

ĐÁNH GIÁ VAI TRÒ CỦA XÉT NGHIỆM VI SINH TRONG CHẨN ĐOÁN CÁC TÁC NHÂN GÂY NHIỄM KHUẨN HÔ HẤP DƯỚI

Võ Đức Chiến Trần Thị Kiều** Từ Ngân Trâm** Phạm Hùng Vân***

TÓM TẮT:

Qua con đường sinh bệnh của nhiễm khuẩn hô hấp dưới chúng ta sẽ thấy bệnh phẩm đầu tiên để có thể phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh chính là đàm hay các bệnh phẩm có đàm lấy được từ bệnh nhân. Tuy nhiên xét nghiệm đàm là một xét nghiệm có rất nhiều thách thức cần phải vượt qua vì đây là một bệnh phẩm có tạp nhiễm nên phải làm thế nào bắt được đúng vi khuẩn gây bệnh chứ không phải là vi khuẩn tạp nhiễm. Ngoài ra, các tác nhân vi khuẩn gây bệnh thường gặp nhất lại là các tác nhân rất khó mọc, đòi hỏi phải có đủ các môi trường phân lập và phải được cấy ngay. Một bệnh phẩm khác cũng rất cần thiết phải được cấy để phát hiện tác nhân vi khuẩn gây viêm phổi, đó là cấy máu. Tuy nhiên thách thức chính của cấy máu là tỷ lệ cấy máu (+) trong chẩn đoán viêm phổi thường thấp và có khi dương tính giả vì tạp nhiễm. Do vậy việc chọn thời điểm cấy máu đúng lúc cũng như phương tiện cấy máu thích hợp là rất cần thiết. Xét nghiệm huyết thanh và hóa miễn dịch phát hiện kháng thể hay kháng nguyên gây bệnh là giải pháp dành cho phát hiện các tác nhân gây bệnh không thể nuôi cấy thường qui như virus hay vi khuẩn không điển hình, tuy nhiên xét nghiệm tìm kháng nguyên thường không đủ nhạy còn xét nghiệm tìm kháng thể thường không hữu dụng vì đòi hỏi phải làm huyết thanh kép (IgG) hay độ nhạy cũng như độ đặc hiệu thường kém và đòi hỏi phải có giá trị cắt thùy thuộc vào vùng dịch tễ. Giải pháp mang tính đột phá và khả thi nhất hiện nay để có thể phát hiện được các tác nhân vi sinh gây viêm phổi là sử dụng kỹ thuật multiplex real-time PCR vì đây là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, dễ dàng thực hiện tại các phòng thí nghiệm lâm sàng vì chi phí đầu tư vừa phải và có thể thực hiện tự động hóa. Giải pháp này đã được đánh giá qua nhiều nghiên cứu được thực hiện tại BV. Nguyễn Tri Phương và BV. Nhi Đồng 1, và hiện nay là nghiên cứu REALS. Các kết quả ghi nhận được đã cho thấy có multiplex realtime PCR có khả năng phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh cao hơn nhiều lần so với phương pháp thường qui tại các phòng thí nghiệm. Mô hình để thực hiện giải pháp này được gọi là mô hình STREAMLINE REAL-TIME PCR với hai thiết bị cơ bản là: (1) thiết bị tách chiết DNA/RNA tự động sử dụng kit NKDNARNAPREP-MAGBEAD để tách chiết DNA/RNA bằng hạt từ bọc silica, và (2) thiết

bị real-time PCR sử dụng các bộ kit bao gồm NKARlbac real-time PCR phát hiện các tác nhân vi khuẩn cộng đồng, NKARltypicalbac real-time PCR phát hiện tác nhân vi khuẩn không điển hình, NKARlvirus real-time PCR phát hiện tác nhân virus, và NKHAPVAPbac real-time PCR phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện hay viêm phổi thở máy. Với mô hình này, kết quả có thể đến tay bác sĩ rất kịp thời để có thể sử dụng giải pháp kháng sinh trúng đích các tác nhân vi khuẩn gây bệnh rất kịp thời mà khỏi phải sử dụng kháng sinh bước đầu kinh nghiệm.

Từ khóa: Tác nhân vi sinh viêm phổi và nhiễm trùng cấp hô hấp dưới

ABSTRACT:

EVALUATION OF ROLE OF THE CLINICAL MICROBIOLOGY TESTS IN THE DETECTION OF PATHOGENS CAUSING LOWER RESPIRATORY INFECTIONS.

Based on the pathogenesis of the lower respiratory tract infections, the first specimen should be obtained from patients to detect the causative microbial agent is the sputum specimens. However, sputum is the contaminated specimen so that the big challenge must be overcome is to confirm the isolated bacteria is the pathogen, not the contaminated one. In addition, the most common pathogens of the lower respiratory tract infection are the fastidious bacteria requiring the immediate isolating on multiple media. Another specimen should be collected to detect bacterial pathogens causing pneumonia is the blood culture. The main challenge in the blood culture is the ratio of blood culture blood culture (+) in the diagnosis of pneumonia is often low and sometimes false positives because of contamination. So that blood cultures must be done at the right time on the appropriate blood cultures media. Serological and immunochemical test to detect the specific antibodies and antigens of the causative pathogens are the main solution for the detection of the pathogens that cannot be cultured routinely in most of the clinical laboratory like viruses and atypical bacteria, but these kinds of tests are often not sensitive and specificity enough (antigen and IgM detection) as well as not clinical relevant (IgG detection). Innovative and the most feasible solutions at present that can be able to detect microbial agents causing LRI are using the multiplex real-time PCR technique thank to its high sensitive and specificity, easily performed in the clinical laboratories due to the moderate investment costs and

*BV Nguyễn Tri Phương. email: myhanhchien@gmail.com

**Công ty Nam Khoa, phhvan.nkbiotek@gmail.com

can implement automation. This solution has been evaluated by several studies were conducted in Nguyen Tri Phuong and Children's Hospital 1, and now in REALS project. The received results have shown that multiplex real-time PCR capable of detecting pathogenic microbial agents with the sensitivity several times higher than the routine method. Model to implement this solution is called STREAMLINE REAL-TIME PCR with two basic devices: (1) The automatic DNA/RNA extraction machine using NKDNARNAPREP-MAGBEAD, and (2) the real-time PCR machine using kits including NKARibac real-time PCR for detection of community bacteria, NKARlatypicalbac real-time PCR for detection of atypical bacteria, NKARlvirus real-time PCR for detection of viral pathogen, NKHAPVAPbac real-time PCR for detection of nosocomial bacteria causing HAP and VAP bacterial pathogens. With this solution, the results of detection microbiological pathogens causing lower respiratory infection can arrive to the physicians timely, avoid the using of the empirical antibiotic treatment for longtime since the targeted antibiotic treatment can be done to the patients sort time after the clinical diagnosis.

Key words: Micro-organism pathogens causing pneumonia and lower respiratory tract infection

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của Bộ Y Tế năm 2008 thì viêm phổi là một trong những tác nhân gây tử vong hàng đầu với tỷ lệ 2.34 trên 100.000 dân. Một trong các nguyên nhân làm cho viêm phổi có tỷ lệ tử vong cao là do bác sĩ điều trị không thể cho được kháng sinh điều trị trúng đích vì kết quả xét nghiệm vi sinh thường không xác định được tác nhân vi sinh gây bệnh. Chính vì vậy việc áp dụng kỹ thuật real-time PCR, một kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao để phát hiện được các tác nhân vi sinh gây bệnh viêm phổi cũng như nhiễm trùng hô hấp dưới là một tiếp cận chẩn đoán rất cần thiết để giải quyết được các thách thức trong xác định tác nhân vi sinh gây bệnh mà các phương pháp vi sinh truyền thống không thể vượt qua được.

CÁC THÁCH THỨC TRONG XÉT NGHIỆM VI SINH THƯỜNG QUI VÀ MIỄN DỊCH

Xét nghiệm vi sinh thường qui:

Qua con đường sinh bệnh của nhiễm khuẩn hô hấp dưới chúng ta sẽ thấy bệnh phẩm đầu tiên để có thể phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh chính là đàm hay các bệnh phẩm có đàm lấy được từ bệnh nhân. Tuy nhiên xét nghiệm đàm là một xét nghiệm có rất nhiều thách thức cần phải vượt qua vì đây là một bệnh phẩm vốn dĩ bị tạp nhiễm

vì phải qua đường hầu họng nên yêu cầu chính yếu của xét nghiệm vi sinh là phải nuôi cấy để có thể bắt được đúng vi khuẩn gây bệnh chứ không phải là vi khuẩn tạp nhiễm. Ngoài ra, các tác nhân vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp dưới thường gặp nhất lại là các tác nhân vi khuẩn rất khó mọc đòi hỏi phải có đủ các môi trường phân lập và phải được cấy ngay mà các yêu cầu cơ bản này thường ít được đáp ứng tại các phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện. Một bệnh phẩm khác cũng rất cần thiết phải được cấy để phát hiện tác nhân vi khuẩn gây viêm phổi, đó là cấy máu. Tuy nhiên thách thức chính của cấy máu là tỷ lệ cấy máu (+) trong chẩn đoán viêm phổi thường thấp dưới 14% do không phải tác nhân vi khuẩn gây bệnh nào cũng có khả năng xâm lấn vào máu, ngoài ra kết quả cấy máu cũng có nhiều khi bị (+) giả do bị tạp nhiễm vì các lỗi kỹ thuật trong quá trình cấy máu tại giường cũng như quá trình theo dõi cấy máu tại phòng thí nghiệm. Do vậy việc chọn thời điểm cấy máu đúng lúc cũng như phương tiện cấy máu thích hợp là rất cần thiết. Không chỉ vậy phòng thí nghiệm phải có qui trình để kết quả cấy máu đến tay lâm sàng kịp thời để xét nghiệm cấy máu thật sự có hữu dụng cho lâm sàng.

Xét nghiệm huyết thanh:

Xét nghiệm huyết thanh phát hiện kháng thể đặc hiệu tác nhân vi sinh gây bệnh là giải pháp mà một số phòng thí nghiệm hiện nay đang sử dụng để phát hiện các tác nhân không thể nuôi cấy thường qui như virus hay vi khuẩn không điển hình, tuy nhiên xét nghiệm tìm kháng thể đặc hiệu thuộc lớp IgG thường không hữu dụng vì đòi hỏi phải làm huyết thanh kép, còn xét nghiệm tìm kháng thể đặc hiệu thuộc lớp IgM lại có có vấn đề về độ nhạy cũng như độ đặc hiệu và đòi hỏi phải có giá trị cắt thù thuộc vào vùng dịch tễ.

Xét nghiệm hóa miễn dịch:

Xét nghiệm hóa miễn dịch phát hiện kháng nguyên hòa tan các vi khuẩn *S. pneumoniae* và *Legionella* trong nước tiểu cũng là giải pháp dành cho phát hiện hai tác nhân này. Tuy nhiên do giá thành cao và độ nhạy của xét nghiệm này thường không cao nên cũng ít được sử dụng. Đối với các tác nhân virus hay vi khuẩn không điển hình, kỹ thuật ELISA hay nhuộm kháng thể huỳnh quang trực tiếp cũng được sử dụng, tuy nhiên các xét

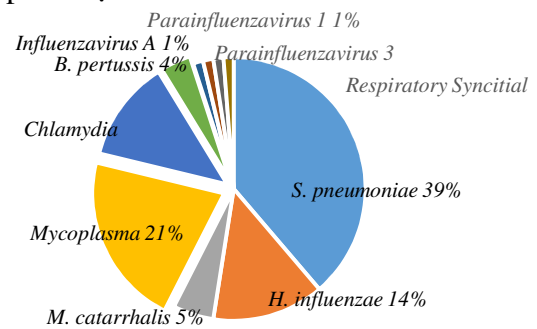
nghiệm này cũng khó áp dụng vì độ nhạy đa số không cao.

Xét nghiệm real-time PCR

Xét nghiệm real-time PCR phát hiện các tác nhân vi sinh gây viêm phổi và nhiễm trùng hô hấp dưới. Dựa trên nguyên tắc vừa nhân bản và vừa phát hiện các trình tự nucleic acid (DNA hay RNA) đặc hiệu trong mẫu thử mà real-time PCR hiện được xem là kỹ thuật có độ nhạy cao và độ đặc hiệu cao nhất trong phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh có mặt trong các bệnh phẩm khác nhau.^{1,2} Đã có nhiều báo cáo cho thấy real-time PCR là giải pháp nhạy cảm và đặc hiệu nhất trong phát hiện các tác nhân vi sinh gây viêm phổi hay nhiễm trùng hô hấp dưới.³⁻⁸ Các kết quả của các nghiên cứu trình bày sau đây chứng minh hiệu quả của việc áp dụng real-time PCR do đơn vị Vi Sinh-Sinh Học Phân Tử Lâm Sàng của bệnh viện Nguyễn Tri Phương kết hợp với Đơn Vị Nghiên Cứu và Phát Triển của công ty Nam Khoa phát triển để phát hiện các tác nhân vi sinh gây viêm phổi cũng như các nhiễm trùng hô hấp dưới không phải viêm phổi trên các bệnh nhân người lớn và trẻ em.

Trước hết là một nghiên cứu được thực hiện trên các bệnh nhân viêm phổi hay nhiễm trùng hô hấp dưới nhập viện điều trị tại khoa hô hấp bệnh viện Nguyễn Tri Phương. Nghiên cứu này thực hiện vào năm 2014 trên 124 bệnh nhân người lớn.⁹ Kỹ thuật real-time được thực hiện trên 124 mẫu đàm lấy từ các bệnh nhân trên để phát hiện các tác nhân vi khuẩn cộng đồng bao gồm *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *L. pneumophila*; và các virus bao gồm Influenzavirus A, *B. pertussis*, *Parainfluenzavirus 1-2-3*, *Adenovirus*, *Respiratory Syncytial virus*, và *Human metapneumovirus*. Tiêu chuẩn để xác định tác nhân chính gây bệnh là kết quả real-time PCR cho số định lượng cao nhất và phải ≥ 100.000 copies trong 1 ml đàm. Kết quả nghiên cứu có 64.5% các trường hợp phát hiện được tác nhân vi sinh gây bệnh, trong đó chiếm đa số là *S. pneumoniae* (39%), kế đó là vi khuẩn không điển hình (38%), *H. influenzae* (14%), *M. catarrhalis* (5%), còn lại 4% là các tác nhân virus (biểu đồ 1). Nghiên cứu cũng cho thấy các tác nhân vi khuẩn không điển hình còn phối hợp với các tác nhân chính gây bệnh là *S. pneumoniae* (29%) và *H. influenzae* (45.5%). Kết quả này đã chứng minh là

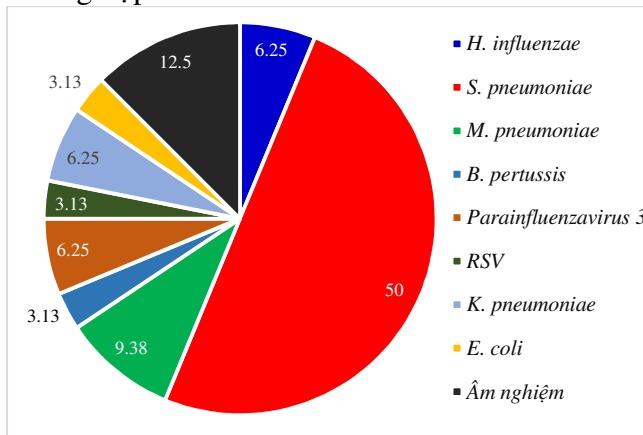
xét nghiệm mẫu đàm bằng kỹ thuật real-time PCR đã bộc lộ được tỷ lệ phân bố thật sự các tác nhân vi sinh gây viêm phổi và nhiễm trùng hô hấp dưới vì tỷ lệ này rất giống các tỷ lệ được công bố trong các tài liệu giáo khoa mà từ lâu các bác sĩ lâm sàng của chúng ta thường không mấy quan tâm do thực tế nuôi cấy mẫu đàm tại các phòng xét nghiệm vi sinh tại các bệnh viện rất hiếm khi phát hiện được các tác nhân như *S. pneumoniae* hay *H. influenzae*, còn tác nhân vi khuẩn không điển hình như *M. pneumoniae* là quá xa lạ vì đa số không có phương tiện để phát hiện.



Biểu đồ 1: Phân bố các tác nhân chính gây bệnh phát hiện được bằng kỹ thuật real-time PCR thực hiện trên 124 mẫu đàm lấy từ 124 bệnh nhân viêm phổi và nhiễm trùng hô hấp dưới không phải viêm phổi nhập viện tại khoa hô hấp bệnh viện Nguyễn Tri Phương từ tháng 1/2013 đến 6/2014

Một nghiên cứu khác thực hiện trên các bệnh nhi viêm phổi không đáp ứng với điều trị kháng sinh kinh nghiệm bước đầu.¹⁰ Đây là nghiên cứu thực hiện vào năm 2015 trên 32 trường hợp mẫu đàm trên khí quản lấy qua hút mũi hầu (NTA=naso-tracheal-aspirate). Cả 32 mẫu được đánh giá tin cậy dựa vào thang điểm Barlett và được nuôi cấy song song với real-time PCR. Ngoài xét nghiệm phát hiện các tác nhân vi khuẩn cộng đồng, vi khuẩn không điển hình và virus như trong nghiên cứu 2014 ở trên, real-time PCR trong nghiên cứu này còn phát hiện thêm các vi khuẩn nhiễm khuẩn bệnh viện bao gồm *S. aureus* (kháng hay không kháng methicillin), *S. epidermidis* (kháng hay không kháng methicillin), *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* và *A. baumannii*. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 87.5% (28/32) các trường hợp là phát hiện được tác nhân chính gây bệnh (tiêu chuẩn là có số định lượng cao nhất và ≥ 100.000 copies/ml đàm). Nếu so với nuôi cấy thì real-time PCR có tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh cao hơn nuôi cấy rất nhiều, cụ thể: phát hiện được 21 trường hợp *S. pneumoniae*

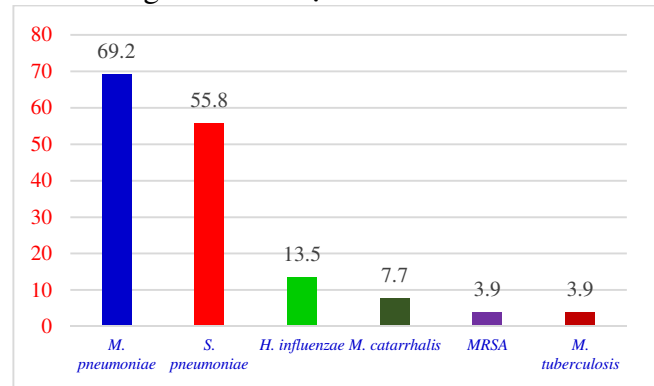
trong khi nuôi cấy không phát hiện được ca nào, phát hiện được 2 trường hợp *H. influenzae* trong khi nuôi cấy chỉ phát hiện được 1 trường hợp, phát hiện được 3 trường hợp *E. coli* trong khi nuôi cấy chỉ phát hiện được 1 trường hợp, phát hiện được 3 trường hợp *K. pneumoniae* trong khi nuôi cấy chỉ phát hiện được 2 trường hợp, đối với *P. aeruginosa* cả real-time PCR và nuôi cấy đều phát hiện 1 trường hợp.



Biểu đồ 2: Phân bố các tác nhân chính gây bệnh phát hiện được bằng kỹ thuật real-time PCR thực hiện trên 32 mẫu NTA lấy từ 32 bệnh nhi viêm phổi không đáp ứng điều trị kháng sinh kinh nghiệm bước đầu

Biểu đồ 2 trình bày tỷ lệ các tác nhân chính gây bệnh phát hiện được trong đó cao nhất là *S. pneumoniae* (50%); kế đó là *M. pneumoniae* (9.38%); các tác nhân *H. influenzae*, Parainfluenzavirus 3, và *K. pneumoniae* chiếm 6.25% cho mỗi tác nhân; *E. coli* và RSV chiếm 3.15% cho mỗi tác nhân. Nghiên cứu cũng cho thấy ngoài tác nhân chính gây bệnh, có sự phối hợp với các tác nhân khác, cụ thể là có đến 15.6% phối hợp *S. pneumoniae* + *M. pneumoniae*; 3.13% phối hợp *S. pneumoniae* + Parainfluenzavirus 3, phối hợp *S. pneumoniae* + Parainfluenzavirus 3 + *K. pneumoniae* chiếm 3.13%, phối hợp *S. pneumoniae* + Parainfluenzavirus 3 + *K. pneumoniae* + *E. coli* chiếm 3.13%, phối hợp *S. pneumoniae* + Influenzavirus A + *K. pneumoniae* chiếm 3.13%, phối hợp *S. pneumoniae* + Parainfluenzavirus 3 + Adenovirus + *E. coli* chiếm 3.13%, và cuối cùng là phối hợp *H. influenzae* + *P. aeruginosa* chiếm 3.13%. Các kết quả thu nhận được trong nghiên cứu này đã cho thấy tác nhân chính gây viêm phổi ở trẻ em vẫn là *S. pneumoniae* dù kết quả vi sinh không cấy ra được trường hợp nào có *S. pneumoniae* vì đây là các trường hợp đã được cho kháng sinh kinh nghiệm bước đầu. Một

điểm nữa cần lưu ý trong trong kết quả của nghiên cứu này là vai trò của các vi khuẩn không điển hình, đặc biệt là *M. pneumoniae* cũng có vai trò khá lớn không chỉ là tác nhân chính gây bệnh mà còn có vai trò tác nhân phối hợp nữa; chính vì vậy trong chỉ định kháng sinh điều trị bước đầu, bác sĩ phải xem xét thêm tác nhân *M. pneumoniae* để cân nhắc kháng sinh điều trị.



Biểu đồ 3: Tỷ lệ các tác nhân gây bệnh phát hiện được bằng kỹ thuật real-time PCR thực hiện trên 52 mẫu NTA lấy từ 52 bệnh nhi viêm phổi thùy

Năm 2016, một nghiên cứu thực hiện tại bệnh viện Nhi Đồng 1 trên các bệnh phẩm là các mẫu NTA lấy từ các bệnh nhân viêm phổi thùy.¹¹ Cũng như nghiên cứu 2015, các mẫu NTA được đánh giá qua thang điểm Barlett và các mẫu tin cậy được tiến hành nuôi cấy vi sinh và làm xét nghiệm real-time PCR phát hiện các tác nhân vi khuẩn và virus như nghiên cứu 2015. Có 52 mẫu NTA lấy từ 52 bệnh nhi bị viêm phổi thùy được nuôi cấy và xét nghiệm real-time PCR. Tất cả 52 mẫu đều cho kết quả nuôi cấy âm tính trong khi cả 52 mẫu đều cho kết quả real-time PCR phát hiện được tác nhân vi sinh gây bệnh với tiêu chuẩn định lượng ≥ 100.000 copies/ml. Trong 52 mẫu này có 2 mẫu mà bệnh nhân hoàn toàn không đáp ứng điều trị kháng sinh và kết quả real-time PCR lại phát hiện *M. tuberculosis* còn các tác nhân khác đều (-). Kết quả real-time PCR phát hiện tác nhân gây bệnh trong 52 mẫu được trình bày trong biểu đồ 3 cho thấy tác nhân chiếm đa số là *M. pneumoniae* 69.2%,³⁶ kế đó là *S. pneumoniae* 55.8%,²⁹ *H. influenzae* 13.5%,⁷ *M. catarrhalis* 7.7%,⁴ MRSA 3.9%,² và *M. tuberculosis* 3.9%.² Phân tích thêm kết quả cho thấy có 30 trường hợp một tác nhân, trong đó 21 là *M. pneumoniae*, 1 là *M. tuberculosis*, 8 là *S. pneumoniae* và 1 là *M. tuberculosis*; 22 trường hợp là nhiều tác nhân. Kết quả phân tích tác nhân phát hiện được nhờ xét nghiệm real-time PCR của 52

trường hợp viêm phổi thùy được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Các trường hợp đơn tác nhân và đa tác nhân trong 52 các trường hợp xét nghiệm real-time PCR phát hiện các tác nhân gây viêm phổi thùy ở trẻ em

Tác nhân	Số ca	%
MP	21	40.38
MP+MRSA	1	1.92
PNE+MRSA	1	1.92
PNE+MP	11	21.15
PNE+MP+MR	1	1.92
PNE+MP+HI+MR	1	1.92
PNE+MP+HI	1	1.92
PNE+HI+MR	2	3.85
PNE+HI	3	5.77
PNE	8	15.38
TB	1	1.92
TB+PNE+MP	1	1.92
Tổng cộng	52	100.00

PNE: *S. pneumoniae*, MP: *M. pneumoniae*, HI: *H. influenzae*, MR: *M. catarrhalis*, MRSA: Methicillin Resistant *S. aureus*, TB: *M. tuberculosis*

Một nghiên cứu gần đây nhất là nghiên cứu REALS được thực hiện đa trung tâm gồm bệnh viện Chợ Rẫy, bệnh viện Nhân Dân Gia Định, bệnh viện Phạm Ngọc Thạch và bệnh viện Đa Khoa Trung Ương Cần Thơ. Nghiên cứu này chưa tổng kết, tuy nhiên chúng tôi xin trình bày ra đây kết quả sơ bộ tại bệnh viện Chợ Rẫy với 70 mẫu đàm lấy từ bệnh nhân nhập viện khoa hô hấp bệnh viện Chợ Rẫy với chẩn đoán viêm phổi hay nhiễm trùng hô hấp dưới không phải viêm phổi. Các mẫu sau khi được đánh giá độ tin cậy qua thang điểm Barlett là được tiến hành nuôi cấy và làm xét nghiệm real-time PCR để phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh gồm tác nhân vi khuẩn cộng đồng, vi khuẩn không điển hình, virus và các vi khuẩn bệnh viện. Kết quả xét nghiệm real-time cho thấy có 31 trường hợp (44.3%) phát hiện được tác nhân vi sinh chính gây bệnh với kết quả định lượng cao nhất và ≥ 100.000 copies/ml đàm. So với nuôi cấy thì chỉ có 13 trường hợp nuôi cấy dương tính (18.6%). Có 1 trường hợp cấy ra *A. baumannii*, 1 trường hợp cấy ra *P. aeruginosa*, và 1 trường hợp cấy ra *E. cloacae* như kết quả real-time PCR của cả 3 trường hợp này đều âm nghiệm. Có 1 trường hợp cấy ra *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) nhưng kết quả real-time PCR lại phát hiện *S. pneumoniae* với số copies 9.67M/ml kèm với *H.*

influenzae với số copies 246K/ml. Còn là 9 trường hợp cấy dương tính là trùng khớp với kết quả real-time PCR, bao gồm 4 trường hợp *P. aeruginosa*, 2 trường hợp MRSA, và 3 trường hợp *A. baumannii*. Sự phân bố tác nhân vi sinh chính gây bệnh do xét nghiệm real-time PCR phát hiện được trình bày trong biểu đồ 4 cho thấy cao nhất là *S. pneumoniae* 39% (12 ca), kế đó là *H. influenzae* 16% (5 ca) và *P. aeruginosa* 16% (5 ca), MRSA chiếm 13% (4 ca), *A. baumannii* 7% (2 ca), *K. pneumoniae* 3% (1 ca), *E. faecium* 3% (1 ca), và *M. catarrhalis* 3% (1 ca). Kết quả real-time cũng cho thấy có 5 trường hợp ngoài tác nhân gây bệnh chính còn có tác nhân phối hợp, đó là 1 trường hợp tác nhân chính gây bệnh là *M. catarrhalis* với số copies 17M/ml có phối hợp với *P. aeruginosa* 143K/ml, 2 trường hợp *S. pneumoniae* với số định lượng 9.7M và 17.3M/ml là tác nhân chính gây bệnh phối hợp với *H. influenzae* 426K/ml và 246K/ml, 1 trường hợp *H. influenzae* 2.3M/ml phối hợp với *A. baumannii* 24K/ml, và 1 trường hợp *P. aeruginosa* 403K phối hợp với *A. baumannii* 121K/ml.

Các kết quả ghi nhận được đã cho thấy có multiplex realtime PCR có khả năng phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh cao hơn nhiều lần so với phương pháp thường qui tại các phòng thí nghiệm. Mô hình để thực hiện giải pháp này được gọi là mô hình STREAMLINE REAL-TIME PCR do chúng tôi thiết kế với hai thiết bị cơ bản là: (1) thiết bị tách chiết DNA/RNA tự động sử dụng kit NKDNARNAPREP-MAGBEAD để tách chiết DNA/RNA bằng hạt từ bọc silica,¹² và (2) thiết bị real-time PCR sử dụng các bộ kit bao gồm NKARIbac real-time PCR phát hiện các tác nhân vi khuẩn cộng đồng, NKARIatypicalbac real-time PCR phát hiện tác nhân vi khuẩn không điển hình, NKARIVirus real-time PCR phát hiện tác nhân virus, và NKHAPVAPbac real-time PCR phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện hay viêm phổi thở máy. Với mô hình này, kết quả có thể đến tay bác sĩ rất kịp thời để có thể sử dụng giải pháp kháng sinh trúng đích các tác nhân vi khuẩn gây bệnh rất kịp thời mà khỏi phải sử dụng kháng sinh bước đầu kinh nghiệm.

KẾT LUẬN

Phát hiện tác nhân gây viêm phổi hay các nhiễm trùng cấp tính đường hô hấp dưới là một thách thức đối với xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Sử dụng các xét

nghiệm vi sinh truyền thống để cấy và phân lập các tác nhân vi khuẩn gây bệnh thường không đủ nhạy cảm do bệnh nhân đã được sử dụng kháng sinh trước hay do phòng thí nghiệm không trang bị đầy đủ môi trường để cấy phân lập được những vi khuẩn gây bệnh thường gặp nhưng không dễ nuôi cấy như *S. pneumoniae*, *H. influenzae*... Nuôi cấy cũng có thể cho kết quả không đặc hiệu do bệnh phẩm đậm là bệnh phẩm tấp nhiễm và đa số thường không tin cậy nên vi khuẩn cấy phân lập được chưa hẳn là vi khuẩn gây bệnh. Không chỉ vậy, nuôi cấy thường qui cũng không thể nuôi cấy được các tác nhân vi khuẩn không điển hình như *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*... cũng như các virus gây bệnh. Thử nghiệm miễn dịch như huyết thanh học hay hóa miễn dịch cũng có rất nhiều hạn chế khó có thể khắc phục được do độ nhạy và độ đặc hiệu không cao hay thậm chí kết quả cũng nhiều khi không hữu dụng lâm sàng vì có khi phải dựa vào huyết thanh kép lấy 2 lần cách nhau 10-14 ngày mới có thể biện luận được kết quả (trường hợp tìm kháng thể IgG đặc hiệu tác nhân gây bệnh). Chính vì vậy, cho dù hiện nay nuôi cấy vẫn được xem là chuẩn vàng trong chẩn đoán xác định tác nhân gây viêm phổi hay nhiễm trùng cấp đường hô hấp dưới không phải viêm phổi, tiếp cận chẩn đoán sử dụng kỹ thuật real-time PCR ngày càng được sử dụng rộng rãi. Chúng tôi cũng đã sử dụng tiếp cận này và đã áp dụng cho nhiều nghiên cứu đã trình bày ở trên với các kết quả cho thấy đây là một tiếp cận rất cần thiết để giúp bác sĩ lâm sàng sớm có liệu pháp điều trị trúng đích, tránh phải kéo dài điều trị kinh nghiệm mà nhiều khi không hiệu quả trên bệnh nhân. Giải pháp này hiện rất khả thi nếu sử dụng đúng mô hình STREAMLINE REAL-TIME PCR với các bộ kit mà chúng tôi đã thiết kế và đang áp dụng hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Margret Schuller et al. (2010). PCR for Clinical Microbiology. Springer publisher.
2. Phạm Hùng Vân. (2009). PCR và real-time PCR – Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. Nhà Xuất Bản Y Học.
3. Kate E. T., Eric C. J. C. et al. (2005). Improved Diagnosis of the Etiology of Community-Acquired Pneumonia with Real-Time Polymerase Chain Reaction. Clin Infect Dis. 41:345-51
4. Gadsby N. J., Templeton K. E. et al. (2015). Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. Clin Microbiol Infect. 21:788.e1-788.e13
5. Jan J. O., Marc J. M. B. et al. (2015). Impact of Rapid Detection of Viral and Atypical Bacterial Pathogens by Real-Time Polymerase Chain Reaction for Patients with Lower Respiratory Tract Infection. Clinical Infectious Diseases. 41:1438–44.
6. Takahashi K., Yoshida L. M. et al. (2013). The incidence and aetiology of hospitalized community-acquired pneumonia among Vietnamese adults: a prospective surveillance in Central Vietnam. BMC Infectious Diseases. 13:296.
7. Ronaldo B. M. J., Rita E. C. et al. (2014). Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 109(6):716-721.
8. Christoph S., Theresia P. K. et al. (2002). Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. Journal of Clinical Microbiology. 40(6):2051–2056
9. Trần Thị Thanh Vy. (2014). Xác định tỷ lệ các tác nhân vi khuẩn không điển hình gây viêm phổi nhập viện tại Bệnh Viện Nguyễn Tri Phương trong thời gian từ tháng 11/2013 đến 06/2014. Luận Văn Thạc Sĩ Y Học.
10. Bùi Lê Hữu Bích Vân. (2015). Tác nhân gây viêm phổi cộng đồng không đáp ứng với điều trị kháng sinh ban đầu ở trẻ dưới 5 tuổi tại Khoa Nội Tổng Quát 2 BV Nhi Đồng 1. Luận Văn Thạc Sĩ Y Học.
11. Trần Quang Khải. (2016). Đặc điểm bệnh viêm phổi Thụ ở trẻ em tại khoa Nội Tổng Quát 2 bệnh viện Nhi Đồng 1. Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành nhi khoa
12. Van Pham Hung et al. (2015). The solution for the low-income countries to establish the automatic extraction of the nucleic acid from the clinical samples. Asean Congress on Medical Biotechnology and Molecular Biosciences 2015. October 8th – 9th, 2015 at Arnoma Grand Hotel, Bangkok, Thailand.