

Đặc điểm vi sinh và hiệu quả chẩn đoán giữa cấy máu và real-time PCR ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

Characteristic of pathogen and effectiveness of diagnosis between blood culture and real-time PCR in septic patients

Trần Thị Liên***, Đỗ Văn Đông**,
Vũ Viết Sáng**, Ngô Tất Trung**

*Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp,
**Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Tìm hiểu các căn nguyên và đánh giá hiệu quả chẩn đoán giữa cấy máu và real-time PCR ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết. **Đối tượng và phương pháp:** 105 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết theo tiêu chuẩn Sepsis 3 được đưa vào nghiên cứu. Mỗi bệnh nhân đều được xác định căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết bằng cấy máu và/hoặc real-time PCR máu. **Kết quả:** Bằng phương pháp cấy máu, xác định được 74 tác nhân gây bệnh (70,5%) và *E. coli* (14,3%), *K. pneumoniae* (10,5%), *S. aureus* (12,4%) là các căn nguyên vi khuẩn hay gặp nhất. 76 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết được làm đồng thời 2 phương pháp thì real-time PCR phát hiện được 50 căn nguyên gây bệnh (65,8%) và *E. coli* (19,7%), *K. pneumoniae* (13,2%) là 2 căn nguyên hay gặp nhất. Tỷ lệ dương tính của real-time PCR cao hơn cấy máu (65,8% so với 53,9%) với $p < 0,05$. Kết hợp hai phương pháp cho tỷ lệ dương tính là 84,2% (64/76). Tỷ lệ tương đồng dương tính giữa 2 phương pháp là 81,5% (22/27). **Kết luận:** *E. coli*, *K. pneumoniae* và *S. aureus* là các căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết hay gặp nhất và real-time PCR là một phương pháp có giá trị hỗ trợ tốt cho chẩn đoán và xác định căn nguyên gây bệnh nhiễm khuẩn huyết.

Từ khóa: Nhiễm khuẩn huyết, cấy máu, real-time PCR.

Summary

Objective: To find out pathogens and evaluate the effectiveness of diagnosis between blood culture and real-time PCR in septic patients. **Subject and method:** 105 septic patients according to Sepsis-3 were recruited into this study. Causative pathogens were identified by conventional blood culture (BC) and/or RT-PCR concomitant. **Result:** By blood culture method, 74 pathogens were identified, *E. coli* (14.3%), *K. pneumoniae* (10.5%) and *S. aureus* (12.4%) were the most common bacteria. Among 76 septic patients who were conducted 2 methods, real-time PCR detected 50 pathogens and *E. coli* (19.7%), *K. pneumoniae* (13.2%) were the most common bacteria. The rate of positive real-time PCR was higher than that of blood culture (65.8% vs 53.9%, $p < 0.05$). Combining 2 methods gave a positive of 84.2%. The rate of positive similarity between the two methods was 81.5% (22/27). **Conclusion:** *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus* were the most common pathogens caused sepsis and real-time PCR assay was an effective assay in identifying pathogens in sepsis patients

Ngày nhận bài: 23/8/2019, ngày chấp nhận đăng: 27/8/2019

Người phản hồi: Đỗ Văn Đông, Email: vandongdohvqy@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Keywords: Sepsis, blood culture, real-time PCR.

1. Đặt vấn đề

Nhiễm khuẩn huyết (NKH) là một vấn đề sức khỏe trên toàn thế giới với tỷ lệ tử vong cao. Theo báo cáo của Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Bệnh tật Hoa Kỳ, cứ mỗi năm có ít nhất 1,7 triệu người lớn ở Mỹ mắc NKH, trong đó gần 270.000 người Mỹ tử vong là kết quả của NKH mỗi năm và đặc biệt cứ 1 trong 3 bệnh nhân (BN) tử vong nội viện có nguyên nhân là NKH [1]. Việc phát hiện sớm và điều trị kháng sinh thích hợp là yếu tố quan trọng nhất trong việc cải thiện kết cục của BN NKH. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng cứ mỗi giờ trì hoãn liệu pháp kháng sinh sau khi xuất hiện sốc nhiễm khuẩn sẽ làm tăng tỷ lệ tử vong lên 7,6% [2]. Cấy máu vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán NKH, tuy nhiên phương pháp này mất nhiều thời gian (ít nhất 48 - 72 giờ). Khi chưa có kết quả cấy máu hoặc cấy máu âm tính, BN được dùng liệu pháp kháng sinh theo kinh nghiệm dựa trên việc phỏng đoán tác nhân gây bệnh cũng như đặc tính kháng thuốc ở địa phương. Việc tổng kết dữ liệu vi sinh ở các bệnh viện hàng năm là cơ sở vô cùng quan trọng nhằm giúp các bác sĩ lâm sàng phỏng đoán căn nguyên vi sinh cũng như tính kháng kháng sinh dẫn đến nâng cao chất lượng và hiệu quả điều trị. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: *Tìm hiểu đặc điểm vi sinh và hiệu quả chẩn đoán giữa cấy máu và real-time PCR ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.*

3. Kết quả

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Bệnh nhân được chẩn đoán NKH theo tiêu chuẩn Sepsis-3: Điểm SOFA tăng cấp tính ≥ 2 điểm so với thời điểm trước nhiễm khuẩn. Có biểu hiện nhiễm khuẩn: Sốt (thân nhiệt $> 37^{\circ}\text{C}$) hoặc tụt thân nhiệt (thân nhiệt $< 36^{\circ}\text{C}$) kèm theo tăng các marker viêm bạch cầu, neutrophil máu ngoại vi, procalcitonin (PCT)...

2.2. Phương pháp

Nghiên cứu mô tả, cắt ngang, được thực hiện hồi cứu từ tháng 12/2014 đến tháng 12/2017. Trong đó, 76 BN NKH ở Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 được thực hiện đồng thời 2 phương pháp xác định căn nguyên gây bệnh và 29 BN NKH ở Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp chỉ được thực hiện phương pháp cấy máu. Hai bình cấy máu được lấy từ 2 vị trí, nuôi cấy bằng hệ thống tự động Bactec FX Top và định danh bằng hệ thống Vitek 2. Mẫu máu cho xét nghiệm real-time PCR (2ml) được thực hiện theo quy trình tại Khoa Sinh học Phân tử - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Sản phẩm DNA sau đó được dùng để chạy phản ứng real-time PCR với mỗi đặc hiệu cho 14 vi khuẩn: *Staphylococcus* sp., *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *S. pneumoniae*, *S. suis*, *Enterococcus* sp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. pseudomallei*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Salmonella* sp. và thêm 2 vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối *Bacteroides* sp và *Fusobacterium* sp. Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0.

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

Chỉ số		Số bệnh nhân (n = 105)	Tỷ lệ %
Tuổi		55,9 $\pm$ 17,0	
Giới (nam)		81	77,1
Bệnh lý nền	Đái tháo đường	28	26,7
	Bệnh lý tim mạch	24	22,9

	Bệnh lý tiêu hóa	19	18,1
	Bệnh lý miễn dịch	8	7,6
	Bệnh lý thần kinh	8	7,6
	Bệnh lý hô hấp	7	6,7
	Bệnh lý thận tiết niệu	5	4,8

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu (Tiếp theo)

Chỉ số		Số bệnh nhân (n = 105)	Tỷ lệ %
Suy tạng	Suy hô hấp	52	49,5
	Suy gan	50	47,6
	Suy thận	44	41,9
	Rối loạn đông máu	40	38,1
	Suy tuần hoàn	39	37,1
	Suy chức năng thần kinh	22	21,0
SOFA ($\bar{X} \pm SD$) (điểm)		5,9 $\pm$ 3,6	
Kết quả điều trị	Sốc	43	41,0
	Tử vong	38	36,2

Nhận xét: 105 BN nghiên cứu có tuổi trung bình $55,9 \pm 17,0$ năm. Tỷ lệ BN nam chiếm đa số 77,1%. Đái tháo đường là bệnh lý nền hay gặp (26,7%), tiếp theo là bệnh lý tim mạch (22,9%), bệnh lý tiêu hóa (18,1%). Điểm SOFA trung bình của nhóm nghiên cứu là $5,9 \pm 3,6$, trong đó hay gặp nhất là suy hô hấp (49,5%), ít gặp nhất là suy chức năng thần kinh (21,0%). Tỷ lệ BN sốc chiếm 41,0%, trong khi đó tỷ lệ tử vong trong nghiên cứu là 36,2%.

Bảng 2. Ổ nhiễm khuẩn tiên phát

Ổ nhiễm khuẩn tiên phát	Số bệnh nhân (n = 105)	Tỷ lệ %
Đường hô hấp	27	25,7
Đường tiêu hóa	23	21,9
Thần kinh trung ương	18	17,1
Đường tiết niệu	15	14,3
Da, mô mềm	14	13,3
Không rõ	8	7,6

Nhận xét: Ổ nhiễm khuẩn tiên phát hay gặp nhất là đường hô hấp (25,7%), tiếp theo từ đường tiêu hóa (21,9%), thần kinh trung ương (17,1%), tiết niệu (14,3%), da-mô mềm (13,3%) và không rõ ổ nhiễm khuẩn (7,6%).

Bảng 3. Kết quả xác định tác nhân gây bệnh bằng cấy máu

Tác nhân gây bệnh		Số bệnh nhân (n = 105)	Tỷ lệ %
Vi khuẩn Gram âm	<i>E. coli</i>	21	20,0
	<i>K. pneumoniae</i>	13	12,4
	<i>E. cloacae</i>	2	1,9
	<i>Salmonella</i> sp.	2	1,9
	<i>Aeromonas</i> sp.	1	1,0

	<i>B. cepacia</i>	1	1,0
	<i>B. pseudomallei</i>	1	1,0
	<i>M. morgani</i>	1	1,0
	<i>N. meningitidis</i>	1	1,0
	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	1,0
	<i>S. marcescens</i>	1	1,0
	<i>S. typhi</i>	1	1,0

Bảng 3. Kết quả xác định tác nhân gây bệnh bằng cấy máu (Tiếp theo)

Tác nhân gây bệnh		Số bệnh nhân (n = 105)	Tỷ lệ %
Vi khuẩn Gram dương	<i>S. aureus</i>	13	12,4
	<i>S. suis</i>	6	5,7
	<i>Streptococcus</i> sp.	3	2,9
	<i>S. epidermidis</i>	2	1,9
	<i>L. monocytogenes</i>	1	1,0
	<i>S. pneumoniae</i>	1	1,0
	<i>S. sanguinis</i>	1	1,0
Nấm	<i>Candida</i> sp.	1	1,0
Tổng		74	70,5

Nhận xét: Bằng phương pháp cấy máu phát hiện được 74 tác nhân gây bệnh trong số 105 BN NKH (70,5%). Trong đó, *E. coli* (14,3%), *K. pneumoniae* (10,5%), *S. aureus* (12,4%) là các căn nguyên vi khuẩn hay gặp nhất.

Bảng 4. Kết quả xác định tác nhân gây bệnh bằng real-time PCR máu

Tác nhân gây bệnh		Số bệnh nhân (n = 76)	Tỷ lệ %
Vi khuẩn Gram âm	<i>E. coli</i>	15	19,7
	<i>K. pneumoniae</i>	10	13,2
	<i>N. meningitidis</i>	7	9,2
Vi khuẩn Gram dương	<i>S. pneumoniae</i>	6	7,9
	<i>S. suis</i>	5	6,6
	<i>Streptococcus</i> sp.	4	5,3
	<i>S. aureus</i>	2	2,6
	<i>Enterococcus</i> sp.	1	1,3
Tổng		50	65,8

Nhận xét: 105 BN NKH có 76 trường hợp được làm đồng thời cấy máu và PCR để xác định căn nguyên gây NKH. Bằng phương pháp real-time PCR phát hiện được 50 tác nhân gây bệnh trong số 76 BN NKH (65,8%). Trong đó, *E. coli* (19,7%) và *K. pneumoniae* (13,2%) là 2 căn nguyên hay gặp nhất.

Bảng 5. Kết quả của phương pháp cấy máu và real-time PCR

Phương pháp	Cấy máu (+)	Cấy máu (-)	Tổng
Real time PCR (+), n (%)	27	23	50 (65,8%)
Real time PCR (-), n (%)	14	12	26
Tổng, n (%)	41 (53,9)	35	76

Nhận xét: 105 BN NKH có 76 trường hợp được làm đồng thời cấy máu và PCR để xác định căn nguyên gây NKH. Tỷ lệ dương tính của real-time PCR cao hơn cấy máu (65,8% so với 53,9%) với $p < 0,05$. Kết hợp hai phương pháp thì tỷ lệ dương tính là 84,2% (64/76). Tỷ lệ tương đồng dương tính giữa 2 phương pháp là 81,5% (22/27).

4. Bàn luận

Đặc điểm về tuổi và giới: Tuổi trung bình của nghiên cứu là $55,9 \pm 17,0$ năm. Đa phần đối tượng nghiên cứu là nam giới, chiếm tỷ lệ 77,1%.

Bệnh lý nền: Đái tháo đường là bệnh lý nền hay gặp (26,7%), tiếp theo là bệnh lý tim mạch (22,9%), bệnh lý tiêu hóa (18,1%).

Điểm SOFA trong nghiên cứu là $5,9 \pm 3,6$, trong đó hay gặp nhất là suy hô hấp (49,5%), ít gặp nhất là suy chức năng thần kinh (21,0%). Kết quả này thấp hơn so với tác giả Suberviola với điểm SOFA là $8,3 \pm 2,7$ [3]. Sự khác biệt này có thể do đối tượng nghiên cứu của Suberviola là BN NKH nhập Khoa ICU nên mức độ bệnh nặng hơn.

Ồ nhiễm khuẩn tiên phát: 82,4% BN xác định được ổ nhiễm khuẩn tiên phát. Trong đó, đường hô hấp cao nhất (25,7%), tiếp theo từ đường tiêu hóa (21,9%), thần kinh trung ương (17,1%), tiết niệu (14,3%), da-mô mềm (13,3%) và không rõ ổ nhiễm khuẩn (7,6%).

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.

Tỷ lệ NKH do nấm cũng tăng lên trong vài thập kỷ qua nhưng vẫn còn thấp hơn NKH do vi khuẩn. Ở Việt Nam cũng có nhiều nghiên cứu về việc xác định các tác nhân gây bệnh NKH. Bằng phương pháp cấy máu, chúng tôi đã xác định được 74 tác nhân gây bệnh trong số 105 BN NKH (70,5%). Trong đó, *E. coli* (14,3%), *K. pneumoniae* (10,5%), *S. aureus* (12,4%) là các căn nguyên vi khuẩn hay gặp nhất. 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 *K. pneumoniae* (17,5%), *E. coli* (17,3%), *S. aureus* (14,9%) [4]. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như kết quả của tác giả Uslan và cộng sự, *E. coli* và *S. aureus* là 2 căn nguyên phổ biến gây bệnh NKH ở Bang Minnesota, Hoa Kỳ [5]. Nghiên cứu chúng tôi cũng chỉ ra rằng tác nhân gây bệnh NKH không chỉ đơn thuần là vi khuẩn mà còn có nấm ($n = 1$, *Candida* sp.).

Hiện tại, cấy máu được coi là tiêu chuẩn vàng chẩn đoán tác nhân gây NKH. Tuy nhiên, điểm yếu của phương pháp này là độ nhạy thấp, thời gian trả kết quả kéo dài (ít nhất 24 - 72 giờ), đặc biệt kết quả bị ảnh hưởng bởi việc sử dụng kháng sinh trước khi cấy máu. Do đó, chúng ta cần một phương pháp chẩn đoán có thể hỗ trợ và khắc phục được những hạn chế của phương pháp cấy máu. PCR là một trong phương pháp như vậy. Trong số 76 BN NKH được tiến hành đồng thời 2 phương pháp chẩn đoán thì real-time PCR phát hiện được 50 tác nhân vi khuẩn gây bệnh và *E. coli* (19,7%), *K. pneumoniae* (13,2%) là 2 căn nguyên hay gặp nhất. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như nghiên cứu của Tsalik [6].

Với phương pháp real-time PCR, chúng tôi có thể xác định được căn nguyên vi sinh ở 65,8% trường hợp BN NKH, nhiều hơn so với phương pháp cấy máu chỉ có 53,9%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Trong nhiều nghiên cứu trước đó đều cho thấy tỷ lệ dương tính của real-time PCR cao hơn so với cấy máu. Kết quả tương tự như trong nghiên cứu của Suberviola tỷ lệ dương tính của SeptiFast là 46,6% so với cấy máu là 28,7% [3]. Sở dĩ, tỷ lệ phát hiện căn nguyên vi khuẩn của real-time PCR cao hơn phương pháp cấy máu do một số nguyên nhân sau. Thứ nhất, việc sử dụng kháng sinh trước khi cấy máu ảnh hưởng tới độ nhạy của phương pháp cấy máu [7], ngược lại không làm ảnh hưởng đến các phương pháp chẩn đoán mầm bệnh dựa trên kỹ thuật PCR [8]. Thứ hai, tỷ lệ cấy máu dương tính tăng dần theo mức độ nặng của BN NKH [9]. Do đó, độ nhạy của cấy máu thấp hơn real-time PCR máu.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra rằng, khi kết hợp 2 phương pháp chẩn đoán trên cho tỷ lệ phát hiện tác nhân lên tới 84,2% và tỷ lệ tương đồng dương tính giữa 2 phương pháp là 81,5%. Đây là chỉ dấu cho thấy rằng, trong tương lai chúng ta có thể phát triển các kit chẩn đoán tác nhân NKH dựa trên phương pháp PCR nhằm nâng cao hiệu quả chẩn đoán cũng như điều trị trong thực hành lâm sàng.

5. Kết luận

Qua kết quả nghiên cứu trên 105 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 và Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Bằng phương pháp cấy máu, chúng tôi đã xác định được 74 tác nhân gây bệnh trong số 105 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết. *E. coli* (14,3%), *K. pneumoniae* (10,5%), *S. aureus* (12,4%) là các căn nguyên vi khuẩn hay gặp nhất.

Trong số 76 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết được tiến hành đồng thời 2 phương pháp thì real-time PCR phát hiện được 50 tác nhân vi

khẩn gây bệnh và *E. coli* (19,7%), *K. pneumoniae* (13,2%) là 2 căn nguyên hay gặp nhất.

Tỷ lệ dương tính của real-time PCR cao hơn cấy máu (65,8% so với 53,9%) với $p < 0,05$. Tỷ lệ dương tính khi kết hợp hai phương pháp là 84,2% (64/76). Tỷ lệ tương đồng dương tính giữa 2 phương pháp là 81,5% (22/27).

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.06-2017.21.

Tài liệu tham khảo

1. CDC Data & Report, <https://www.cdc.gov/sepsis/datareports/index.html>.
2. Sterling SA, Miller WR, Pryor J et al (2015) *The impact of timing of antibiotics on outcomes in severe sepsis and septic shock: A systematic review and meta-analysis*. Critical care medicine 43(9): 1907-1915.
3. Suberviola B, Márquez-López A, Castellanos-Ortega A et al (2016) *Microbiological diagnosis of sepsis: Polymerase chain reaction system versus blood cultures*. American Journal of Critical Care 25(1): 68-75.
4. V. Q. Dat, H. N. Vu, H. Nguyen The et al (2017) *Bacterial bloodstream infections in a tertiary infectious diseases hospital in Northern Vietnam: Aetiology, drug resistance, and treatment outcome*. BMC infectious diseases 17(1): 493-493.
5. Uslan DZ, Crane SJ, Steckelberg JM et al (2007) *Age and sex-associated trends in bloodstream infection: A population-based study in olmsted county, minnesota*. JAMA Internal Medicine 167(8): 834-839.
6. Tsalik EL, Jones D, Nicholson B et al (2010) *Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the Emergency Department with sepsis*. Journal of Clinical Microbiology 48(1): 26-33.

7. Scheer CS, Fuchs C, Gründling M et al (2019) *Impact of antibiotic administration on blood culture positivity at the beginning of sepsis: A prospective clinical cohort study.* Clinical Microbiology and Infection 25(3): 326-331.
8. IŞÇimen R, Girgin NK and Kahveci F (2016) *Comparison of blood culture and multiplex real-time PCR for the diagnosis of nosocomial sepsis.* Current Contents, SciSearch, PubMed/MEDLINE, EMBASE, Scopus 350(3): 301-309.
9. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M et al (1995) *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): A prospective Study.* JAMA 273(2): 117-123.