

Xác định *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* bằng phương pháp PCR đa mồi ở bệnh nhân nhiễm trùng hô hấp

Trần Thị Tuyết Ngọc^{1,2*}, Nguyễn Xuân Cường³, Đinh Thị Hải¹,
Nguyễn Thị Đăng Khoa¹, Lê Thị Bảo Chi¹, Ngô Viết Quỳnh Trâm^{1*}

(1) Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

(2) Viện Y sinh học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(3) Bệnh viện đa khoa tỉnh Khánh Hòa

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Xác định tỷ lệ nhiễm *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* bằng kỹ thuật PCR đa mồi và *Haemophilus influenzae* type b bằng kỹ thuật PCR ở bệnh phẩm đường hô hấp từ bệnh nhân có nhiễm trùng hô hấp từ bệnh nhân có nhiễm trùng hô hấp tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế. So sánh phương pháp nuôi cấy, định danh tính chất sinh vật hoá học và phương pháp PCR đa mồi. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nuôi cấy định danh vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* dựa vào tính chất sinh vật hoá học của vi khuẩn. Thực hiện kỹ thuật PCR đa mồi phát hiện vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae*. Đối với các trường hợp phát hiện mẫu dương tính với *Haemophilus influenzae*, tiếp tục thực hiện kỹ thuật PCR xác định *Haemophilus influenzae* type b. **Kết quả:** Trong 146 mẫu bệnh phẩm, 24 mẫu dương tính bằng phương pháp nuôi cấy định danh bằng tính chất sinh vật hoá học, trong đó 12 (8,2%) trường hợp dương tính với *Haemophilus influenzae*, 10 (6,8%) trường hợp dương tính với *Streptococcus pneumoniae*, 02 trường hợp phát hiện đồng nhiễm *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* (1,4%). Phương pháp PCR đa mồi, có 29 (19,86%) mẫu dương tính với *Haemophilus influenzae* và 15 (10,27%) mẫu dương tính *Streptococcus pneumoniae*, 02 trường hợp phát hiện đồng nhiễm (1,4%). Trong 31 mẫu *Haemophilus influenzae* dương tính, có 5 (16,1%) trường hợp phát hiện dương tính *Haemophilus influenzae* type b. **Kết luận:** Phương pháp PCR đa mồi tỷ lệ phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* cao hơn so với phương pháp nuôi cấy định danh bằng tính chất sinh vật hoá học.

Từ khóa: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus influenzae* type b, PCR, nuôi cấy.

Determining *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by multiplex PCR in patients with respiratory infection in Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

Tran Thi Tuyet Ngoc^{1,2*}, Nguyen Xuan Cuong³, Dinh Thi Hai¹,
Nguyen Thi Dang Khoa¹, Le Thi Bao Chi¹, Ngo Viet Quynh Tram^{1*}

(1) Department of Microbiology, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

(2) Institute of Biomedicine, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(3) Khanh Hoa General Hospital

Abstract

Objectives: To determine the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by multiplex PCR, and *Haemophilus influenzae* type b by PCR in respiratory tract samples from patients with respiratory infections at Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital. Comparison of culture and multiplex PCR methods. **Methods:** The bacterial identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* was performed based on biochemical test. The multiplex PCR technique is used to detect *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. In the samples positive for *Haemophilus influenzae*, PCR was further performed to identify *Haemophilus influenzae* type b. **Results:** 24 were culture positive, for which 12 (8.2%) samples were positive for *Haemophilus influenzae*, 10 (6.8%) cases positive for *Streptococcus pneumoniae*, and 2 samples of co-infection (1.4%). The multiplex PCR method identified 29 (19.86%) samples positive for *Haemophilus influenzae* and 15 (10.27%) samples positive for *Streptococcus pneumoniae*, 2 samples of co-infection (1.4%). Among the 31 samples *Haemophilus influenzae* positive, 5(16.1%) samples

*Tác giả liên hệ: Trần Thị Tuyết Ngọc. Email: tttngoc@huemed-univ.edu.vn
Ngô Viết Quỳnh Trâm. Email: nvqtram@huemed-univ.edu.vn

were identified as *Haemophilus influenzae* type b. **Conclusion:** The multiplex PCR method has a higher detection rate for *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* compared to culture method.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus influenzae* type b, PCR, culture.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng đường hô hấp dưới là một gánh nặng cho toàn xã hội và ngành y tế, trong đó viêm phổi cộng đồng là một trong những nguyên nhân gây tử vong phổ biến ở các nước đang phát triển và chịu trách nhiệm cho hơn 3 triệu ca tử vong mỗi năm [1]. Trên thế giới nhiễm trùng đường hô hấp dưới là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở mọi lứa tuổi và nguyên nhân đứng thứ 4 trong một nghiên cứu thống kê năm 2019 [2].

Tại Việt Nam, theo Bộ Y tế năm 2018 các bệnh về viêm phổi đứng hàng đầu trong các bệnh với tỷ lệ mắc 698,7/100.000 dân, trong đó vùng có tỷ lệ mắc cao nhất là đồng bằng sông Cửu Long với 1040,6/100.000 dân và thấp nhất là vùng Đông Nam Bộ với tỷ lệ là 556,9/100.000 dân [3], một trong nhiễm trùng đường hô hấp phổ biến nhất là viêm phổi cộng đồng và đang có tỷ lệ gia tăng theo hàng năm và thay đổi theo các khu vực và mỗi quốc gia khác nhau, tuy nhiên tỷ lệ phát hiện các tác nhân gây viêm phổi cộng đồng còn rất hạn chế, và chỉ phát hiện được 30-40% các tác nhân gây bệnh ở các bệnh nhân viêm phổi cộng đồng. Một số vi khuẩn gây viêm phổi cộng đồng phổ biến có thể kể đến như *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, các vi khuẩn đường ruột, các virus gây bệnh đường hô hấp và các vi nấm gây bệnh cơ hội. *Streptococcus pneumoniae* là một trong những tác nhân phổ biến nhất được báo cáo ở trẻ em dưới 5 tuổi và người lớn trên 65 tuổi [4] [5] kể đến là *Haemophilus influenzae* là nguyên nhân phổ biến thứ hai gây viêm phổi cộng đồng sau *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* có 6 type huyết thanh a, b, c, d, e và f trong đó type b (*Hib*) là type gây bệnh nặng nhất bao gồm nhiễm trùng đường hô hấp dưới và các nhiễm trùng xâm lấn như nhiễm trùng máu và viêm màng não. Tuy nhiên, *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* là hai vi khuẩn khó nuôi cấy và khó phân lập, các nghiên cứu về tỷ lệ của hai loại vi khuẩn này trong nuôi cấy còn thấp và chưa phù hợp với các y văn kinh điển. Đồng thời, bệnh nhân thường dùng trước kháng sinh nên vào viện thường cấy âm tính, hoặc lấy bệnh phẩm không đúng vị trí. Do đó cần phải có những phương pháp hỗ trợ khác để hỗ trợ

chẩn đoán sớm các tác nhân này.

Theo nghiên cứu của Phạm Hùng Văn và các cộng sự về các tác nhân vi sinh gây viêm phổi cộng đồng từ năm 2016-2017 *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* là hai tác nhân vi khuẩn chính chiếm tỷ lệ lần lượt là 22,07% và 13,79% [6], năm 2021 Hoàn Lê và các cộng sự đã sử dụng kỹ thuật PCR đa mồi để xác định các căn nguyên gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội cho thấy tỷ lệ xét nghiệm dương tính của PCR nhiều hơn đáng kể so với phương pháp nuôi cấy vi khuẩn [7]. Việc chẩn đoán nhanh các tác nhân này và điều trị sớm rất quan trọng trong những trường hợp viêm phổi nặng và nguy hiểm đến tính mạng. Phương pháp nuôi cấy được biết đến như là một chẩn đoán vàng trong chẩn đoán và điều trị viêm phổi do vi khuẩn. Tuy nhiên, nó lại có những hạn chế về thời gian và nồng độ vi khuẩn còn sống thấp hoặc đã bị ức chế trong mẫu bệnh phẩm đối với những bệnh nhân đã sử dụng kháng sinh, không chỉ vậy phân lập và định danh vi khuẩn từ bệnh phẩm hô hấp dù thực hiện ở những phòng xét nghiệm có đủ phương tiện và có kiểm soát vẫn còn có những hạn chế là tỷ lệ phân lập vi khuẩn còn thấp liên quan đến bệnh phẩm lấy khi chưa dùng kháng sinh, chất lượng môi trường phong phú, sự chậm trễ trong vận chuyển mẫu nghiệm đến phòng thí nghiệm, các mẫu bệnh phẩm không được bảo quản và vận chuyển đến phòng xét nghiệm đúng quy định, không đánh giá được độ tin cậy của bệnh phẩm.

Kỹ thuật PCR phát hiện DNA của vi khuẩn do vậy có thể phát hiện được cả vi khuẩn còn sống và vi khuẩn đã chết miễn còn vật liệu DNA ở mẫu nghiệm.

Vì những lý do trên chúng tôi thực hiện tiến hành nghiên cứu đề tài: “Xác định tỷ lệ *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* ở bệnh phẩm hô hấp ở bệnh nhân nhiễm trùng hô hấp bằng kỹ thuật PCR đa mồi” với hai mục tiêu như sau:

1. Tỷ lệ phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* bằng kỹ thuật PCR đa mồi, tỷ lệ *Haemophilus influenzae* type b trong số các chủng *Haemophilus influenzae*.

2. So sánh tỷ lệ phát hiện các vi khuẩn nêu trên bằng phương pháp PCR và nuôi cấy định danh vi khuẩn bằng phương pháp truyền thống.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thu thập 146 mẫu bệnh phẩm đường hô hấp được chỉ định nuôi cấy vi khuẩn của bệnh nhân có nhiễm trùng đường hô hấp điều trị tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế.

Tiêu chuẩn từ chối mẫu bệnh phẩm:

- Bệnh phẩm đờm xám/trắng, bọt
- Bệnh phẩm đờm chỉ hiện diện nước bọt
- Bệnh phẩm đờm toàn nước, có lẫn thức ăn
- Các mẫu bệnh tham gia nghiên cứu không có hồ sơ bệnh án.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang và

phương pháp nghiên cứu thực nghiệm.

2.3. Địa điểm nghiên cứu và thời gian

Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế, mẫu bệnh phẩm thu thập từ 01/04/2023 đến 31/3/2024.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Hoá chất thực hiện kỹ thuật PCR:

Master Mix, 2X; PROMEGA, WI USA, các trình tự primer được chọn từ nguồn tài liệu đáng tin cậy (Bảng 1). Các trình tự primer được đặt tổng hợp tại Công ty Phù Sa, Việt Nam. Độ đặc hiệu của các primer đã được kiểm tra bằng cách thực hiện tìm kiếm BLAST® (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Bảng 1. Trình tự primer của các vùng gene được chọn trong nghiên cứu

Gene	Mỗi	Trình tự	Chiều dài (bp)	Tài liệu tham khảo
lytA	lytA_Sp_F	5'-GGCTACTGGTACGTACATTC-3'	395	[8]
	lytA_Sp_R	5'-AATCAAGCCATCTGGCTCTA-3'		
P6	P6 -F	5'-ACTTTTGGCGTTACTCTGT-3'	273	[9]
	P6-R	5'-TGTGCCTAATTACCAGCAT-3'		
Hib	Hib-F	5'-TGTTCCG CCATAACTTCATCTTAGC-3'	147	[10]
	Hib-R	5'-CTTACGCTTCTATCTCGGTGATTAATAA-3'		

Bộ kit *TopPURE®* GENOMIC DNA EXTRACTION KIT được sử dụng để tách chiết DNA, mẫu đờm được xử lý theo khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Sau khi tách chiết, DNA thu lại 50 µl. Nồng độ của DNA thu được đo bằng máy quang phổ NanoDrop 2000 (Thermo Khoa học, Massachusetts, Hoa Kỳ).

2.4.2. Trang thiết bị:

- Tủ an toàn sinh học cấp 2.
- Máy vortex.
- Máy ly tâm lạnh Mikro 200R, hãng Hettich, Đức.
- Máy PCR Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc, Foster, USA).
- Máy điện di đứng VE100, Việt Nam.
- Máy đọc gel High Performance UV Transilluminator, USA.

2.4.3. Chủng sử dụng làm chứng dương:

Streptococcus pneumoniae ATCC 27336 và *Haemophilus influenzae* ATCC 49766, *Haemophilus influenzae* type b ATCC 10211 được sử dụng làm chứng dương. Các chủng ATCC này được cấy trên môi trường nuôi cấy thích hợp. Sau đó, chọn vài khuẩn lạc chuyển vào 100 µL nước cất vô trùng để chuẩn bị huyền phù vi khuẩn cho quá trình chiết DNA.

2.4.4. Tiến hành nghiên cứu

2.4.4.1 Nuôi cấy và phân lập định danh *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* bằng phương pháp sinh vật hoá học

Mẫu bệnh phẩm sau khi gửi đến khoa xét nghiệm Vi sinh sẽ được đánh giá đại thể và vi thể theo thang điểm Barlett. Sau đó, diễn giải và nhận định kết quả:

- Điểm ≤0: Không tin cậy để cấy
- Điểm 1-2: Tin cậy vừa
- Điểm ≥3: Rất tin cậy

Những mẫu có độ tin cậy vừa và rất tin cậy sẽ được tiến hành nuôi cấy bán định lượng lên đĩa thạch chocolate và thạch máu và ủ vào tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi cấy, *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* sẽ được định danh bằng phương pháp sinh vật hoá học.

- Đối với *Streptococcus pneumoniae*: Trên môi trường thạch máu, chọn khuẩn lạc tròn bóng ướt do có vỏ (dạng S), đường kính 0,5-1 mm, không sắc tố, xung quanh khuẩn lạc có quầng tan huyết α. Trên tiêu bản nhuộm gram, *Streptococcus pneumoniae* có dạng cầu khuẩn hình ngọn nến, thường đứng thành đôi tạo hình cặp kính, bắt màu Gram dương. Tiến hành các thử nghiệm sinh vật hóa học:

catalase, thử nghiệm optochin và thử nghiệm ly giải bởi muối mật.

- Đối với *Haemophilus influenzae*: sau 24 giờ khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch chocolate, khuẩn lạc nhỏ kích thước khoảng 1-2mm, không gây tan huyết. Trên tiêu bản nhuộm gram, *Haemophilus influenzae* dạng trực khuẩn gram âm nhỏ. Tiến hành thử nghiệm với yếu tố X và V bằng khoanh giấy khuếch tán và thử nghiệm vệ tinh.

2.4.4.2. Quy trình PCR đa mồi phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae*

Quy trình tách chiết DNA của các chủng vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* được thực hiện bằng Bộ kit TopPURE® GENOMIC DNA EXTRACTION KIT

Trước khi kết hợp hai cặp mồi trong quy trình PCR đa mồi, chúng tôi đã thực hiện các thí nghiệm về biến đổi nhiệt độ trên máy PCR Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc, Foster, USA). Các điều kiện tối ưu về thể tích của các thành phần cho phản ứng PCR (Master mix, primer, H₂O, DNA) được liệt kê trong Bảng 2.

Bảng 2. Các thành phần của phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích
Master mix 2X	2x	12,5 µl
lytA_Sp_F	10 nM	0,5 µl
lytA_Sp_R	10 nM	0,5 µl
P6 -F	10 nM	0,5 µl
P6-R	10 nM	0,5 µl
H ₂ O		5,5 µl
DNA	<100 ng/phản ứng	5 µl

Quy trình PCR đa mồi được thực hiện với chương trình: giai đoạn 1 biến tính ban đầu 95°C: 5 phút, giai đoạn 2 thực hiện 35 chu kỳ (biến tính 95°C: 30 giây, bắt cặp mồi ở 54°C: 45 giây, và kéo dài 72°C: 40 giây), giai đoạn 3 kéo dài 72°C: 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trong gel agarose 1,6%, điện thế 70V, có bổ sung thuốc nhuộm DNA SaveView™Classic (abm, Canada). Chủng vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* ATCC 27336 và *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 được sử dụng

làm chứng dương cho phản ứng.

2.4.4.3. Quy trình PCR đơn mồi phát hiện *Haemophilus influenzae* type b

Các mẫu dương tính với *Haemophilus influenzae* đã được xác định bằng PCR đa mồi sẽ được sử dụng để xác định Hib bằng phương pháp PCR đơn mồi. Cặp mồi sử dụng cho PCR chẩn đoán *Haemophilus influenzae* type b là Hpd (147bp) được tham khảo trong nghiên cứu của Ngô Viết Quỳnh Trâm và các cộng sự [11].

Bảng 3. Các thành phần của phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích
Master mix 2X	2x	12,5
Hib-F	10 nM	1 µl
Hib-R	10 nM	1 µl
H ₂ O		6,5 µl
DNA	<100 ng/phản ứng	5 µl

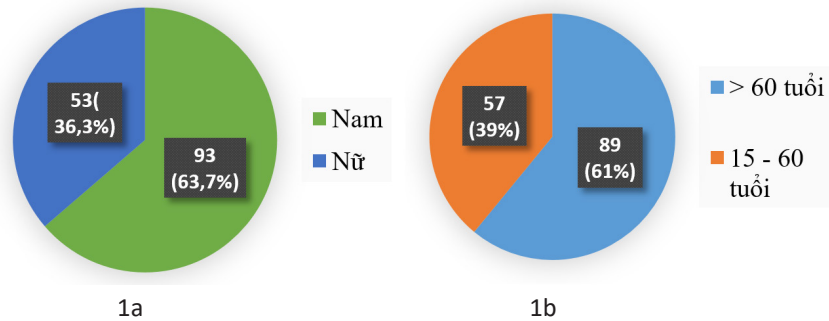
Quy trình PCR đơn mồi được thực hiện với chương trình như sau: quy trình PCR đơn mồi được thực hiện với chương trình: giai đoạn 1 biến tính ban đầu 95°C: 5 phút, giai đoạn 2 thực hiện 40 chu kỳ (biến tính 95°C: 10 giây, bắt cặp mồi ở 60°C: 1 phút, và kéo dài 72°C: 30 giây), giai đoạn 3 kéo dài 72°C: 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng

điện di trong gel agarose 1,6%, điện thế 70V, có bổ sung thuốc nhuộm DNA SaveView™Classic (abm, Canada). Chủng vi khuẩn *Haemophilus influenzae* type b (ATCC 10211) được sử dụng làm chứng dương cho phản ứng. Phần mềm SPSS 20 for Windows (SPSS, Chicago, Mỹ) được sử dụng để xử lý các dữ liệu và thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm về tuổi và giới tính của đối tượng nghiên cứu:

Tỷ lệ giới tính của bệnh nhân được thể hiện ở biểu đồ 1a và 1b.



Biểu đồ 1. a) Tỷ lệ giới tính của bệnh nhân
b) Tỷ Phân bố tuổi của bệnh nhân

Trong 146 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân được đưa vào nghiên cứu, bệnh nhân nam chiếm đa số với 93 trường hợp chiếm tỷ lệ 63,7% và nữ giới là 53 trường hợp chiếm tỷ lệ là 36,3%. Bệnh nhân trên 60 tuổi chiếm đa số với 89 trường hợp, chiếm tỷ lệ 61% so với độ tuổi từ 15 đến 60 tuổi là 57 trường hợp chiếm tỷ lệ 39%. Trong nghiên cứu này, mẫu thu thập chưa ghi nhận những trường hợp bệnh nhân dưới 15 tuổi.

3.2. Tỷ lệ *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* phân lập được bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống

Bảng 4. Tỷ lệ *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* phân lập bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống

Nuôi cấy	Dương tính		Âm tính		Tổng cộng	
	n	%	n	%	n	%
<i>S. pneumoniae</i>	10	6,8%	136	93,2%	146	100%
<i>H. influenzae</i>	12	8,2%	134	91,8%	146	100%
<i>S. pneumoniae</i> và <i>H. influenzae</i>	2	1,4%	144	98,6%	146	100%

Phương pháp nuôi cấy và định danh bằng tính chất sinh vật hóa học có 10 (6,8%) mẫu dương tính *Streptococcus pneumoniae* và 12 (8,2%) mẫu dương tính với *Haemophilus influenzae*, 02 trường hợp phát hiện đồng nhiễm *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* chiếm tỷ lệ 1,4%.

Bảng 5. Tỷ lệ phát hiện *S. pneumoniae* và *H. influenzae* bằng phương pháp PCR đa mồi

PCR đa mồi	Dương tính		Âm tính		Tổng cộng	
	n	%	n	%	n	%
<i>S. pneumoniae</i>	15	10,27%	131	89,73%	146	100%
<i>H. influenzae</i>	29	19,86%	117	80,14%	146	100%
<i>S. pneumoniae</i> và <i>H. influenzae</i>	2	1,4%	144	98,6%	146	100%

Phương pháp PCR đa mồi, có 15 (10,27%) mẫu dương tính *Streptococcus pneumoniae* và 29 (19,86%) mẫu dương tính với *Haemophilus influenzae*, 02 trường hợp phát hiện đồng nhiễm *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* chiếm tỷ lệ 1,4%.

Bảng 6. Tỷ lệ *Haemophilus influenzae* type b trong tổng số 146 mẫu bệnh phẩm

<i>H. influenzae</i> týp b	Số lượng	Tỷ lệ %
Dương tính	5	16,1%
Âm tính	26	83,9%
Tổng	31	100%

Trong số 31 chủng *Haemophilus influenzae*. được xác định, bằng phương pháp PCR đơn mỗi phát hiện có 5 chủng *Haemophilus influenzae* type b, chiếm tỷ lệ 16,1%. Như vậy, trong tổng số 146 mẫu bệnh phẩm, tỷ lệ *Haemophilus influenzae* type b là 3,4% (5/146).

3.3. So sánh kết quả chẩn đoán của kỹ thuật PCR đa mồi và nuôi cấy, định danh bằng tính chất tính chất sinh vật hoá học truyền thống

Bảng 7. Tỷ lệ phát hiện *S. pneumoniae* và *H. influenzae* bằng phương pháp PCR đa mồi và phương pháp nuôi cấy định danh tính chất sinh vật hoá học

Phương pháp	Nuôi cấy, định danh tính chất sinh vật hoá học								
	<i>S.pneumoniae</i>			<i>H.influenzae</i>			<i>S.pneumoniae</i> và <i>H.influenzae</i>		
	Dương tính	Âm tính	Tổng	Dương tính	Âm tính	Tổng	Dương tính	Âm tính	Tổng
PCR (+)	10	5	15	12	17	29	2	0	2
PCR (-)	0	131	131	0	117	117	0	144	144
Tổng	10	136	146	12	132	146	2	144	146

Trong 146 mẫu bệnh phẩm đường hô hấp, tỷ lệ phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* bằng phương pháp nuôi cấy định danh bằng tính chất sinh vật hoá học lần lượt là 6,8% và 8,2%. Đối với phương pháp PCR đa mồi, tỷ lệ phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* là 10,27% và 19,86%.

Trong đó, có 02 trường hợp phát hiện đồng nhiễm *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* ở cả hai phương pháp PCR đa mồi và nuôi cấy định danh bằng tính chất sinh vật hoá học chiếm tỷ lệ 1,4% (2/146).

4. BÀN LUẬN

Trong 146 bệnh nhân có nhiễm trùng phẩm đường hô hấp được đưa vào nghiên cứu, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ nam giới chiếm đa số với 64% so với nữ giới là 36%, kết quả này tương đồng với một số kết quả nghiên cứu trong nước và nước ngoài như của tác giả Lý Khánh Vân (nam giới chiếm 62,5%, nữ giới chiếm 37,5%) [12], Trần Thị Ngân và cộng sự (nam giới chiếm 66,1% và nữ giới là 33,9%) [13]. Muluneh Assefa và cộng sự (nam giới chiếm đa số với là 65,4%) [14] M.I. Costa và cộng sự (tỷ lệ nam nữ lần lượt là 55,7% và 44,3%) [15]. Các nghiên cứu của các nhóm tác giả trên cũng góp phần giải thích cho tỷ lệ tử vong do nhiễm trùng đường hô hấp dưới của nam cao hơn nữ trong thống kê của Global Burden Disease (GBD) năm 2019 [2], tỷ lệ nam giới cao trong các bệnh nhân có nhiễm trùng đường hô hấp có thể do thói quen hút thuốc lá, nghiện rượu hoặc nguy cơ phơi nhiễm do đặc thù của một số nghề nghiệp. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng ghi nhận tỷ lệ bệnh nhân có độ tuổi trên 60 tuổi chiếm đa số với 61% so với độ tuổi từ 15 đến 60 tuổi là 39%, tỷ lệ này cũng tương đồng với một số nghiên cứu như tác giả Lý Khánh Vân, Đặng Quỳnh Giao Vũ [12, 16], một số tác giả khác cho rằng tỷ lệ mắc viêm phổi cao ở độ tuổi sau 65 tuổi như Trần Thị Ngân, Lê Văn Thêm, Antoni Torres, và S. Jain [4, 13, 15, 16]. Các nghiên cứu còn cho thấy tỷ lệ nhóm bệnh nhân trên 60 tuổi giao động từ 67%-85% và có xu hướng mắc bệnh tăng dần

theo tuổi [4], lý giải cho điều này là các bệnh nhân nhiễm trùng đường hô hấp trên 60 tuổi thường có hệ thống miễn dịch yếu, mắc các bệnh nền như viêm phổi tắc nghẽn mãn tính, hen phế quản, tim mạch, tạo điều kiện cho các tác nhân gây viêm phổi xâm nhập đường hô hấp và gây bệnh, đồng thời cũng giải thích vì sao các bệnh nhân lớn tuổi thường có tỷ lệ tử vong cao hơn trong các nghiên cứu.

Đối với phương pháp PCR đa mồi, tỷ lệ phát hiện *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* và đồng nhiễm cả hai loại vi khuẩn này lần lượt là 10,27%, 19,86% và 1,4%. Kết quả này tương tự với nghiên cứu Gadsby NJ và cộng sự [17] *Haemophilus influenzae* (40,2%) và *Streptococcus pneumoniae* (35,6%). Theo nghiên cứu của Ahmad Farajzadeh Sheikh và cộng sự [5] tỷ lệ *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* và đồng nhiễm là 35,8%, 11,9%, và 3,2%. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện PCR đơn mồi để chẩn đoán *Haemophilus influenzae* type b, tỷ lệ phát hiện Hib là 3,4% (5/146). Kết quả phát hiện *Haemophilus influenzae* type b của Bagherzadeh Khodashahri S và cộng sự [18] là 8%. Tương tự, theo nghiên cứu của Ahmad Farajzadeh Sheikh và cộng sự [5] tỷ lệ *Haemophilus influenzae* type b là 2,1%. Tầm quan trọng của việc định danh phát hiện sớm các tác nhân gây bệnh trong nhiễm trùng đường hô hấp dưới có thể làm giảm tỷ lệ mắc bệnh và hạn chế được lạm dụng thuốc kháng sinh trong điều trị. Phương pháp

sinh học phân tử PCR đa mồi có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Phương pháp này giúp cho phát hiện, chẩn đoán được nhanh chóng, chúng ta có thể xử lý nhiều mẫu cùng lúc, đem lại kết quả kịp thời để hỗ trợ cho lâm sàng điều trị bệnh nhân. Nhiều phương pháp PCR đã được áp dụng trong việc phát hiện vi khuẩn và cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn nhiều so với phương pháp nuôi cấy định danh bằng phương pháp truyền thống [19, 20].

Trong nghiên cứu này, cả hai phương pháp nuôi cấy định danh bằng tính chất sinh vật hoá học và phương pháp PCR đa mồi được sử dụng để phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* ở bệnh nhân có nhiễm trùng hô hấp. Kết quả cho thấy, tỷ lệ phát hiện của phương pháp PCR đa mồi (21,2%) cao hơn so với phương pháp nuôi cấy thông thường (11,6%). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhiều nghiên cứu trong nước và trên toàn thế giới. Trong một nghiên cứu của Ozlem Aydemir và cộng sự, tỷ lệ phát hiện vi khuẩn bằng phương pháp PCR đa mồi là 125 (63,5%), trong khi đó phương pháp nuôi cấy là 62 (31,5%), của Ahmad Farajzadeh Sheikh và cộng sự [5] với tỷ lệ phát hiện của phương pháp PCR đa mồi (47,8%) và phương pháp nuôi cấy thông thường (23,9%). Ngoài ra, trong một nghiên cứu của Bjarnason A và cộng sự [21], tỷ lệ PCR đa mồi trong việc phát hiện *Haemophilus influenza* cao hơn so với *Streptococcus pneumoniae*, kết quả trong nghiên cứu này, phương pháp nuôi cấy định danh bằng tính chất sinh vật hoá học tỷ lệ phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* và đồng nhiễm lần lượt là 8,2%, 11,6% và 1,4%. Tỷ lệ này tương tự với nghiên cứu của Costa và cộng sự [15], tỷ lệ mắc *Haemophilus influenzae* là 21,4% cao hơn so với *Streptococcus pneumoniae* 14,1%. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Sheikh và cộng sự [5] tỷ lệ phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* lần lượt là 16,3% và 7,6%. Trong khi đó các nghiên cứu trong nước cũng có sự khác biệt, trong nghiên cứu năm 2017 của tác giả Phạm Hùng Vân và các cộng sự về các tác nhân vi sinh có trong mẫu đàm của các bệnh nhân viêm phổi cộng đồng, trong 271 mẫu đàm chỉ phân lập được 03 (1,1%) trường hợp *H. influenzae* và không phân lập được *S. pneumoniae* [6], nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của tác giả Lê Thị Ngân với tỷ lệ phát hiện *H. influenzae* thấp chỉ là 1/56 mẫu bệnh phẩm đường hô hấp và không phân lập được *S. pneumoniae* [13]. Nghiên cứu của tác giả Lý Khánh

Vân cũng cho thấy tỷ lệ phân lập dương tính thấp với tỷ lệ là 02 (0,6%) trường hợp cho mỗi tác nhân, các nghiên cứu cũng chưa ghi nhận trường hợp phát hiện đồng nhiễm khi nuôi cấy hai tác nhân này. Nhìn chung, tỷ lệ phân lập *S. pneumoniae* và *H. influenzae* ở các nghiên cứu có sự khác nhau, điều này có thể lý giải do có sự khác nhau về sự phân bố về dịch tễ học của các tác nhân gây viêm phổi của các khu vực có sự khác nhau, ngoài ra sự khác biệt về các phương pháp định danh giữa các phòng xét nghiệm cũng có sự khác biệt, dẫn đến độ nhạy và độ đặc hiệu cũng khác nhau giữa các phương pháp (tính chất sinh vật cổ điển, API, hệ thống định danh tự động, MALDI – TOF). *S. pneumoniae* và *H. influenzae* là những vi khuẩn khó nuôi cấy và phân lập nhất là trong những bệnh phẩm đường hô hấp có nhiều tạp chất và thường bị lấn át bởi các vi khuẩn thường trú/ gây bệnh khác, do đó cần phải có những phương pháp sinh học phân tử để hỗ trợ và chẩn đoán sớm các tác nhân gây viêm phổi, từ đó cải thiện chất lượng dịch vụ y tế, giảm thiểu tỷ lệ kháng thuốc và tử vong trong ở các bệnh nhân có nhiễm trùng đường hô hấp.

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ phát hiện *Haemophilus influenzae* cao hơn *Streptococcus pneumoniae* trong tổng số 146 mẫu bệnh phẩm đường hô hấp được chỉ định nuôi cấy vi khuẩn của bệnh nhân có nhiễm trùng đường hô hấp được điều trị tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế. Trong đó, phương pháp PCR đa mồi có 31 (21,2%) mẫu dương tính với *Haemophilus influenzae* và 17 (11,6%) mẫu dương tính *Streptococcus pneumoniae*. Tỷ lệ *Haemophilus influenzae* type b dương tính là 3,4% trong tổng số 146 mẫu bệnh phẩm thu thập được.

Trong nghiên cứu này, cả hai phương pháp nuôi cấy định danh bằng tính chất sinh vật hoá học và phương pháp PCR đa mồi được sử dụng để phát hiện *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* ở bệnh nhân có nhiễm trùng hô hấp. Kết quả cho thấy, tỷ lệ phát hiện của phương pháp PCR đa mồi (31,53%) cao hơn so với phương pháp nuôi cấy bằng phương pháp thông thường (16,4%).

Phương pháp PCR đa mồi với nhiều ưu điểm, rút ngắn được thời gian định danh vi khuẩn, tránh được các nguy cơ tạp nhiễm bệnh phẩm. Chính vì vậy, đây là phương pháp cần được đưa vào để giúp cho việc chẩn đoán, phát hiện và điều trị sớm các tác nhân gây nhiễm trùng đường hô hấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. D. Severiche-Bueno, E. Gamboa, L. F. Reyes, and S. H. Chotirmall. Hot topics and current controversies in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Breathe* 2019, 15(4):286–295.
2. Theo Vos, Stephen S Lim, Cristiana Abbafati, Kaja M Abbas, Mohammad Abbasi, Mitra Abbasifard, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2020, 396(10258):1204–1222.
3. Bộ Y tế. Niên giám thống kê y tế; 2018. tr.226.
4. Seema Jain, Wesley H Self, Richard G Wunderink, Sherene Fakhran, Robert Balk, Anna M Bramley, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N. Engl. J. Med* 2015, 373(5): 415–427.
5. A. F. Sheikh, R. Rahimi, H. Meghdadi, A. Alami, and M. Saki. Correction to: Multiplex polymerase chain reaction detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* and their antibiotic resistance in patients with community-acquired pneumonia from southwest Iran. *BMC Microbiol* 2022, 22(1): 343
6. P.H.Vân, N.V.Thành, T.V.Ngọc, N.Đ.Duy, L.T.T.Huong, C.T.M.Thúy, L.K.Vân. Tác nhân vi sinh gây viêm phổi cộng đồng phải nhập viện Kết quả nghiên cứu REAL 2016-2017. [12]; Nguồn từ: URL: <https://www.hoihothapthcm.org/index.php/chuyende/benh-phoi/386-tac-nhan-vi-sinh-gay-viem-phoi-cong-dong-phai-nhap-vien-ket-qua-nghien-cuu-real-2016-2017>
7. Lê Hoàn, Lê Minh Hằng, Đinh Thị Thanh Hồng, Trần Khánh Chi, Trần Minh Châu, Nguyễn Thị Hà, Nguyễn Thị Như Quỳnh. Xác định căn nguyên nhiễm trùng đường hô hấp dưới cộng đồng bằng kỹ thuật chuỗi phản ứng polymerase đa mồi tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. *Tạp chí Nghiên cứu Y học* 2021, 147(11): 131–137.
8. R. C. Albuquerque, A. C. R. Moreno, S. R. dos Santos, S. L. B. Ragazzi, and M. B. Martinez. Multiplex-PCR for diagnosis of bacterial meningitis. *Brazilian J. Microbiol* 2019; 50(2): 435–443.
9. I. de Filippis, C. F. de Andrade, N. Caldeira, A. C. de Azevedo, and A. E. de Almeida. Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples. *Brazilian J. Infect. Dis.* 2016; 20(4): 335–341.
10. Y. Maaroufi, J. M. De Bruyne, C. Heymans, and F. Crokaert. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(7): 2305–2308
11. Ngo Viet Quynh Tram, Nguyen Thi Ti Na, Nguyen Hoang Bach, Tran Thi Tuyet Ngoc, Nguyen Thi Nam Lien, Le Van An, Antonella Santona, Piero Cappuccinelli. Development of Multiplex Real-Time Pcr Assay for Six Pathogens: Rapid Tool for Diagnosis of Bacterial Meningitis. *J. Med. Pharm.* 2019; 9(3): 60–66.
12. Lý Khánh Vân. Phổ tác nhân vi sinh gây viêm phổi mắc phải cộng đồng ở người lớn nhập viện. Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh [Luận văn tiến sĩ]; Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh; 2024.
13. Trần Thị Ngân, Lê Hoàn, Lê Minh Hằng, Đinh Thị Thanh Hồng, Nguyễn Thị Như Quỳnh, Trần Minh Châu. Giá trị của real-time pcr đa mồi trong xác định căn nguyên nhiễm trùng đường hô hấp dưới cộng đồng. *Tạp chí nghiên cứu y học*; 2022; 156(8).
14. M. Assefa, A. Tigabu, T. Belachew, and B. Tessema. Bacterial profile, antimicrobial susceptibility patterns, and associated factors of community-acquired pneumonia among adult patients in Gondar, Northwest Ethiopia: A cross-sectional study. *PLoS One* 2022; 17(2): 1–18.
15. M. I. Costa, A. Cipriano, F.V. Santos, S.R. Valdoeiros, I. Furtado, A. Machadoc, et al. Clinical profile and microbiological aetiology diagnosis in adult patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Pulmonology* 2022; 28(5): 358–367.
16. Lê Văn Thêm. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân viêm phổi mắc phải tại cộng đồng điều trị ở bệnh viện đa khoa Xanh Pôn. *Tạp chí Y học Việt Nam* 2022; 512(2): 113–117.
17. N. J. Gadsby et al. Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(7): 817–823.
18. S. B. Khodashahri et al. Genotyping of *Haemophilus influenzae* type b strains and their incidence in the clinical samples isolated from Iranian patients. *Iran. J. Microbiol.* 2015, 7(3): 136–143.
19. B. Kashyap, S. Kumar, G. R. Sethi, B. C. Das, and S. R. Saigal. Comparison of PCR, culture & serological tests for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in community-acquired lower respiratory tract infections in children. *Indian J. Med. Res.* 2008; 128(2): 134–139.
20. J. Boman, C. A. Gaydos, and T. C. Quinn. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(12): 3791–3799.
21. A. Bjarnason et al. Utility of oropharyngeal real-time PCR for *S. pneumoniae* and *H. influenzae* for diagnosis of pneumonia in adults. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 36(3): 529–536.