

SO SÁNH GIÁ TRỊ CỦA PCR ĐA MÔI VỚI CẤY KHUẨN TRONG CHẨN ĐOÁN STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, HAEMOPHILUS INFLUENZAE VÀ MORAXELLA CATARRHALIS

LÊ HỮU SONG - Bệnh viện TUQĐ 108

TÓM TẮT

Chẩn đoán nhanh các mầm bệnh đang là nhu cầu thiết yếu hiện nay. 90 mẫu bệnh phẩm đã được tiến hành đồng thời nuôi cấy và PCR để phát hiện *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis*. Kết quả cho thấy PCR với bộ *universal 16s rRNA* có thể phát hiện sự có mặt của vi khuẩn ở 76/90 (84,5%) so với nuôi cấy là 63/90 (70%). PCR đa môi và nuôi cấy cho kết quả tương đương nhau về tỷ lệ dương tính (82,14 % so với 78,57%), tuy nhiên khác nhau về tỷ lệ phát hiện giữa các mầm bệnh. Như vậy, so với nuôi cấy PCR tỏ ra có ưu thế hơn trong chẩn đoán *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis*.

Từ khóa: PCR, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis*.

SUMMARY

Currently, rapid detection of pathogen is needed. 90 clinical samples were cultured and amplified by PCR for identifying *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. The results showed that universal 16s rRNA PCR can detect these bacteria in 76/90 (84.5%) samples compared to 63/90 (70%) in culture. Multiplex PCR and bacteria culture have a similar number of positive samples (82.14 % vs 78.57%), however, the rate of each pathogen was differentiated. Thus, it demonstrated that PCR is priority as culture for detecting *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.

Keywords: PCR, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis* là các nguyên nhân chủ yếu gây viêm đường hô hấp cấp tính cũng như gây một số nhiễm khuẩn nặng như viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết và viêm phổi [1]. Để chẩn đoán các mầm bệnh này thì cấy khuẩn là tiêu chuẩn vàng. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi mẫu bệnh phẩm phải tươi, mẫu bệnh sau khi lấy thường phải làm ngay bởi vì có một số vi khuẩn nhạy cảm và dễ chết như *H. influenzae*. Để thực hiện các phương pháp này rất phức tạp và đòi hỏi kỹ thuật viên phải có tay nghề tốt hạn chế tối đa sự bội nhiễm của các loài vi khuẩn khác gây ra kết quả nhầm lẫn. Và do vi khuẩn phải tươi nên tồn tại yếu tố nguy cơ lớn lây nhiễm cho người làm xét nghiệm. Trong trường hợp xử lý bệnh phẩm không tốt còn phát tán vi khuẩn ra môi trường xung quanh. Bên cạnh đó,

thời gian kéo dài là nhược điểm lớn nhất của phương pháp vi sinh.

Để giải quyết những khó khăn đó ngày nay người ta đã đưa vào ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, Real Time PCR... Tuy nhiên, cho đến nay phần lớn người ta sử dụng các PCR đơn môi. Mà PCR đơn môi thì vẫn đòi hỏi tốn nhiều thời gian, kinh phí. Vì vậy, nhu cầu bức thiết hiện nay là phải tìm ra được các phương pháp chẩn đoán mới có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn, có thời gian trả lời kết quả nhanh hơn và mức độ an toàn cao. Để giải quyết những khó khăn đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu ứng dụng PCR đa môi để phát hiện đồng thời 3 mầm bệnh trên trong 1 lần xét nghiệm.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng.

Các chủng vi khuẩn: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis* được phân lập và nuôi cấy trên môi trường chuẩn do Khoa Vi sinh vật tại Bệnh viện TUQĐ 108 cung cấp. Các chủng vi khuẩn được định lượng và pha loãng thành dải nồng độ từ cao đến thấp (10^3 : 10^2 : 10^1 : 10^0 CFU/ml). DNA tổng số được tách chiết và tinh sạch từ các dung dịch chứa vi khuẩn đã biết nồng độ kể trên để đánh giá độ nhạy kỹ thuật. DNA tổng số được tách chiết từ 6 mẫu huyết tương của bệnh nhân mang vi rút viêm gan B (HBV) và 10 mẫu máu người khỏe mạnh để làm chứng âm.

90 mẫu bệnh phẩm lâm sàng được thu thập từ các bệnh nhân được điều trị tại các Khoa Truyền nhiễm, Nhi, Tai Mũi Họng, Bệnh viện TUQĐ 108.

2. Phương pháp:

Tất cả các mẫu bệnh phẩm được chia thành 2 phần, một nửa được tiến hành cấy khuẩn tại Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện TUQĐ 108. Một nửa còn lại được tiến hành thực hiện PCR đa môi tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TUQĐ 108. Kết quả từ 2 bộ phận được giữ kín độc lập, chỉ đến khi kết thúc nghiên cứu mới được tổng hợp lại.

Sản phẩm DNA tách từ mỗi bệnh phẩm được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang phổ của DNA ở bước sóng 260 nm và 280 nm, nồng độ của DNA được tính bằng độ hấp thụ OD260 nm và mức độ tinh sạch được đánh giá bằng tỷ số hấp thụ OD260/OD280.

Các cặp môi đơn được thiết kế bắt cặp đặc hiệu vào các khu vực bảo tồn cao cho mỗi loài như các gene mã hóa cho protein độc tố đặc trưng của loài. Các cặp môi không bắt cặp chéo với nhau (khi thực hiện phản ứng đa môi) và không bắt cặp với genomics

DNA người. Ngoài các bộ mỗi đơn đặc hiệu cho mỗi loài, chúng tôi còn thiết kế một cặp mỗi bắt vào khu vực bảo tồn chung của tất cả các loài vi sinh vật (universal primer) nhằm kiểm chứng sự lây nhiễm vi sinh vật tổng số hoặc các vi sinh vật không nằm trong danh sách được quan tâm. Sự khác biệt về kích thước giữa các đoạn sản phẩm tạo ra nằm trong khoảng 80 - 100bp, nó đảm bảo cho việc các đoạn sản phẩm có thể dễ dàng được phân biệt khi điện di trên gel agarose 1,5-2,5%. Các cặp mỗi đặc hiệu cho phát hiện các vi khuẩn trong đề tài được sử dụng cho phản ứng PCR nhân các đoạn gene đích có trình tự tương ứng:

Bảng 1. Trình tự mỗi cho PCR đa mỗi là:

Vi khuẩn	Đặc điểm	Trình tự (5'-3')	Gene đích	Sản phẩm khuếch đại (bp)
<i>S. pneumoniae</i>	F	TGA AGC GGA TTA TCA CTG GC	autolysin (<i>lytA</i>)	701
	R	GCT AAA CTC CCT GTA TCA AGC G		
<i>H. influenzae</i>	F	CGG TTT TGA TAA ATA TGA CAT TACT	Outer membrane protein 6 (P6)	273
	R	CAA CAC CTT TAC CAG CTA AA		
<i>M. catarrhalis</i>	F	GTG AGT GCC GCT TTT ACA ACC	Outer membrane protein (<i>copB</i>)	155
	R	TGT ATC GCC TGC CAA GAC AA		

PCR sử dụng mỗi chung cho các loài vi khuẩn khác nhau (Universal Primer) được thiết kế dựa trên đoạn 16S rRNA có trình tự như sau: PF: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'; RP: 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTACGACTTC-3'. Sản phẩm PCR có kích thước là 996 bp.

KẾT QUẢ

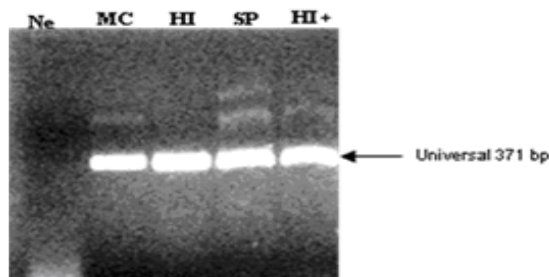
1. Kết quả tách chiết DNA từ các đối tượng

Bảng 1. Kết quả đo OD các mẫu chuẩn dương và mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm	n	Nồng độ DNA ($\bar{X} \pm SD$)	Độ sạch DNA ($\bar{X} \pm SD$)
Chủng vi sinh	3	100 \pm 2,504	1,87 \pm 0,058
Dịch hầu họng	56	73,96 \pm 25,78	1,823 \pm 0,095
Máu	24	70,51 \pm 21,72	1,846 \pm 0,101
DNT	10	82,95 \pm 38,93	1,79 \pm 0,077
Tổng số	90	74,88 \pm 26,39	1,827 \pm 0,094

Qua kết quả đo OD ta thấy, 100% mẫu DNA đạt tiêu chuẩn về độ sạch và nồng độ DNA. Trong đó nồng độ DNA thấp nhất là 42,63, cao nhất là 164,58; độ tinh sạch giao động từ 1,733 đến 1,921. DNA thu được có độ tinh sạch dao động trong khoảng 1,7 đến 2,4 cho thấy mẫu DNA khá tinh sạch không lẫn protein và các tạp chất. Như vậy, dung dịch DNA tổng số thu được đảm bảo yêu cầu chất lượng để sử dụng làm panel mẫu chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. Kết quả tối ưu hóa điều kiện PCR sử dụng mỗi Universal 16S rRNA

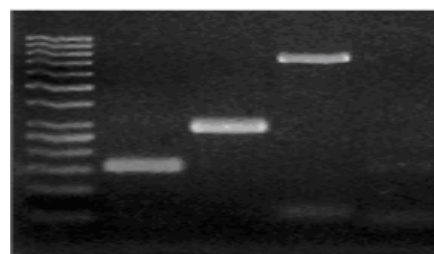


Hình 2: Kết quả PCR mỗi Universal 16S rRNA.

Nhận xét: Chỉ cần 1 mỗi nhưng có thể nhân sản phẩm PCR lên ở cả 3 mẫu bệnh khác nhau.

3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện PCR đa mỗi

M MC HI SP -



Hình 2: Kết quả tối ưu PCR đa mỗi phát hiện 3 mẫu bệnh.

Nhận xét: Với điều kiện $T_m=57$, $MgCl_2=3mM$ chúng tôi thu được hình ảnh sản phẩm PCR đa mỗi rõ nét, đúng kích thước dự kiến. Ghi chú: M=marker, MC=*Moraxella catarrhalis*, HI=*Haemophilus influenzae* và SP=*Streptococcus pneumoniae*

4. Kết quả áp dụng PCR đơn mỗi chung (universal 16s rRNA) chẩn đoán vi khuẩn trong các mẫu bệnh phẩm.

Các mẫu DNA tách chiết được kiểm tra trong mẫu có nhiễm khuẩn không bằng cách PCR mỗi universal khuếch đại gene đích là 16s rRNA. Kết quả như sau:

Bảng 2. Kết quả PCR sử dụng cặp mỗi 16s rRNA xác định sự có mặt vi khuẩn trong các bệnh phẩm.

Bệnh phẩm	Số lượng	PCR (-) với mỗi 16s rRNA	PCR (+) với mỗi 16s rRNA	Nuôi cấy (+)	Nuôi cấy (-)
Dịch hầu họng	56	0	56	56	0
Máu	24	12	12	7	17
DNT	10	2	8	0	10
Tổng số	90	14 (100%)	76 (84,5%)	63 (70%)	27 (30%)

Nhận xét: Kết quả nuôi cấy có tỷ lệ dương tính là 63/90 (70 %) còn với bộ mỗi universal 16s rRNA mà chúng tôi sử dụng có thể phát hiện sự có mặt của vi khuẩn lên tới 76/90 (84,5%).

5. Kết quả áp dụng PCR đa mỗi chẩn đoán vi khuẩn trong các mẫu bệnh phẩm.

Bảng 3. So sánh kết quả nuôi cấy và PCR đa môi chẩn đoán vi khuẩn trên các mẫu bệnh phẩm dịch hầu họng.

PP chẩn đoán Mầm bệnh	Nuôi cấy (+) (n=46)		Nuôi cấy (-) (n=121)		Chẩn đoán cuối cùng
	PCR (+)	PCR (-)	PCR (+)	PCR (-)	
M.catarrhalis (n,%)	9 (23,08)	30 (76,92)	2 (11,76)	15 (88,24)	11
H.influenzae (n,%)	3 (50)	3 (50)	14 (28,57)	35 (71,43)	17
S.pneumoniae (n,%)	1 (100)	0 (0)	15 (33,33)	40 (66,67)	16
Tổng	13	33	31	90	44

Nhận xét: Qua kết quả trên cho thấy số mẫu dương tính ở cả hai phương pháp là tương đương nhau. Trong nhóm bệnh phẩm hầu họng, phương pháp nuôi cấy có 46 mẫu dương tính với một trong ba tác nhân trong tổng số 56 ca (82,14%) và 10 mẫu âm tính (17,86%). Kết quả của PCR đa môi có 44 trường hợp dương tính trong tổng số 56 ca (78,57%), âm tính là 12 ca (21,43%).

Bảng 4. So sánh kết quả nuôi cấy và multiplex PCR sử dụng 3 cặp môi chẩn đoán vi khuẩn trên các mẫu bệnh phẩm máu và DNT

Bệnh phẩm	Kết quả		PCR đa môi	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Máu (n,%)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	24 (100)
DNT (n,%)	0 (0)	10 (100)	1 (10)	9 (90)
Tổng số (n,%)	0 (0)	34 (100)	1 (2,94)	33 (97,06)

Nhận xét: Không trường hợp nào ở mẫu máu có kết quả dương tính với nuôi cấy và PCR đa môi. Tuy nhiên, trong mẫu DNT, mặc dù cấy khuẩn âm tính 100%, nhưng PCR đa môi phát hiện được một mẫu DNT có *S.pneumoniae* và 9 mẫu âm tính.

BÀN LUẬN

Chẩn đoán nhanh, chính xác các mầm bệnh đang là nhu cầu cần thiết hiện nay. Một trong những phương pháp được sử dụng là PCR phát hiện gene đích. Tuy nhiên, nếu sử dụng PCR đơn môi thì mỗi lần xét nghiệm chúng ta chỉ có thể phát hiện được tối đa 1 mầm bệnh. Do đó, phát triển các kỹ thuật PCR đa môi là xu hướng hiện nay. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành sử dụng đoạn môi chung (Universal primer) bắt đoạn 16S rRNA để phát hiện sự có mặt của tất cả các loài vi khuẩn [2]. Cơ sở của phương pháp này là rRNA có mặt ở tất cả các loại vi sinh vật, có khả năng xác định, có tính bảo thủ cao, chúng chỉ khác nhau rất ít giữa các nhóm vi sinh vật. Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra cặp môi này dựa trên trình tự nucleotide của chủng chuẩn quốc tế, sử dụng công cụ BLAST trên ngân hàng gene quốc tế (NCBI), khuếch đại gene đích có độ dài 371 bp. Kết quả cho thấy chỉ có những mẫu chứa vi khuẩn thì mới cho kết quả dương tính. Chúng tôi điều kiện PCR đã được tối ưu. Như vậy, trong thực hành trước khi chúng ta cần định danh chính xác mẫu bệnh phẩm có vi khuẩn không chúng ta chỉ cần thực hiện một xét nghiệm PCR.

Sử dụng PCR 16S rRNA chúng tôi tiến hành kiểm tra trên 90 mẫu bệnh phẩm. So sánh với kết quả cấy

cho thấy nuôi cấy có tỷ lệ dương tính là 63/90 (70%) còn với bộ môi universal 16s rRNA mà chúng tôi sử dụng có thể phát hiện sự có mặt của vi khuẩn lên tới 76/90 (84,5%). Như vậy, so với nuôi cấy PCR 16S rRNA có độ nhạy cao hơn có ý nghĩa. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu của Insa và cộng sự cho thấy 16S PCR cho kết quả dương tính là 81.7%, trong khi đó nuôi cấy chỉ là 54.9% [3].

Sau khi khẳng định chất lượng của PCR đa môi cho ba gene đích copB, P6 gene, LytA của *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* và *Streptococcus pneumoniae*, chúng tôi tiến hành thử nghiệm trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm khuẩn thu thập tại khoa Nhi, Khoa vi sinh vật và Khoa truyền nhiễm của Bệnh viện TQUĐ 108. Qua kết quả trên cho thấy số mẫu dương tính ở cả hai phương pháp là tương đương nhau. Trong nhóm bệnh phẩm hầu họng, phương pháp nuôi cấy có 46 mẫu dương tính với một trong ba tác nhân trong tổng số 56 ca (82,14%) và 10 mẫu âm tính (17,86%). Kết quả của PCR đa môi có 44 trường hợp dương tính trong tổng số 56 ca (78,57%), âm tính là 12 ca (21,43%). Tuy nhiên, xét trên từng trường hợp chúng tôi thấy có sự khác nhau giữa nuôi cấy và PCR đa môi. Cụ thể, bằng phương pháp nuôi cấy đã phát hiện 84,78% *M.catarrhalis*, 2,24% *H.influenzae*, và 2,98% *S.pneumoniae*. Trong khi đó khi sử dụng PCR đa môi cho thấy khả năng phát hiện tác nhân vi sinh khá đồng đều *M.catarrhalis* là 25,01%, *H.influenzae* là 38,63% và *S.pneumoniae* là 36,36%. Như vậy, tỷ lệ phát hiện *H.influenzae*, *S.pneumoniae* bằng PCR đa môi là cao hơn rõ rệt so với phương pháp nuôi cấy. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Trong đó, tỷ lệ nuôi cấy thường xuyên thấp hơn PCR: *M.catarrhalis* (9,5% so với 36,5%), *H.influenzae* (9,5% so với 95,2%), và *S.pneumoniae* (15,9% so với 19%) [4].

KẾT LUẬN

Nghiên cứu so sánh hai phương pháp nuôi cấy và PCR đa môi tiến hành trên 90 mẫu bệnh phẩm lâm sàng kết quả cho thấy: Phản ứng PCR với bộ môi universal 16s rRNA có thể phát hiện sự có mặt của vi khuẩn ở 76/90 (84,5%) so với nuôi cấy là 63/90 (70%). PCR đa môi và nuôi cấy cho kết quả tương đương nhau về tỷ lệ dương tính (82,14 % so với 78,57%). Mặc dù, tỷ lệ phát hiện giữa các mầm bệnh thì PCR đa môi tỏ ra có ưu thế hơn. Tuy nhiên, trong thực hành không thể thay thế phương pháp này bằng phương pháp khác mà nên phối hợp cả 2 phương pháp để cho kết quả chẩn đoán cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Angus, D.C., W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, et al. (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care," *Crit Care Med*, 29(7): 1303-10.
2. Hagenbuchle, O., M. Santer, J.A. Steitz, R.J. Mans (1978). "Conservation of the primary structure at the 3' end of 18S rRNA from eucaryotic cells," *Cell*, 13(3): 551-63.

3. Insa, R., M. Marin, A. Martin, P. Martin-Rabadan, L. Alcalá, et al. "Systematic use of universal 16S rRNA gene polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for processing pleural effusions improves conventional culture techniques," *Medicine (Baltimore)*, 91(2): 103-10.

4. Shishegar, M., A. Faramarzi, T. Kazemi, A. Bayat, M. Motamedifar "Polymerase chain reaction, bacteriologic detection and antibiogram of bacteria isolated from otitis media with effusion in children, shiraz, iran," *Iran J Med Sci*, 36(4): 273-80.