượng mức độ biểu hiện của 4 miRNA (miRNA-146-3p, miRNA-147b, miRNA-155, miRNA-223) có thể gợi ý tình trạng nhiễm khuẩn huyết cũng như nguy cơ có thể xảy ra sốc ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

- Cần tiến hành nghiên cứu tiếp tục để đo mức độ biểu hiện của miRNA ở các thời điểm khác nhau và trên những nhóm bệnh truyền nhiễm khác nhau để có thể xác định giá trị của các miRNA với vai trò là chỉ dấu sinh học để chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN**

1. **Trần Thị Liên**, Ngô Tất Trung, Lê Hữu Song (2020). Bước đầu đánh giá mức độ biểu hiện và giá trị chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết của một số micro-RNA lưu hành tự do trong máu. *Tạp chí Y dược Lâm sàng 108. Tập 15/7-2020, trang 147-157*
2. **Trần Thị Liên**, Ngô Tất Trung, Vũ Viết Sáng, Lê Hữu Song (2020). Nghiên cứu các miRNA huyết tương với vai trò là dấu ấn sinh học tiềm năng trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết. *Tạp chí Y dược Lâm sàng 108 Tập. 15/7-2020, trang 135-141.*
3. **Trần Thị Liên**, Ngô Tất Trung, Vũ Viết Sáng, Lê Hữu Song (2020). Nghiên cứu vai trò của miRNA huyết tương trong tiên lượng sốc ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 và Bệnh viện hữu nghị Việt Tiệp Hải Phòng (2014-2017), *Tạp chí Y dược Lâm sàng 108. Tập 15/8-2020, trang 132-137.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Singer, M., et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. **315**(8): p. 801-10.
2. Fleischmann, C., et al. (2016). Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. **193**(3): p. 259-272.
3. Dellinger, R.P., et al. (2013). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. **41**(2): p. 580-637.
4. Briegel, J. and P. Mohnle (2013). [International guidelines of the Surviving Sepsis Campaign : update 2012]. *Anaesthetist*. **62**(4): p. 304-9.
5. Asghar, A., et al. (2016). Incidence, outcome and risk factors for sepsis- a two year retrospective study at surgical intensive care unit of a teaching hospital in Pakistan. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. **28**(1): p. 79-83.
6. Phạm Thị Ngọc Thảo (2013), *Nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng và giá trị tiên lượng của một số cytokin trên bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết nặng*. Luận án Tiến sĩ. Đại học Y Dược TP. HCM.
7. Giamarellos-Bourboulis, E.J., et al. (2011). Procalcitonin as an early indicator of outcome in sepsis: a prospective observational study. *J Hosp Infect*. **77**(1): p. 58-63.
8. Nehring, S.M. and B.C. Patel, (2019) *C Reactive Protein (CRP)*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.
9. Biron, B.M., A. Ayala, and J.L. Lomas-Neira (2015). Biomarkers for Sepsis: What Is and What Might Be? *Biomark Insights*. **10**(Suppl 4): p. 7-17.
10. Angus, D.C. and T. van der Poll (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. **369**(9): p. 840-51.

11. O'Neill, L.A., F.J. Sheedy, and C.E. McCoy (2011). MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* **11**(3): p. 163-75.
12. Liu, G., et al. (2009). miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**(37): p. 15819-24.
13. Dumache, R., et al. (2015). Use of miRNAs as biomarkers in sepsis. *Anal Cell Pathol (Amst).* **2015**: p. 186716.
14. Liu, J., et al. (2015). Elevated miR-155 expression induces immunosuppression via CD39(+) regulatory T-cells in sepsis patient. *Int J Infect Dis.* **40**: p. 135-41.
15. Kingsley, S.M.K. and B.V. Bhat (2017). Role of microRNAs in sepsis. *Inflamm Res.* **66**(7): p. 553-569.
16. Trần Thị Như Thúy\*, N.T.C., Đinh Thế Trung\*\*, Phạm Thị Lệ Hoa\*\* (2013). Giá trị tiên lượng của Procalcitonin và lactat máu trong nhiễm khuẩn huyết. *Y Học TP. Hồ Chí Minh. Tập 17 \** (Phụ bản của Số 1 \* 2013): p. 5.
17. Tat Trung, N., et al. (2018). Optimisation of quantitative miRNA panels to consolidate the diagnostic surveillance of HBV-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* **13**(4): p. e0196081.
18. Geroulanos, S. and E.T. Douka (2006). Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive care medicine.* **32**(12): p. 2077-2077.
19. Vincent, J.-L. and E. Abraham (2006). The last 100 years of sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine.* **173**(3): p. 256-263.
20. Bone, R.C., et al. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* **101**(6): p. 1644-55.
21. Levy, M.M., M.P. Fink, and J.C. Marshall, 2001 *SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference.* Vol. 32. 2003. 421-427.

22. Vincent, J.-L., et al. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*. **302**(21): p. 2323-2329.
23. Robert S. Munford I, A.F.S. (2010), *Sepsis, Severe Sepsis, and Septic Shock*, in *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, D. Mandell, Bennit's, Editor. 2010. p. 987-1010.
24. Chaturvedi, P., M. Lamba, and D. Sharma (2021). Bloodstream infections and antibiotic sensitivity pattern in intensive care unit. **51**(1): p. 44-48.
25. Vincent, J.L., et al. (2006). Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. **34**(2): p. 344-53.
26. Levy, M.M., et al. (2010). The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med*. **36**(2): p. 222-31.
27. Martin, G.S., D.M. Mannino, and M. Moss (2006). The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. **34**(1): p. 15-21.
28. Mayr, F.B., et al. (2010). Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *Jama*. **303**(24): p. 2495-503.
29. Donelli, G. (2006). Vascular catheter-related infection and sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*. **7 Suppl 2**: p. S25-7.
30. Wenzel, R.P. (2002). Treating sepsis. *N Engl J Med*. **347**(13): p. 966-7.
31. Tsujimoto, H., et al. (2008). Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock*. **29**(3): p. 315-21.
32. Hopkins, P. and J. Cohen (2002). Toll-like receptors: the key to the stable door? *Crit Care*. **6**(2): p. 99-101.
33. Kumpf, O., et al. (2010). Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care*. **14**(3): p. R103.

34. Daniel R, N.T.e. (2010). ABC of Sepsis. *Wiley-Blackwell*. **Chichester**(West Sussex).
35. Hauser, B., et al. (2005). Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg*. **101**(2): p. 488-98.
36. Remick, D.G. (2007). Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*. **170**(5): p. 1435-44.
37. Opal, S.M. and T. van der Poll (2015). Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med*. **277**(3): p. 277-293.
38. Levi, M. and T. van der Poll (2010). Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. **38**(2 Suppl): p. S26-34.
39. Levi, M. and T. van der Poll (2017). Coagulation and sepsis. *Thromb Res*. **149**: p. 38-44.
40. Ince, C. (2005). The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. **9** **Suppl 4**(Suppl 4): p. S13-9.
41. Balk, R.A. (2000). SEVERE SEPSIS AND SEPTIC SHOCK: Definitions, Epidemiology, and Clinical Manifestations. *Critical Care Clinics*. **16**(2): p. 179-192.
42. Abraham, E. and M. Singer (2007). Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. **35**(10): p. 2408-16.
43. Sproston, N.R. and J.J. Ashworth (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. **9**: p. 754.
44. Schuetz, P., et al. (2012). Procalcitonin to guide initiation and duration of antibiotic treatment in acute respiratory infections: an individual patient data meta-analysis. *Clin Infect Dis*. **55**(5): p. 651-62.
45. Ni, W., et al. (2019). Potential of serum procalcitonin in predicting bacterial exacerbation and guiding antibiotic administration in severe COPD exacerbations: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis (Lond)*. **51**(9): p. 639-650.

46. Cousin, F., et al. (2016). Diagnostic Accuracy of Procalcitonin and C-reactive Protein for the Early Diagnosis of Intra-abdominal Infection After Elective Colorectal Surgery: A Meta-analysis. *Annals of Surgery*. **264**(2): p. 252-256.
47. Long, W., et al. (2014). Procalcitonin guidance for reduction of antibiotic use in patients hospitalized with severe acute exacerbations of asthma: a randomized controlled study with 12-month follow-up. *Critical Care*. **18**(5): p. 471.
48. Aziz, S.A., et al. (2018). Higher cut-off serum procalcitonin level for sepsis diagnosis in metastatic solid tumor patients. *BMC Res Notes*. **11**(1): p. 84.
49. Panacek, E. and M. Kaul (1999). IL-6 as a Marker of Excessive TNF $\alpha$  Activity in Sepsis. *Sepsis*. **3**: p. 65-73.
50. Hack, C.E., et al. (1989). Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*. **74**(5): p. 1704-10.
51. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **75**(5): p. 843-54.
52. Ha, M. and V.N. Kim (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **15**(8): p. 509-24.
53. Grishok, A., et al. (2001). Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. *Cell*. **106**(1): p. 23-34.
54. Lao, T., Q. Nguyen, and T. Thuy (2015). MicroRNA - một dấu chứng sinh học tiềm năng cho bệnh ung thư. *Tạp chí Khoa Học Đại học Mở TP.HCM*. **5**: p. 82-90.
55. Van der Poll, T., et al. (2017). The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*. **17**(7): p. 407.



56. Taganov, K.D., et al. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses.*Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(33): p. 12481-6.
57. Sullivan, R., J. Leong, and T. Fehniger (2013). MicroRNA regulation of natural killer cells.*Frontiers in Immunology.* **4**.
58. Cortez, M.A., et al. (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers.*Nat Rev Clin Oncol.* **8**(8): p. 467-77.
59. Hayes, C.N. and K. Chayama (2016). MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma.*Int J Mol Sci.* **17**(3): p. 280.
60. Moody, L., et al. (2017). Methods and novel technology for microRNA quantification in colorectal cancer screening.*Clinical Epigenetics.* **9**.
61. Benes, V. and M. Castoldi (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available.*Methods.* **50**(4): p. 244-9.
62. Raymond, C.K., et al. (2005). Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs.*Rna.* **11**(11): p. 1737-44.
63. Chen, C., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR.*Nucleic Acids Res.* **33**(20): p. e179.
64. Perron, M.P., et al. (2007). Regulatory RNAs: future perspectives in diagnosis, prognosis, and individualized therapy.*Methods Mol Biol.* **361**: p. 311-26.
65. Hsieh, C.H., et al. (2013). Circulating microRNA signatures in mice exposed to lipoteichoic acid.*J Biomed Sci.* **20**: p. 2.
66. Lawrie, C.H., et al. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.*Br J Haematol.* **141**(5): p. 672-5.

67. Macfarlane, L.A. and P.R. Murphy (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. **11**(7): p. 537-61.
68. Jiang, S., et al. (2010). MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res*. **70**(8): p. 3119-27.
69. Lewis, B.P., et al. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. **115**(7): p. 787-798.
70. Haneklaus, M., et al. (2013). miR-223: infection, inflammation and cancer. *Journal of internal medicine*. **274**(3): p. 215-226.
71. Wang, H., et al. (2014). Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. **2014**: p. 864894.
72. Winter, J., et al. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. **11**(3): p. 228-34.
73. Wu, Y., et al. (2014). Relationship between expression of microRNA and inflammatory cytokines plasma level in pediatric patients with sepsis. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. **52**(1): p. 28-33.
74. Ma, X., et al. (2011). MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol*. **3**(3): p. 159-66.
75. Drury, R.E., D. O'Connor, and A.J. Pollard (2017). The Clinical Application of MicroRNAs in Infectious Disease. *Front Immunol*. **8**: p. 1182.
76. Cui, L., et al. (2011). Serum microRNA expression profile distinguishes enterovirus 71 and coxsackievirus 16 infections in patients with hand-foot-and-mouth disease. *PLoS One*. **6**(11): p. e27071.
77. Moran, J., et al. (2015). Circulating levels of miR-150 are associated with poorer outcomes of A/H1N1 infection. *Exp Mol Pathol*. **99**(2): p. 253-61.
78. Wolf, S., et al. (2016). MicroRNA Regulation of Human Genes Essential for Influenza A (H7N9) Replication. *PLoS One*. **11**(5): p. e0155104.

79. Li, X., et al. (2016). Evaluation of microRNA Expression in Patients with Herpes Zoster. *Viruses*. **8**(12).
80. Alipoor, S.D., P. Tabarsi, and M. Varahram (2019). Serum Exosomal miRNAs Are Associated with Active Pulmonary Tuberculosis. **2019**: p. 1907426.
81. Staedel, C. and F. Darfeuille (2013). MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol.* **15**(9): p. 1496-507.
82. Wiersinga, W.J., et al. (2014). Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. **5**(1): p. 36-44.
83. Liu, S.F. and A.B. Malik (2006). NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **290**(4): p. L622-1645.
84. Quinn, E.M., et al. (2013). MicroRNA-146a is upregulated by and negatively regulates TLR2 signaling. *PLoS One*. **8**(4): p. e62232.
85. Tili, E., et al. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol.* **179**(8): p. 5082-9.
86. Wang, X., et al. (2014). Loss of duplexmiR-223 (5p and 3p) aggravates myocardial depression and mortality in polymicrobial sepsis. *Biochim Biophys Acta.* **1842**(5): p. 701-11.
87. An, R., et al. (2018). miR-146a Attenuates Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction by Suppressing IRAK1 and TRAF6 via Targeting ErbB4 Expression. **2018**: p. 7163057.
88. Chatterjee, V., et al. (2014). MicroRNA-147b regulates vascular endothelial barrier function by targeting ADAM15 expression. *PLoS One*. **9**(10): p. e110286.
89. Vincent, J.-L., et al. (2013). Sepsis definitions: time for change. *Lancet (London, England)*. **381**(9868): p. 774.

90. O'Connell, R.M., et al. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(5): p. 1604-9.
91. Zhou, J., et al. (2015). Dysregulation in microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of sepsis patients is associated with immunopathology. *Cytokine*. **71**(1): p. 89-100.
92. Bhaumik, D., et al. (2008). Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. **27**(42): p. 5643-7.
93. Lu, L.F., et al. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. **142**(6): p. 914-29.
94. Wang, J.F., et al. (2010). Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. **394**(1): p. 184-8.
95. Wang, H.J., et al. (2014). Identification of four novel serum protein biomarkers in sepsis patients encoded by target genes of sepsis-related miRNAs. *Clin Sci (Lond)*. **126**(12): p. 857-67.
96. Huang, J., et al. (2014). Identification of microRNA as sepsis biomarker based on miRNAs regulatory network analysis. **2014**: p. 594350.
97. Wang, J.-f. (2010). Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **394**.
98. Liu, D., et al. (2020). The protective role of miR-223 in sepsis-induced mortality. *Sci Rep*. **10**(1): p. 17691.
99. Mohamed El Gazzar, A.C., Tiefu Liu, and Charles E. McCall, (2011). MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- during TLR4-induced gene reprogramming. *Journal of Leukocyte Biology* **90**(509).

100. Wang, L., et al. (2013). Differential expression of plasma miR-146a in sepsis patients compared with non-sepsis-SIRS patients.*Exp Ther Med.* **5**(4): p. 1101-1104.
101. Banerjee, S., et al. (2013). Morphine induced exacerbation of sepsis is mediated by tempering endotoxin tolerance through modulation of miR-146a.*Sci Rep.* **3**: p. 1977.
102. Takeuchi, O. and S. Akira (2010). Pattern recognition receptors and inflammation.*Cell.* **140**(6): p. 805-20.
103. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen (2013). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach.*Lancet Infect Dis.* **13**(3): p. 260-8.
104. Monneret, G., et al. (2003). Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis.*Crit Care Med.* **31**(7): p. 2068-71.
105. Ono, S., et al. (2013). Removal of increased circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers.*Surgery.* **153**(2): p. 262-71.
106. Venet, F., et al. (2008). Regulatory T cell populations in sepsis and trauma.*J Leukoc Biol.* **83**(3): p. 523-35.
107. Schwarzenbach, H., et al. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer.*Nat Rev Clin Oncol.* **11**(3): p. 145-56.
108. Diamandis, E.P. (2012). The failure of protein cancer biomarkers to reach the clinic: why, and what can be done to address the problem? *BMC Med.* **10**: p. 87.
109. Koberle, V., et al. (2013). Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers.*PLoS One.* **8**(9): p. e75184.

110. World Health Organization, R.O.f.S.-E.A., *Comprehensive Guideline for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Revised and expanded edition*. 2011, New Delhi: WHO Regional Office for South-East Asia.
111. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method.*Methods*. **25**(4): p. 402-8.
112. Knaus, W.A., et al. (1985). Prognosis in acute organ-system failure.*Ann Surg*. **202**(6): p. 685-93.
113. Bộ Y tế (2001)*Các giá trị sinh học người Việt Nam bình thường thập kỷ 90 - thế kỷ XX*, B.Y. tế, Editor. 2001, Nhà Xuất bản Y học: Hà Nội.
114. Trung, N.T., et al. (2016). Enrichment of bacterial DNA for the diagnosis of blood stream infections.*BMC Infect Dis*. **16**: p. 235.
115. Safari, S., et al. (2016). Evidence Based Emergency Medicine; Part 5 Receiver Operating Curve and Area under the Curve.*Emerg (Tehran)*. **4**(2): p. 111-3.
116. Dat, V.Q., et al. (2017). Bacterial bloodstream infections in a tertiary infectious diseases hospital in Northern Vietnam: aetiology, drug resistance, and treatment outcome.*BMC Infect Dis*. **17**(1): p. 493.
117. Angele, M.K., et al. (2014). Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects.*Virulence*. **5**(1): p. 12-9.
118. Lie, K.C., et al. (2018). Utility of SOFA score, management and outcomes of sepsis in Southeast Asia: a multinational multicenter prospective observational study.**6**: p. 9.
119. Knaus, W.A., et al. (1992). Evaluation of definitions for sepsis.*Chest*. **101**(6): p. 1656-62.
120. Krieger, J.N., D.L. Kaiser, and R.P. Wenzel (1983). Urinary tract etiology of bloodstream infections in hospitalized patients.*J Infect Dis*. **148**(1): p. 57-62.

121. Sprung, C.L., et al. (2008). Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med.* **358**(2): p. 111-24.
122. Ranieri, V.M., et al. (2012). Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med.* **366**(22): p. 2055-64.
123. Levy, M.M., et al. (2012). Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* **12**(12): p. 919-24.
124. Opal, S.M., et al. (2013). Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama.* **309**(11): p. 1154-62.
125. Kaukonen, K.M., et al. (2015). Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med.* **372**(17): p. 1629-38.
126. Rangel-Frausto, M.S., et al. (1995). The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *Jama.* **273**(2): p. 117-23.
127. Jekarl, D.W., et al. (2019). Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis based on Sepsis-3. *J Clin Lab Anal.* **33**(9): p. e22996.
128. Westerdijk, K., et al. (2019). The value of the neutrophil-lymphocyte count ratio in the diagnosis of sepsis in patients admitted to the Intensive Care Unit: A retrospective cohort study. *PLoS One.* **14**(2): p. e0212861.
129. Buoro, S., et al. (2015). Extended leukocyte differential count and C-reactive protein in septic patients with liver impairment: diagnostic approach to evaluate sepsis in intensive care unit. *Ann Transl Med.* **3**(17): p. 244.
130. Mangalesh, S. and S. Dudani (2021). Platelet Indices and Their Kinetics Predict Mortality in Patients of Sepsis. p. 1-9.
131. Peng, Z.L., et al. (2018). Association between early serum cholinesterase activity and 30-day mortality in sepsis-3 patients: A retrospective cohort study. *PLoS One.* **13**(8): p. e0203128.

132. Garcia-Simon, M., et al. (2015). Prognosis Biomarkers of Severe Sepsis and Septic Shock by <sup>1</sup>H NMR Urine Metabolomics in the Intensive Care Unit.*PLoS One*. **10**(11): p. e0140993.
133. Sykes, L., P.A. Kalra, and D. Green (2019). Comparison of impact on death and critical care admission of acute kidney injury between common medical and surgical diagnoses.*PLoS One*. **14**(4): p. e0215105.
134. Schrier, R.W. and W. Wang (2004). Acute renal failure and sepsis.*N Engl J Med*. **351**(2): p. 159-69.
135. Endo, S., et al. (2008). Usefulness of procalcitonin serum level for the discrimination of severe sepsis from sepsis: a multicenter prospective study.*J Infect Chemother*. **14**(3): p. 244-9.
136. Jerala, R. (2007). Structural biology of the LPS recognition.*Int J Med Microbiol*. **297**(5): p. 353-63.
137. Zweigner, J., et al. (2001). High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes.*Blood*. **98**(13): p. 3800-8.
138. Gaïni, S., et al. (2006). Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study.*Crit Care*. **10**(2): p. R53.
139. Simon, L., et al. (2004). Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis.*Clin Infect Dis*. **39**(2): p. 206-17.
140. Prkno, A., et al. (2013). Procalcitonin-guided therapy in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock--a systematic review and meta-analysis.*Crit Care*. **17**(6): p. R291.



141. Kopterides, P., et al. (2010). Procalcitonin-guided algorithms of antibiotic therapy in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Med.* **38**(11): p. 2229-41.
142. Vincent, J.L., et al. (2016). The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care.* **20**(1): p. 257.
143. Ryoo, S.M., et al. (2018). Lactate Level Versus Lactate Clearance for Predicting Mortality in Patients With Septic Shock Defined by Sepsis-3. *Crit Care Med.* **46**(6): p. e489-e495.
144. Vasilescu, C., et al. (2017). Circulating miRNAs in sepsis—A network under attack: An in-silico prediction of the potential existence of miRNA sponges in sepsis. *PLoS One.* **12**(8): p. e0183334.
145. Goodwin, A.J., et al. (2015). Plasma levels of microRNA are altered with the development of shock in human sepsis: an observational study. *Crit Care.* **19**: p. 440.
146. Dhas, B.B., V.R. Dirisala, and B.V. Bhat (2018). Expression Levels of Candidate Circulating microRNAs in Early-Onset Neonatal Sepsis Compared With Healthy Newborns. *Genomics Insights.* **11**: p. 1178631018797079.
147. Nahid, M.A., M. Satoh, and E.K. Chan (2011). Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *J Immunol.* **186**(3): p. 1723-34.
148. Benz, F., et al. (2013). U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med.* **45**: p. e42.
149. Lange, T., et al. (2017). Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PLoS One.* **12**(8): p. e0183435.

150. Trần Thị Liên, N.T.T., Lê Hữu Song (2020). Bước đầu đánh giá mức độ biểu hiện và giá trị chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết của một số miRNA lưu hành tự do trong máu. *Tạp chí Y dược Lâm sàng* 108 **15(7)**: p. 147-154.
151. Sun, W., et al. (2010). miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-beta. *Cell Res.* **20(10)**: p. 1158-69.
152. Zhuang, G., et al. (2012). A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation.* **125(23)**: p. 2892-903.
153. Fulci, V., et al. (2010). miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* **71(2)**: p. 206-11.
154. Aird, W.C. (2003). The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* **101(10)**: p. 3765-77.
155. Zhou, Y., et al. (2017). MicroRNA-155 attenuates late sepsis-induced cardiac dysfunction through JNK and  $\beta$ -arrestin 2. *Oncotarget.* **8(29)**: p. 47317-47329.
156. Zhang, S., et al. (2021). miR-584 and miR-146 are candidate biomarkers for acute respiratory distress syndrome. *Exp Ther Med.* **21(5)**: p. 445.
157. Cao, Y., et al. (2016). MicroRNAs: Novel regulatory molecules in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Biomed Rep.* **4(5)**: p. 523-527.
158. Wang, Z.F., Y.M. Yang, and H. Fan (2020). Diagnostic value of miR-155 for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome in patients with sepsis. **48(7)**: p. 300060520943070.
159. Tod, P., et al. (2020). Time-Dependent miRNA Profile during Septic Acute Kidney Injury in Mice. **21(15)**.
160. Lorenzen, J.M., et al. (2011). Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* **6(7)**: p. 1540-6.

161. Saikumar, J., et al. (2012). Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury. *Toxicol Sci.* **129**(2): p. 256-67.
162. Lan, Y.F., et al. (2012). MicroRNA-494 reduces ATF3 expression and promotes AKI. *J Am Soc Nephrol.* **23**(12): p. 2012-23.
163. Ge, Q.M., et al. (2017). Differentially expressed miRNAs in sepsis-induced acute kidney injury target oxidative stress and mitochondrial dysfunction pathways. *PLoS One.* **12**(3): p. e0173292.
164. Kumar, A., et al. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* **34**(6): p. 1589-96.
165. Vasques-NÓvoa, F., et al., *MicroRNA-155 upregulation mediates sepsis-associated cardiovascular dysfunction.* 2012, Am Heart Assoc.
166. Chen, Y., et al. (2016). Glucocorticoids regulate the proliferation of T cells via miRNA-155 in septic shock. *Exp Ther Med.* **12**(6): p. 3723-3728.
167. Wang, H.J., et al. (2012). Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *J Trauma Acute Care Surg.* **73**(4): p. 850-4.
168. Jones, A.E., S. Trzeciak, and J.A. Kline (2009). The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. *Crit Care Med.* **37**(5): p. 1649-54.
169. Puskarich, M.A., et al. (2015). Detection of microRNAs in patients with sepsis. *Journal of Acute Disease.* **4**(2): p. 101-106.
170. Chen, T., et al. (2011). MicroRNA-146a regulates the maturation process and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting CD40L in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett.* **585**(3): p. 567-73.

171. Zhongyuan Sun, Q.Z., Xiaodai Cui, Jian Yang, Baoyuan Zhang, Guowei Song (2018). Differential expression of miRNA and its role in sepsis. *American Academy of Pediatrics*. **142**(1 Meetingabstract).
172. Jie Huang, Z.S., 1,2 Wenying Yan,2,3,4 Yujie Zhu,2 Yuxin Lin,2 Jiajai Chen,2,4 (2014). Identification of MicroRNA as Sepsis Biomarker Based on miRNAs Regulatory Network Analysis. *BioMed Research International* **2014**: p. 12.
173. Essandoh, K. and G.C. Fan (2014). Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. *Biochim Biophys Acta*. **1842**(11): p. 2155-2162.
174. Puskarich, M.A., et al. (2012). Plasma levels of mitochondrial DNA in patients presenting to the emergency department with sepsis. *Shock*. **38**(4): p. 337-40.
175. Benz, F., et al. (2015). Circulating MicroRNA-223 Serum Levels Do Not Predict Sepsis or Survival in Patients with Critical Illness. *Disease Markers*. **2015**: p. 384208.
176. Andaluz-Ojeda, D., et al. (2012). A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*. **57**(3): p. 332-6.
177. Gibot, S., et al. (2012). Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med*. **186**(1): p. 65-71.
178. Shapiro, N.I., et al. (2009). A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. *Crit Care Med*. **37**(1): p. 96-104.
179. Bozza, F.A., et al. (2007). Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. **11**(2): p. R49.
180. Selberg, O., et al. (2000). Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma

concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* **28**(8): p. 2793-8.

181. Kofoed, K., et al. (2007). Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit Care.* **11**(2): p. R38.
182. Kollef, M.H. (2008). Broad-spectrum antimicrobials and the treatment of serious bacterial infections: getting it right up front. *Clin Infect Dis.* **47 Suppl 1**: p. S3-13.
183. Harbarth, S., et al. (2001). Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* **164**(3): p. 396-402.