

Giá trị của phương pháp real-time PCR trong xác định vi khuẩn kỵ khí ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

The value of real-time PCR in detecting anaerobes in blood of patients with sepsis

Nguyễn Sỹ Thấu*, Ngô Tất Trung**,
Vương Phúc Đường**, Lê Hữu Song**

**Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
*Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá giá trị của phương pháp real-time PCR (RT-PCR) trong xác định vi khuẩn kỵ khí ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết. **Đối tượng và phương pháp:** 92 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết được đưa vào nghiên cứu. Mỗi bệnh nhân đều được xác định mầm bệnh đồng thời bằng cấy máu và RT-PCR. Cấy máu được thực hiện tại Khoa Vi sinh vật và RT-PCR được thực hiện tại Khoa Sinh học Phân tử, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. **Kết quả:** Tỷ lệ dương tính của cấy máu, RT-PCR và kết hợp hai phương pháp lần lượt là 34,78%; 51,09% và 56,52%. Trong số 60 ca bệnh có cấy máu âm tính thì 20 ca bệnh được phát hiện mầm bệnh bằng RT-PCR, ngược lại có 5 ca cấy máu dương tính nhưng RT-PCR lại âm tính. RT-PCR có ưu thế hơn cấy máu vì có những mầm bệnh chỉ được xác định bằng RT-PCR: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus sp*, và đặc biệt là vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối *Bacteroides sp*. **Kết luận:** RT-PCR là một phương pháp có giá trị hỗ trợ tốt trong xác định căn nguyên vi khuẩn kỵ khí ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.

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

Summary

Objective: To evaluate the benefits of real-time PCR (RT-PCR) method to detect anaerobes in blood of patients with sepsis. **Subject and method:** 92 sepsis patients were enrolled on this study. Pathogen identification in each patient was performed by using both blood culture and RT-PCR concomitantly. **Result:** The rate of positive of culture, RT-PCR, combine culture and RT-PCR is 34.78%, 51.09%, 56.52% respectively. In total of 60 cases negative with blood culture there are 20 cases were positive with RT-PCR. In contrast, 5 cases were positive by blood culture but negative by RT-PCR. RT-PCR has been shown more advantage than blood culture since it can detect some bacteria *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus sp*, especially obligate anaerobes like *Bacteroides sp* which were not detected by blood culture at the same patients. **Conclusion:** It has been shown that RT-PCR is one of potential support assay for detecting anaerobes in blood of patients with sepsis.

Keywords: Sepsis, real-time PCR.

1. Đặt vấn đề

Nhiễm khuẩn huyết (NKH) đã, đang và ngày càng có xu hướng là một trong những nguyên nhân hàng đầu dẫn đến tử vong, đặc biệt là trên các bệnh nhân (BN) cao tuổi, nhiều bệnh lý kết hợp. Một trong những khó khăn hiện nay trong điều trị NKH là hạn chế của khả năng phát hiện mầm bệnh để có phác đồ kháng sinh điều trị phù hợp. Cho đến nay, cấy máu vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán căn nguyên gây NKH. Tuy nhiên, phương pháp cấy máu có nhiều hạn chế như: (i) Độ nhạy thấp (10 - 20%), đặc biệt là đối với những mầm bệnh khó nuôi cấy, trong đó có vi khuẩn kỵ khí; (ii) Thời gian chờ kết quả của phương pháp cấy máu kéo dài (thường trên 72 tiếng) nên kết quả cấy máu dương tính cũng hỗ trợ không nhiều cho bác sĩ lâm sàng. Trong khi đó, nếu trì hoãn điều trị kháng sinh phù hợp cứ mỗi giờ sau 6 giờ đầu kể từ khi xuất hiện tụt huyết áp ở bệnh nhân sốc nhiễm khuẩn sẽ làm tăng tỷ lệ tử vong lên 7,6% [1]. Vi khuẩn kỵ khí là nhóm căn nguyên gây NKH quan trọng, được chia thành hai nhóm, gồm: Vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối (*Bacteroides sp*, *Fusobacterium sp*...) và vi khuẩn kỵ khí tùy ngộ (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. suis*, *Enterococcus sp*, *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*...) [2]. Nếu chỉ thực hiện cấy máu ái khí sẽ có thể bỏ qua những vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối cũng như một tỷ lệ nhất định vi khuẩn kỵ khí tùy ngộ [3]. Mặc dù trong các khuyến cáo đều chỉ ra cần đồng thời cấy máu ái khí và kỵ khí [4], nhưng nhiều nơi tại Việt Nam vẫn chưa thực hiện cấy máu kỵ khí thường quy dẫn đến bỏ sót chẩn đoán. Real-time PCR (RT-PCR) là một phương pháp phát hiện mầm bệnh không cần nuôi cấy, bản chất là phát hiện DNA của vi khuẩn có mặt

trong máu của bệnh nhân. Ưu điểm của phương pháp RT-PCR ngoài khả năng chẩn đoán nhanh còn có thể phát hiện được vi khuẩn trong máu bất kể vi khuẩn đó ở trạng thái ái khí hay kỵ khí. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Đánh giá giá trị của phương pháp RT-PCR trong xác định vi khuẩn kỵ khí ở bệnh nhân NKH.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

BN được chẩn đoán NKH theo tiêu chuẩn Sepsis-3 [5]: BN có điểm SOFA tăng từ 2 điểm trở lên (được gây ra do nhiễm khuẩn) so với thời điểm trước nhiễm khuẩn được chẩn đoán là NKH. Tình trạng nhiễm khuẩn được xác định khi BN có: Sốt (thân nhiệt > 37°C) hoặc tụt thân nhiệt (thân nhiệt < 36°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 12/2015 đến tháng 1/2017 và tiến cứu từ tháng 2/2017 đến 10/2017. BN NKH được thực hiện đồng thời cấy máu và RT-PCR máu tìm vi khuẩn. 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 RT-PCR (2ml) được xử lý bằng dung dịch MCLB-1 để loại bỏ DNA người và làm giàu nồng độ DNA vi khuẩn. Sản phẩm DNA sau đó được dùng để chạy phản ứng RT-PCR với mỗi đặc hiệu cho 14 vi khuẩn: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. suis*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Enterococcus sp*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Samonella sp*, *B. pseudomallei*, *P. aeruginosa*, *A. baumani*, *Bacteroides sp*, *Fusobacterium sp*. So với phương pháp RT-PCR của chúng tôi được công bố trước đây, phổ vi khuẩn đã được điều chỉnh để phù

□Ngày nhận bài: 29/12/2017, ngày chấp nhận đăng: 02/01/2018

Người phản hồi: Lê Hữu Song,

Email: lehuusong@108-icid.com - Bệnh viện TWQĐ 108

hợp hơn với tình trạng phân bố mầm bệnh tại Việt Nam (thay *N. meningitidis*, *S. epidermidis*, *Proteus mirabilis* bằng *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *B. pseudomallei*, và thêm 2 vi khuẩn kỵ khí

tuyệt đối *Bacteroides sp* và *Fusobacterium sp*) [6].

Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0, thực hiện các phương pháp tính tỷ lệ %, tính trung vị, so sánh 2 giá trị trung bình, so sánh 2 tỷ lệ, tính tỷ suất chênh.

3. Kết quả

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

Chỉ số	Tổng số BN	n	Tỷ lệ %
Tuổi, median (range) (năm)	92	65 (55 - 76)	
Giới tính (nam/nữ)	92	69	75
<i>Ổ nhiễm trùng tiên phát</i>			
Phổi	92	26	28,3
Ổ bụng	92	20	21,9

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

Chỉ số	Tổng số BN	n	Tỷ lệ %
Tiết niệu	92	10	10,9
Thần kinh trung ương	92	12	13,1
Da, cơ	92	8	8,8
<i>SOFA, median (range) (điểm): 6 (4 - 8,5)</i>			
Hô hấp	74	59	79,7
Rối loạn ý thức	83	44	53
Tuần hoàn	92	53	57,6
Gan	74	42	56,8
Rối loạn đông máu	77	43	55,8
Suy thận	89	50	56,2
<i>Bệnh lý nền</i>			
Đái tháo đường	92	22	23,91
Ung thư	92	10	10,87
Xơ gan	92	8	8,7
Có bệnh lý nền	92	43	53,17

Chú thích: 3 BN không đánh giá điểm suy thận do có suy thận mạn tính, 9 BN không được chấm điểm Glasgow do dùng thuốc an thần hoặc chấn thương sọ não, 15 BN không đánh giá điểm với tiểu cầu do bị xơ gan hoặc sốt xuất huyết Dengue, 18 BN không đánh giá điểm bilirubin (suy gan) do có xơ gan, tắc mật, 18 BN không tính được PaO₂/FiO₂ do không được làm khí máu.

Nhận xét: 92 BN nghiên cứu có tuổi trung bình 65 (55 - 76) năm. BN nam chiếm ưu thế với 75%. Ổ nhiễm khuẩn tiên phát hay gặp nhất là viêm phổi (28,3%), theo sau là nhiễm trùng ổ bụng (21,9%), nhiễm trùng tiết niệu (10,09%). Điểm SOFA trung bình của nhóm nghiên cứu là 6 (4 - 8,5), trong đó hay gặp nhất là suy hô hấp (79,7%), ít gặp nhất là suy chức năng thần kinh trung ương (53%). Đái tháo đường (23,91%) là bệnh lý nền hay gặp nhất, tiếp đến là ung thư (10,87%) và xơ gan (8,7%).

Bảng 2. Mối liên quan giữa kết quả RT-PCR với bạch cầu, neutrophil và PCT

Marker viêm	RT-PCR (-)	RT-PCR (+)	p
Thay đổi số lượng bạch cầu, n (%)	29 (67,4)	42 (89,4)	0,011
Neutrophil (%)	84,45 (76,7 - 89,82)	91 (85,5 - 92,8)	0,001
PCT (ng/ml)	8,62 (2,08 - 25,78)	50,47 (22,48 - 100)	<0,001

Nhận xét: So với nhóm có kết quả RT-PCR âm tính, nhóm có kết quả RT-PCR dương tính có giá trị neutrophil, PCT và tỷ lệ thay đổi bạch cầu máu ngoại vi cao hơn có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3. Kết quả của phương pháp cấy máu và RT-PCR

Phương pháp	Cấy máu (-) (n)	Cấy máu (+) (n)	Tổng (n)
RT-PCR máu (-)	40	5	45
RT-PCR máu (+)	20	27	47
Tổng	60	32	92

Nhận xét: Tỷ lệ dương tính của RT-PCR cao hơn cấy máu {47/92 (51,09%) so với 32/92 (34,78%), $p < 0,001$ }. Kết hợp hai phương pháp cấy máu và RT-PCR cho tỷ lệ dương tính là 52/92 BN (56,52%). Trong số 60 bệnh nhân cấy máu âm tính có 20 bệnh nhân được xác định mầm bệnh bằng RT-PCR, ngược lại có 5 bệnh nhân có RT-PCR âm tính nhưng lại có cấy máu dương tính.

Bảng 4. Kết quả xác định vi khuẩn kỵ khí của phương pháp cấy máu và RT-PCR máu

Vi khuẩn được xác định	Cấy máu (n)	RT-PCR (n)	Đồng thời cấy máu và RT-PCR (n)	Tổng (n)
Vi khuẩn kỵ khí tùy ngộ				
<i>S. aureus</i>	0	1	0	1
<i>S. pneumoniae</i>	0	5	0	5
<i>S. suis</i>	0	2	3	5
<i>S. sanguis</i>	1	0	0	1
<i>S. mitis</i>	1	0	0	1
<i>Enterococcus sp</i>	0	1	0	1
<i>E. coli</i>	3	10	15	28
<i>K. pneumoniae</i>	4	6	5	15

Vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối				
<i>Bacteroides sp</i>	0	1	0	1
Tổng	9	26	23	58

Nhận xét: Sự tương đồng dương tính giữa phương pháp cấy máu và RT-PCR là 85,19% (23/27 BN). Phương pháp RT-PCR có khả năng chẩn đoán tốt hơn cấy máu đối với hầu hết các mầm bệnh xác định được trong nghiên cứu. Trong đó, có những mầm bệnh chỉ được xác định bằng RT-PCR như *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus sp* và đặc biệt là *Bacteroides sp*.

Bảng 5. Mối liên quan giữa kết quả điều trị và RT-PCR trong toàn bộ nhóm nghiên cứu và trong nhóm BN cấy máu âm tính

Kết quả điều trị	Chung		Cấy máu (-)	
	RT-PCR (-) (n = 45)	RT-PCR (+) (n = 47)	RT-PCR (-) (n = 40)	RT-PCR (+) (n = 20)
Tử vong, n (%)	24 (53,33)	17 (36,17)	22 (55%)	8 (40%)
OR (95%CI)	1,91 (0,79 - 4,63)		1,83 (0,62 - 5,46)	

Nhận xét: Trong toàn bộ BN nghiên cứu tỷ lệ tử vong giảm 91% ở nhóm RT-PCR (+) so với nhóm RT-PCR (-). Nếu không tính đến vai trò của cấy máu (xét trong nhóm 60 BN cấy máu âm tính), tỷ lệ tử vong giảm 83% ở nhóm RT-PCR (+) so với nhóm RT-PCR (-).

4. Bàn luận

Cho đến hiện nay trên thế giới chỉ có một bộ sinh phẩm xác định mầm bệnh gây NKH bằng nguyên lý phát hiện DNA là SeptiFast của hãng Roche được lưu hành trên thị trường với chứng chỉ IVD và được FDA cho phép sử dụng trong thực hành lâm sàng. Tuy nhiên, giá thành cao, kỹ thuật phức tạp, đòi hỏi trang thiết bị chuyên dụng và hiệu quả lâm sàng còn nhiều tranh luận. Do đó, tại nước ta chỉ có Bệnh viện Nhi Trung ương là cơ sở duy nhất sử dụng, nhưng cũng không thường xuyên. Trong khi đó, theo thông báo của Roche thì năm 2018 sẽ dừng lưu hành SeptiFast trên toàn thế giới. Do đó, việc tìm kiếm một phương pháp phát hiện mầm bệnh gây NKH ở nước ta để hỗ trợ cho cấy máu là nhu cầu thiết yếu. Nghiên cứu này của chúng tôi thực hiện nhằm đánh giá giá trị của RT-PCR trong phát hiện mầm bệnh là vi khuẩn kỵ

khí gây NKH sau khi có cải tiến một số kỹ thuật so với nghiên cứu trước đây [7]. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ dương tính của cấy máu, RT-PCR và kết hợp hai phương pháp lần lượt là 34,78%; 51,09% và 56,52%. Tổng số có 27/92 (29,3%) trường hợp dương tính ở cả 2 phương pháp. So sánh kết quả cấy máu và RT-PCR có sự tương đồng dương tính tương đối cao (85,19%). Trong số 60 ca bệnh có cấy máu âm tính thì 20 (33,33%) ca bệnh được phát hiện mầm bệnh bằng RT-PCR, ngược lại có 5 ca cấy máu dương tính trong số 45 ca RT-PCR âm tính (11,1%).

So với nghiên cứu trước đây tỷ lệ dương tính bằng cấy máu, SeptiFast và RT-PCR lần lượt là 32%, 28% và 28% thì kết quả của nghiên cứu này cao hơn rõ rệt. Một trong những nguyên nhân chủ yếu là do chúng tôi đã lựa chọn bệnh nhân dựa vào tiêu chuẩn Sepsis-3 với các triệu chứng điển hình của NKH. Trong một nghiên cứu

khác Florian Korber và cộng sự cho thấy tỷ lệ cùng dương tính của cả 2 phương pháp là SeptiFast và cấy máu chỉ có 10,4% [8] trong khi nghiên cứu này của chúng tôi tỷ lệ cùng dương tính của RT-PCR và cấy máu là 29,3%. Cấy máu vẫn được cho là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán NKH, nhưng thực tế có hơn 60 - 80% các trường hợp cấy máu âm tính. Vậy, có bao nhiêu % bệnh nhân cấy máu âm tính giả? Cho đến nay chưa có nghiên cứu nào trả lời câu hỏi đó. Trong nghiên cứu của chúng tôi có 20 (33,33%) trong số 60 BN cấy máu âm tính nhưng có RT-PCR (+). Kết quả RT-PCR được kiểm soát trong quá trình từ khi mẫu máu đưa về phòng thí nghiệm đến khi cho kết quả cuối cùng, tất cả các bước đều được tiến hành song song với nhóm chứng âm và nội chuẩn. Kết quả này gợi ý rằng bên cạnh cấy máu chúng ta cần áp dụng phương pháp khác ví dụ RT-PCR để tăng khả năng phát hiện mầm bệnh. Kết quả của chúng tôi một lần nữa khẳng định giá trị của PCR trong xác định mầm bệnh gây NKH như các nghiên cứu trước đây [9], [10]. Một lý do được chấp nhận rộng rãi đó là kháng sinh dùng trước khi cấy máu làm giảm khả năng mọc của vi khuẩn, trong khi yếu tố này không ảnh hưởng đến RT-PCR. Mặt khác, RT-PCR cũng tỏ rõ ưu thế so với cấy máu trong chẩn đoán các căn nguyên khó nuôi cấy trong đó có vi khuẩn kỵ khí (Bảng 4). Tuy nhiên, vẫn có 5 BN có kết quả RT-PCR âm tính trong khi cấy máu dương tính. NKH ở người lớn đặc trưng bởi nồng độ vi khuẩn trong máu thấp, trong khi đó quá trình tách DNA vi khuẩn còn một số bước phụ thuộc vào kỹ thuật của người làm xét nghiệm có thể là nguyên nhân dẫn đến kết quả trên.

Các marker viêm (số lượng neutrophile, nồng độ PCT, tỷ lệ thay đổi bạch cầu) đều tăng có ý nghĩa thống kê ở nhóm RT-PCR

(+) so với nhóm RT-PCR (-) (Bảng 2) gợi ý có vai trò của vi khuẩn trong đáp ứng viêm của nhóm BN có RT-PCR (+). Mặc dù, cấy máu âm tính nhưng kết quả cấy dịch cơ thể khác dương tính với cùng vi khuẩn được xác định bằng RT-PCR máu ở 2/20 BN. Có 2/20 BN có kết quả RT-PCR dịch não tủy dương tính cùng mầm bệnh với RT-PCR máu. Trong 12 BN được điều trị khỏi, 100% BN được dùng kháng sinh phù hợp với mầm bệnh được xác định bởi RT-PCR. Ngược lại, trong 8 BN tử vong, có 3 BN có thể đã được dùng kháng sinh không phù hợp với mầm bệnh xác định được bằng RT-PCR (*S. aureus* - levofloxacin + ceftriaxon, *Enterococcus sp* - levofloxacin + meropenem, *E. coli* - vancomycin). Tỷ lệ tử vong thấp hơn ở nhóm RT-PCR (+) so với nhóm RT-PCR (-) được thấy trong toàn bộ nhóm nghiên cứu cũng như riêng trong nhóm cấy máu âm tính (Bảng 5) gợi ý vai trò của RT-PCR như một phương pháp độc lập hoặc hỗ trợ cho cấy máu để góp phần giảm tỷ lệ tử vong của BN NKH.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy RT-PCR là một phương pháp có giá trị trong xác định căn nguyên vi khuẩn nói chung và vi khuẩn kỵ khí nói riêng ở bệnh nhân NKH.

Tài liệu tham khảo

1. 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.
2. Rajesh B and Rattan LI (2008) *Essentials of medical microbiology*. Ed. 4, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, B-3 EMCA House, 23/23B Ansari Road, Daryaganj.

3. Franklin R Cockerill III and Wilson, Walter R (1997) *Analysis of 281,797 consecutive blood cultures performed over an eight-year period: Trends in microorganisms isolated and the value of anaerobic culture of blood*. Clinical Infectious Disease 24: 403-418.
4. Andrew R, MB BS, MD(Res) (Co-chair) et al (2016) *Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016*. Critical Care Medicine 45(3).
5. Mervyn S (2016) *The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)*. JAMA 315(8): 801-810.
6. Trung NT et al (2016) *Enrichment of bacterial DNA for the diagnosis of blood stream infections*. BMC Infect Dis 16: 235.
7. Trung NT et al (2017) *Clinical utility of an optimised multiplex real-time PCR assay for the identification of pathogens causing sepsis in Vietnamese patients*. Int J Infect Dis.
8. Korber F et al (2017) *SeptiFast versus blood culture in clinical routine - A report on 3 years experience*. Wien Klin Wochenschr 129(11-12): 427-434.
9. Lutz EL, Klaus-Peter H, and Martina S (2009) *Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis*. Intensive Care Medicine 36: 49-56.
10. Herne V et al (2013) *Diagnostic performance and therapeutic impact of LightCycler SeptiFast assay in patients with suspected sepsis*. European Journal of Microbiology and Immunology 3(1): 68-76.