

# GIÁ TRỊ CỦA REAL-TIME PCR ĐA MỒI TRONG XÁC ĐỊNH CĂN NGUYÊN NHIỄM TRÙNG ĐƯỜNG HÔ HẤP DƯỚI CỘNG ĐỒNG

Trần Thị Ngân, Lê Hoàn, Lê Minh Hằng, Đinh Thị Thanh Hồng  
Nguyễn Thị Như Quỳnh và Trần Minh Châu✉

<sup>1</sup>Đơn vị Vi sinh, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

<sup>2</sup>Khoa Nội tiết - Hô hấp, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Chẩn đoán căn nguyên gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới giúp định hướng cho điều trị và tránh lạm dụng kháng sinh. Real-time PCR đa mồi bằng bộ kit Allplex Respiratory panel assays có thể phát hiện được 26 tác nhân vi sinh hay gặp, giúp tăng khả năng phát hiện căn nguyên gây bệnh. Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 56 người bệnh nhiễm trùng đường hô hấp dưới được thực hiện kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn thông thường và real-time PCR đa mồi. Tỷ lệ phát hiện tác nhân của nuôi cấy vi khuẩn là 12,5%, của real-time PCR đa mồi là 44,6%, trong đó 28,6% trường hợp chỉ phát hiện vi khuẩn, 8,9% chỉ phát hiện virus, 3,6% đồng nhiễm virus - vi khuẩn và 3,6% trường hợp phát hiện vi khuẩn không điển hình.

**Từ khóa:** Real-time PCR đa mồi, nhiễm trùng đường hô hấp dưới.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng đường hô hấp dưới là nhóm bệnh có tỷ lệ mắc và tử vong cao. Theo tổ chức y tế thế giới (WHO) năm 2019, nhiễm trùng đường hô hấp dưới đứng thứ ba trong mười bệnh gây tử vong cao nhất ở người.<sup>1</sup> Nguyên nhân gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới có thể do các loại vi khuẩn, virus, vi nấm dẫn đến cách điều trị khác nhau, tuy nhiên, khó xác định được căn nguyên nếu chỉ dựa vào triệu chứng lâm sàng, X-quang hay hóa sinh. Trong khi đó, nuôi cấy thông thường có tỷ lệ phát hiện căn nguyên thấp và chỉ phân lập được một số vi khuẩn.<sup>2</sup> Vì chẩn đoán tác nhân vi sinh khó khăn dẫn đến điều trị kháng sinh không phù hợp. Những tiến bộ trong chẩn đoán vi sinh và nghiên cứu dịch tễ học cho thấy virus và vi khuẩn không điển hình ngày càng có vai

trò quan trọng gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới.<sup>3</sup> Trong đó, các phương pháp sinh học phân tử, đặc biệt là real-time PCR đa mồi có thể mang lại hiệu quả hứa hẹn. Trong nghiên cứu tại Thái Lan, Việt Nam và Indonesia, sử dụng PCR đa mồi để phát hiện virus và vi khuẩn không điển hình cho thấy 58,6% mẫu bệnh phẩm có virus, 3,2% mẫu có vi khuẩn không điển hình và 1,2% mẫu phát hiện cả hai loại tác nhân trên.<sup>4</sup> Allplex Respiratory panel assays là bộ kit thương mại sử dụng nguyên lý real-time PCR đa mồi giúp xác định 16 loại virus và 7 loại vi khuẩn gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới hay gặp.<sup>5</sup> Chúng tôi tiến hành nghiên cứu về vai trò của bộ kit này trong xác định căn nguyên gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới cộng đồng tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội với 2 mục tiêu:

1, Xác định tỷ lệ các căn nguyên gây bệnh bằng real-time PCR đa mồi;

2, So sánh kết quả với kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn thông thường.

Tác giả liên hệ: Trần Minh Châu

Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Email: tranminhchau@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 25/07/2022

Ngày được chấp nhận: 15/08/2022

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

#### **Tiêu chuẩn lựa chọn**

- Người bệnh được chẩn đoán xác định hoặc chẩn đoán sơ bộ nhiễm trùng đường hô hấp dưới trong cộng đồng (bao gồm viêm phổi cộng đồng, đợt cấp bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính do bội nhiễm, giãn phế quản bội nhiễm) được điều trị tại Khoa Nội tiết - Hô hấp hoặc đến khám tại Phòng khám Hô hấp, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

- Người bệnh đồng ý tham gia nghiên cứu.

#### **Tiêu chuẩn loại trừ**

- Người bệnh khởi phát triệu chứng nghi ngờ nhiễm trùng hô hấp dưới sau khi đã nằm viện từ 48h trở lên hoặc đã điều trị ở bệnh viện khác.

- Người bệnh nhiễm khuẩn hô hấp dưới do lao.

- Không lấy được bệnh phẩm.

#### **Thời gian nghiên cứu**

Từ tháng 11/2021 đến tháng 6/2022.

#### **Địa điểm nghiên cứu**

Đơn vị Vi sinh, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội và Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Hà Nội.

### 2. Phương pháp

#### **Thiết kế nghiên cứu**

Mô tả cắt ngang.

#### **Cỡ mẫu và chọn mẫu**

Tất cả người bệnh đáp ứng đầy đủ tiêu chuẩn lựa chọn và không có tiêu chuẩn loại trừ trong thời gian nghiên cứu được đưa vào nghiên cứu. Thực tế chọn được 56 người bệnh vào nghiên cứu.

#### **Quy trình thu thập và xử lý bệnh phẩm**

Chúng tôi thu thập cả bệnh phẩm đờm và dịch tỵ hầu của người bệnh được chẩn đoán hoặc nghi ngờ nhiễm trùng đường hô hấp dưới, hoặc chỉ dịch tỵ hầu nếu người bệnh không khạc được đờm. Bệnh phẩm được bảo quản thích

hợp: bảo quản mẫu đờm ở 2-8°C và dịch tỵ hầu ở -80°C. Sau đó, chúng tôi thực hiện nuôi cấy vi khuẩn và định danh bằng hệ thống tự động Vitek 2, đồng thời thực hiện phản ứng PCR:

- Tách chiết acid nucleic:

+ Tách chiết DNA với bệnh phẩm đờm hoặc dịch tỵ hầu bằng bộ kit QIAamp DNA mini Kit của QIAGEN, Đức.

+ Tách chiết RNA với bệnh phẩm dịch tỵ hầu bằng bộ kit QIAamp Viral RNA Mini Kit của QIAGEN, Đức.

- Thực hiện phản ứng real-time PCR đa mồi bằng bộ kit Allplex Respiratory panel assays (Seegene) với 4 panel, có khả năng phát hiện các tác nhân sau:

+ Panel RP1: Virus cúm A (gồm các subtype A-H1, A-H1pdm09 và A-H3), virus cúm B, virus hợp bào hô hấp type A, B.

+ Panel RP2: adenovirus, enterovirus, metapneumovirus, virus á cúm 1-4.

+ Panel RP3: bocavirus 1/2/3/4, coronavirus 229E, NL63, OC43, human rhinovirus.

+ Panel RP4: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomydia pneumoniae*.<sup>5</sup>

- Phiên giải kết quả bằng phần mềm Seegene viewer.

#### **Quy trình thu thập thông tin**

Thu thập các thông tin trong hồ sơ của người bệnh và ghi vào phiếu thu thập thông tin.

### 3. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập và làm sạch, sau đó được xử lý, sử dụng phần mềm Microsoft Excel.

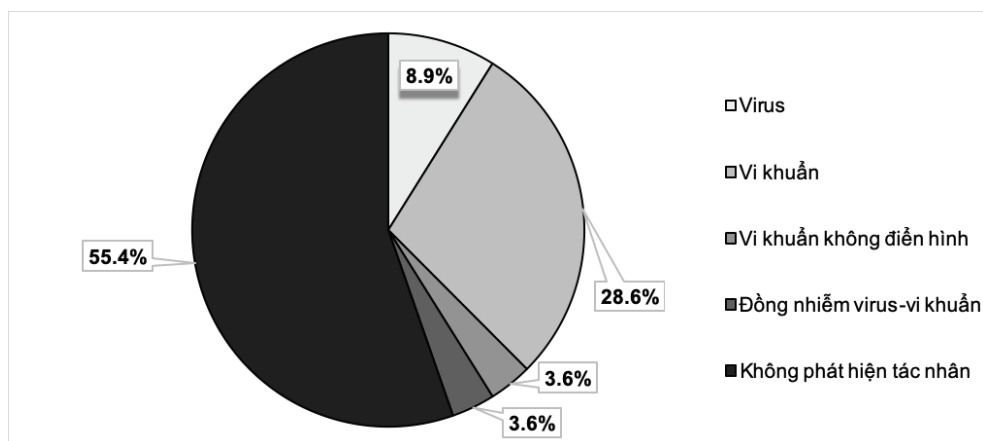
### 4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ đầy đủ các nguyên tắc của nghiên cứu y học. Toàn bộ thông tin của người bệnh đều được bảo mật.

## III. KẾT QUẢ

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

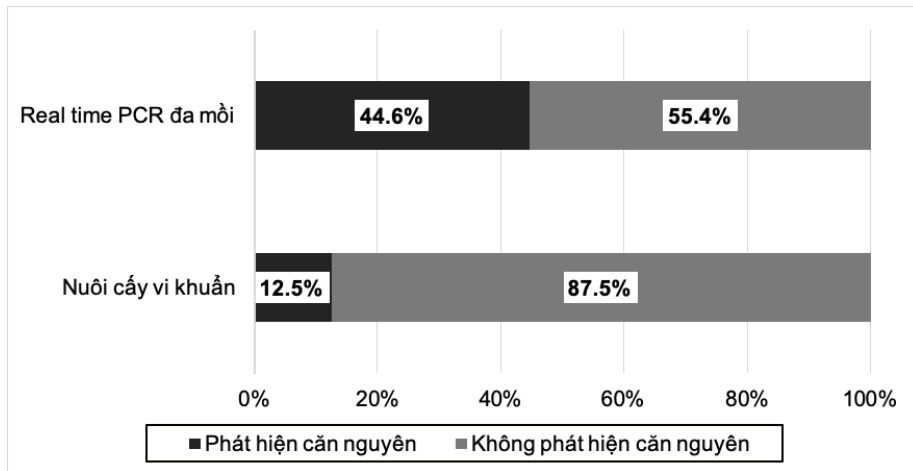
	Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ %
Tuổi	Tuổi trung bình	62,75	
	15 - 64 tuổi	27	48,2%
	Từ 65 tuổi trở lên	29	51,8%
Giới	Nam	37	66,1%
	Nữ	19	33,9%
Chẩn đoán	Viêm phổi cộng đồng	40	71,4%
	Đợt cấp bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính	14	25%
	Giãn phế quản bội nhiễm	2	3,6%
Nơi khám - điều trị	Khoa Nội tiết - Hô hấp	51	91,1%
	Phòng khám Hô hấp	5	8,9%



Biểu đồ 1. Tỷ lệ phát hiện tác nhân gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới cộng đồng bằng real-time PCR đa môi

Nghiên cứu của chúng tôi trên 56 người bệnh sử dụng real-time PCR đa môi bằng bộ kit Allplex Respiratory panel assays (Seegene) phát hiện được tác nhân gây nhiễm trùng ở 25 người bệnh, chiếm 44,6%. Trong đó, căn nguyên vi khuẩn thông thường bao gồm *S. pneumoniae* và *H. influenzae* chiếm tỉ lệ cao nhất, với 16 trường hợp. Ngoài ra, có 5 trường

hợp chỉ phát hiện virus, gồm human rhinovirus (n = 3), adenovirus (n = 1) và coronavirus 229E (n = 1), 2 trường hợp do vi khuẩn không điển hình, gồm *Legionella pneumophila* (n = 1) và *Mycoplasma pneumoniae* (n = 1), 1 trường hợp đồng nhiễm human bocavirus và *S. pneumoniae*, 1 trường hợp đồng nhiễm virus á cúm type 4 và *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.



**Biểu đồ 2. So sánh tỉ lệ phát hiện căn nguyên bằng nuôi cấy thông thường và real-time PCR đa môi**

Real-time PCR đa môi giúp tăng khả năng phát hiện căn nguyên gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới (n = 25; 44,6%) so với nuôi cấy vi khuẩn (n = 7; 12,5%).

**Bảng 2. Căn nguyên vi khuẩn thông thường phát hiện qua nuôi cấy thông thường và real-time PCR đa môi**

Vi khuẩn thông thường	Nuôi cấy vi khuẩn	Real-time PCR đa môi
<i>S. pneumoniae</i>	0	12
<i>H. influenzae</i>	1	9
<i>S. aureus</i>	2	0
<i>P. aeruginosa</i>	4	0

Các căn nguyên vi khuẩn thông thường được phát hiện hoặc phân lập được mô tả trong bảng 2. Nuôi cấy vi khuẩn phát hiện tác nhân gây bệnh trong 7 trường hợp, bao gồm *P. aeruginosa* (n = 4), *S. aureus* (n = 2) và *H. influenzae* (n=1), còn real-time PCR đa môi phát hiện được 12 trường hợp với *S. pneumoniae* và 9 trường hợp với *H. influenzae*. Như vậy mặc dù có thể nuôi cấy được *S. pneumoniae* và *H. influenzae* nhưng tỉ lệ nuôi cấy dương tính với 2 căn nguyên này là rất thấp.

#### IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu của chúng tôi, đối với tỉ lệ phát hiện căn nguyên gây bệnh nói chung, khả

năng của PCR đa môi cao hơn nhiều so với nuôi cấy vi khuẩn, kết quả này tương tự với các nghiên cứu khác, ví dụ nghiên cứu tại Thổ Nhĩ Kỳ ở người lớn nhiễm trùng đường hô hấp dưới, PCR có tỉ lệ phát hiện căn nguyên cao hơn đáng kể so với nuôi cấy (63,5% so với 31,5%).<sup>6</sup>

Nhiễm trùng đường hô hấp dưới ở đối tượng người lớn khỏe mạnh có thể do tác nhân nuôi cấy được như *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriales*... Tuy nhiên vi khuẩn không điển hình như *Mycoplasma*, *C. pneumoniae* và *L. pneumophila* và một số virus cũng có thể gây bệnh ở đối tượng này.<sup>7</sup> Như vậy, xét riêng đối với căn nguyên vi khuẩn, nuôi cấy không

thể phát hiện các loại vi khuẩn không điển hình do chúng là các vi khuẩn nội bào hoặc cần môi trường đặc biệt để phát triển. Real-time PCR đa mỗi bằng bộ kit Allplex Respiratory panel assays chỉ phát hiện *S. pneumoniae* và *H. influenzae* trong các vi khuẩn thông thường, là hai tác nhân hay gặp nhất. Ở nghiên cứu này chúng tôi thấy real-time PCR đa mỗi phát hiện được 21 trường hợp với *S. pneumoniae* và *H. influenzae*, bao gồm cả những trường hợp đồng mắc với virus khác. Nuôi cấy vi khuẩn chỉ phát hiện tác nhân gây bệnh trong 7 trường hợp, trong đó không trường hợp nào dương tính với *S. pneumoniae* và 1 trường hợp với *H. influenzae*. Như vậy tỉ lệ nuôi cấy dương tính với hai căn nguyên này là rất thấp dù chúng có thể nuôi cấy được. So sánh với một số nghiên cứu khác như nghiên cứu tại Anh trên đối tượng người lớn nhập viện, sử dụng PCR đa mỗi với 26 tác nhân phát hiện được 78% các mẫu có tác nhân vi khuẩn so với tỉ lệ nuôi cấy dương tính 32%.<sup>8</sup> Nhược điểm của nuôi cấy là vi khuẩn gây bệnh phải còn sống từ khi lấy bệnh phẩm đến khi nuôi cấy và để trong môi trường thích hợp, do đó cần đảm bảo điều kiện lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản chặt chẽ, ngược lại, PCR đa mỗi đối với vi khuẩn chỉ cần phát hiện DNA của chúng, mà DNA tương đối bền vững trong điều kiện bảo quản thông thường. Chính vì thế mà trong nghiên cứu tại Thụy Điển, tỉ lệ phát hiện *S. pneumoniae* tăng từ 13% lên 35% và phát hiện *H. influenzae* tăng từ 20% lên 46% khi so sánh nuôi cấy và PCR đa mỗi.<sup>9</sup> Như vậy, các xét nghiệm khuếch đại acid nucleic giúp cải thiện đáng kể khả năng phát hiện vi khuẩn, đặc biệt ở những người bệnh đã sử dụng kháng sinh và những trường hợp chậm trễ trong vận chuyển bệnh phẩm đến phòng xét nghiệm.

Tuy nhiên, nuôi cấy vi khuẩn vẫn có vai trò nhất định vì vi khuẩn phân lập được từ nuôi cấy có thể tiếp tục sử dụng để làm xét nghiệm tính

nhạy cảm với kháng sinh, hay còn gọi là kháng sinh đồ, từ đó có được thông tin về mức độ nhạy cảm kháng sinh của quần thể vi khuẩn để điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm. Đó là giá trị quan trọng khó thay thế được của kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn. Ngoài ra, với một số vi sinh vật vừa có thể có ở đường hô hấp mà không gây bệnh, vừa có thể gây bệnh khi có số lượng lớn, ưu thế, khi đó, việc phiên giải kết quả bằng real-time PCR đa mỗi sẽ gặp khó khăn. Để kết luận tác nhân đó gây bệnh cần so sánh số lượng với các vi sinh vật khác trong vi hệ đường hô hấp thông qua nuôi cấy vi khuẩn.<sup>10</sup> Do đó, nuôi cấy vi khuẩn giúp ích trong việc phiên giải kết quả của kỹ thuật real-time PCR đa mỗi.

Đối với tác nhân virus và vi khuẩn không điển hình, nuôi cấy vi khuẩn thông thường không thể phát hiện được, do đó chúng ta sẽ bỏ sót các tác nhân này nếu chỉ dựa vào nuôi cấy. Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện được human rhinovirus, adenovirus, coronavirus 229E, virus á cúm, *Legionella pneumophila* và *Mycoplasma pneumoniae*, đó là các tác nhân không thể phát hiện được bằng kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn. Đối với hai nhóm tác nhân này, trong nghiên cứu tại Việt Nam, Thái Lan và Indonesia trên người bệnh nhập viện vì viêm phổi có triệu chứng giống cúm ở mọi lứa tuổi, phát hiện virus ở 58,6% các bệnh phẩm, vi khuẩn không điển hình chiếm 3,2%. Nhóm tác nhân này tuy phổ biến hơn ở trẻ em nhưng cũng giữ vai trò quan trọng đối với nhiễm trùng đường hô hấp dưới ở người lớn. Tại Bệnh viện Đa khoa Khánh Hòa, nghiên cứu tiến cứu trên người bệnh từ 15 tuổi trở lên sử dụng PCR dịch tỵ hầu thấy có 21% dương tính với các virus.<sup>11</sup> Nghiên cứu tiến cứu trên đối tượng người lớn nhiễm trùng đường hô hấp dưới tại Na Uy, sử dụng real-time PCR cho thấy tỉ lệ phát hiện căn nguyên là 63%, trong đó 28% nhiễm vi khuẩn đơn thuần, 15% nhiễm virus đơn thuần và 19% đồng nhiễm vi khuẩn – virus.<sup>12</sup>

## V. KẾT LUẬN

PCR đa mồi là kĩ thuật không phải mới, song vẫn chưa phổ biến ở một số bệnh viện ở Việt Nam. Vì còn một số tác nhân không phát hiện được cũng như không thể trả lời tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh, kĩ thuật này không thể thay thế hoàn toàn cho xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn, nhưng qua nghiên cứu thấy bộ kit real-time PCR đa mồi Allplex Respiratory panel assays giúp tăng khả năng phát hiện căn nguyên gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới so với nuôi cấy vi khuẩn, đặc biệt là virus và vi khuẩn nội bào, vi khuẩn khó nuôi cấy, qua đó có thể hạn chế việc lạm dụng kháng sinh hoặc lựa chọn kháng sinh phù hợp hơn. Như vậy, sử dụng real-time PCR đa mồi có thể mang lại hiệu quả hứa hẹn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO. The top 10 causes of death. WHO. Published 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Rider AC, Frazee BW. Community-Acquired Pneumonia. *Emerg Med Clin North Am.* 2018; 36(4): 665-683. doi:10.1016/j.emc.2018.07.001.
3. Evans SE, Jennerich AL, Azar MM, et al. Nucleic Acid-based Testing for Noninfluenza Viral Pathogens in Adults with Suspected Community-acquired Pneumonia. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021; 203(9): 1070-1087. doi:10.1164/rccm.202102-0498ST.
4. Wertheim HFL, Nadjm B, Thomas S, et al. Viral and atypical bacterial aetiologies of infection in hospitalised patients admitted with clinical suspicion of influenza in Thailand, Vietnam and Indonesia. *Influenza Other Respir Viruses.* 2015; 9(6): 315-322. doi:10.1111/irv.12326.
5. Seegene. *Allplex Respiratory Panel Assays*; 2016.
6. Aydemir Ö, Aydemir Y, Özdemir M. The role of multiplex PCR test in identification of bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Pakistan Journal of Medical Sciences.* 1969; 30(5). doi:10.12669/pjms.305.5098.
7. Ottosen J, Evans H. Pneumonia: challenges in the definition, diagnosis, and management of disease. *Surg Clin North Am.* 2014; 94(6): 1305-1317. doi:10.1016/j.suc.2014.09.001.
8. Gadsby NJ, Russell CD, McHugh MP, et al. Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2016;62(7):817-823. doi:10.1093/cid/civ1214.
9. Abdeldaim GM, Strålin K, Korsgaard J, Blomberg J, Welinder-Olsson C, Herrmann B. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis. *BMC Microbiology.* 2010; 10(1): 310. doi:10.1186/1471-2180-10-310.
10. Leber AL. Respiratory Tract Cultures. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* ASM Press; 2016:3.11.1.1-3.11.9.4. doi:10.1128/9781555818814.ch3.11.1.
11. Takahashi K, Suzuki M, Minh LN, et al. The incidence and aetiology of hospitalised community-acquired pneumonia among Vietnamese adults: a prospective surveillance in Central Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2013; 13: 296. doi: 10.1186/1471-2334-13-296.
12. Holter JC, Müller F, Bjørang O, et al. Etiology of community-acquired pneumonia and diagnostic yields of microbiological methods: a 3-year prospective study in Norway. *BMC Infect Dis.* 2015; 15: 64. doi:10.1186/s12879-015-0803-5

## Summary

# THE VALUE OF MULTIPLEX REAL-TIME PCR IN THE IDENTIFICATION OF PATHOGENS IN LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

The identification of pathogens in lower respiratory tract infections could guide treatment and avoid the overuse of antibiotics. Multiplex real-time PCR using the Allplex respiratory assays kit is able to detect 26 common microbial agents, increasing the ability to identify the pathogens. A cross-sectional study with 56 patients diagnosed with lower respiratory tract infections was performed with bacterial culture and multiplex real-time PCR. The rate of agent detection of bacterial culture was 12.5%, and this figure for multiplex real-time PCR was 44.6%, including 28.6% of cases were pure bacterial, 8.9% pure viral infections, 3.6% viral-bacterial co-infections, and 3.6% atypical bacteria.

**Keywords:** lower respiratory tract infections, multiplex real-time PCR.