

# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR ĐA MÔI PHÁT HIỆN CÁC TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ SÀNG LỌC CÁC KIỂU GEN MÃ HÓA ENZYME SINH ESBL VÀ CARBAPENEMASES TRONG BỆNH PHẨM NHIỄM KHUẨN VẾT MỔ Ở VIỆT NAM

Ngô Tất Trung<sup>1</sup>, Trần Thị Thu Hiền<sup>1</sup>, Trần Thị Thanh Huyền<sup>1</sup>,  
Đào Thanh Quyên<sup>1</sup>, Mai Thanh Bình<sup>1</sup>, Phan Quốc Hoàn<sup>1</sup>,  
Christian G Meyer<sup>1</sup>, Thirumalaisamy P Velavan<sup>1</sup>, Lê Hữu Song<sup>1</sup>.

**Tổng quan:** Nhiễm khuẩn vết mổ (Surgical site infection) là bệnh thường gặp ở các BN sau phẫu thuật tại Việt Nam. Bệnh này làm tăng nguy cơ phơi nhiễm cho BN, kéo dài thời gian nằm viện làm tăng mức chi phí và nguy cơ tử vong cao đối với trường hợp phẫu thuật phức tạp như đặt stent hoặc mô tim... Cho tới hiện nay, phương pháp chẩn đoán bằng nuôi cấy vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định tác nhân gây bệnh và tính kháng thuốc trong nhiễm khuẩn vết mổ. Tuy nhiên, với tính chất đa dạng và phức tạp của loại bệnh phẩm thì vẫn có khả năng tồn tại hiện tượng âm tính giả và thời gian nuôi cấy kéo dài. **Mục tiêu:** Ứng dụng phương pháp PCR đa môi phát hiện các tác nhân vi khuẩn thường gặp nhất gây bệnh và các kiểu gen mã hóa cho enzyme betalactamases kháng ESBL phổ rộng hoặc carbapenemases từ bệnh nhân nhiễm khuẩn sau mổ ở bệnh viện. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu được thực hiện trên 91 mẫu bệnh phẩm nhiễm khuẩn sau mổ từ BN tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Nghiên cứu đánh giá độc lập và so sánh kết quả giữa hai phương pháp nuôi cấy, làm kháng sinh đồ và PCR đa môi. **Kết quả và kết luận:** Sử dụng phương pháp PCR đa môi đã tối ưu làm tăng khả năng phát hiện các tác nhân gây bệnh từ các bệnh phẩm nhiễm khuẩn vết mổ so với phương pháp nuôi cấy truyền thống. PCR đa môi có thể nhanh chóng đưa ra kết quả về các kiểu gen mã hóa enzyme betalactamase liên quan đến kháng betalactam của vi khuẩn. Nghiên cứu lần đầu tiên phát hiện được kiểu gen Turkey - specific ESBL (PER - 1) bag hai họ gen (*Oxa23* và *Oxa58*) tại Việt Nam.

**Từ khóa:** PCR đa môi, nhiễm khuẩn sau mổ (SSI), ESBL, carbapenem.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn bệnh viện là vấn đề thường gặp ở những BN sau phẫu thuật, làm tăng nguy cơ mắc bệnh, kéo dài thời gian nằm viện, chi phí tăng và tăng nguy cơ tử vong<sup>[1]</sup>. Những BN bị nhiễm khuẩn sau mổ sẽ được chăm sóc cẩn thận, được điều trị các liệu pháp kháng khuẩn hoặc kháng nấm. Tuy nhiên, hiệu quả điều trị của

kháng sinh chủ yếu phụ thuộc vào chính các tác nhân vi sinh gây bệnh. Cho đến nay, nuôi cấy vi khuẩn vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định tác nhân gây bệnh trong nhiễm khuẩn sau mổ. Các tác nhân gây bệnh này thường gặp nhất như *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, nhóm vi khuẩn Gram dương kỵ khí và *Proteus mirabilis*<sup>[2]</sup>. Tuy nhiên, phân lập nuôi cấy gặp phải hai vấn đề tồn tại: i) Nuôi cấy chỉ có thể phát hiện các vi sinh vật có khả năng sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy nhất định và chưa xử lý kháng sinh; ii) thời gian cấy khuẩn dài (từ 24 - 48h). Trong khoảng thời gian này tình trạng của bệnh nhân có

<sup>(1)</sup>Viện Lâm sàng Y học nhiệt đới, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Ngày nhận bài: 15/7/2015.

Ngày phản biện xong: 10/12/2015.

Ngày duyệt đăng: 26/01/2016.

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Ngô Tất Trung, Viện Lâm sàng Y học nhiệt đới, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Điện thoại: 0919119416. E-mail: ntatrung@gmail.com

thể thay đổi, thậm chí nguy hiểm hơn<sup>[3]</sup>. Mặc dù các kháng sinh phổ rộng đã được sử dụng để kiểm soát SSI, nhưng sự gia tăng các vi khuẩn kháng thuốc là vấn đề đáng báo động. *S. aureus* kháng Methiciline (ARMS) hoặc họ Enterobacteriace kháng betalactamases (ESBL)/carbapenemases<sup>[4],[5]</sup>. Cho đến nay, hơn một ngàn gen mã hóa cho betalactamase (ESBL) hoặc carbapenemase đã được thừa nhận<sup>[6]</sup>. Các công bố cũng chỉ ra rằng, biểu hiện lâm sàng khác nhau theo vị trí địa lý và địa hình của địa phương. Nếu nuôi cấy vi khuẩn thất bại thì việc xác định kháng sinh đồ sẽ không thể thực hiện được.

Việt Nam là đất nước có khí hậu nhiệt đới gió mùa ẩm, nơi có nguy cơ cao của các bệnh truyền nhiễm. Tỷ lệ mắc SSI được xác định bằng nuôi cấy là 33%<sup>[7]</sup>. Ở nước ta, có một vài báo cáo về SSI liên quan tới mẫn bệnh nhưng không có dữ liệu về kiểu hình kháng thuốc và chưa có nghiên cứu hay báo cáo về kiểu gen betalactamase. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *Staphylococcus aureus* và *Candida spp* là những tác nhân nuôi cấy thường gặp nhất gây nhiễm khuẩn vết mổ (SSI) và khả năng chúng mang các gen mã hóa VEB, CTX - M của nhóm ESBL hoặc NDM - 1 của carbapenemase. Nghiên cứu này với mục tiêu nhằm ứng dụng PCR đa môi để phát hiện nhanh tác nhân gây bệnh có mặt trong mẫu nhiễm khuẩn vết mổ và khảo sát tỷ lệ các kiểu hình kháng ESBL hoặc carbapenem ở bệnh nhân nhiễm khuẩn vết mổ (SSI).

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Mẫu bệnh phẩm:** 91 mẫu bệnh phẩm được lấy từ BN nhập viện tháng 2/2012 đến tháng 12/2012 tại Bệnh viện

Trung ương Quân đội 108 với một trong các tiêu chuẩn sau: (1) Có mủ tại các vết mổ kín sâu ở phần mô mềm trong vòng 30 ngày kể từ khi hoạt động hoặc trong vòng một năm đối với việc cấy ghép những bộ phận giả; (2) Tại vị trí vết mổ có triệu chứng đau, sưng đỏ, phù nề với các vết mổ mở và có sự giảm định của bác sỹ. Được sự đồng ý của BN và cho phép của Hội đồng Y đức Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Bệnh phẩm từ vết mổ sẽ được chia làm hai và tiến hành song song hai phương pháp nuôi cấy và PCR.

**Phân lập vi khuẩn:** Để thiết lập được quy trình PCR đa môi, chúng tôi phân lập các loài vi khuẩn để làm chứng dương *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* và *E. coli* tại Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

**Nuôi cấy vi khuẩn:** Việc nuôi cấy vi khuẩn được tiến hành theo hướng dẫn<sup>[8]</sup>. Cụ thể như sau: 500µl dịch từ vết thương được trộn đều trong 800µl dung dịch PBS. Dịch nổi được nuôi cấy ở bốn loại môi trường khác nhau như thạch máu cừu, thạch MacConkey, thạch sôcola và môi trường thạch có than hoạt và cao men (BCYE) ở điều kiện 37°C trong vòng 7 ngày. Khuẩn lạc của các vi khuẩn được định danh tại Khoa Vi sinh vật.

**Thiết kế môi cho các tác nhân cụ thể trong phản ứng PCR đa môi:** Để phát hiện 8 tác nhân gây bệnh trên, chúng tôi chia ra làm hai bộ môi MicroSHPT @ 5leX và MicroSHPT @ 3leX, các băng điện di có khoảng cách từ 50 - 100bp đảm bảo phân biệt rõ ràng trên gel điện di agarose (bảng 1).

**Bảng 1: Trình tự môi và gen đích được sử dụng để sàng lọc tác nhân vi sinh vật gây bệnh**

Pathogens	Accession number	Forward/Reverse Primer (5' to 3')	Size (bp)	Final concentration (mM)
<i>C. albicans</i>	Z48339	GTGGGTGGTAAAATCCATCTAAAAGCTA	243	0.2
		CCGTGCCACA TCCCTCCGC		0.2
<i>P. aeruginosa</i>	AF116258	CCCGAATGTCCGCAATCATTCTC	411	0.2
		CCGTAGACCTCCCGCTTGAA		0.2
<i>S. aureus</i>	STAAROA	AAAGGKGAATAAGAAAGTCCCG	515	0.2
		ATGGTCCGTTCCTTAGAAAACAAACTTG		0.2
<i>A. baumannii</i>	JX470958	TTCGKCCCTTTGAGKCTTTAGTG	599	0.2
		TGGTGCAACAAACTCCCATGGT		0.2
<i>E. coli</i>	S-uidA	GTCCGGAGTGAAGATCCCTTTC	773	0.2
		CAATTAATGGACTGGAATTGKCC		0.2
<i>K. pneumoniae</i>	Kp-aldA	CCTTGTCTTTAAACGKXKX	332	0.2
		TTTTGGCCGCAAGCG		0.2
<i>S. epidermidis</i>	AF298800	CCXJAICTTAGTTGATCTGCTGC	637	0.2
		AGATAATACTGATACCTTCAGCTTTGAA TTTTGTG		0.2
<i>S. pneumoniae</i>	Sp LytA	CAACCGTACAGAA TGAAGCCGATTAT	701	0.2
		GTCTTGTACTTGAOCCAGCCT		0.2

**Thiết kế mồi cho phản ứng PCR đa mồi sàng lọc các họ gen mã hóa cho ESBL hoặc carbapenemase.**

Để sàng lọc các gen mã hóa cho các enzyme beta-lactamsase (ESBL) và carbapenemases, chúng tôi sử dụng năm bộ mồi như sau: SHPT@ESBL - 1 (SHV, TEM, CTX - M), SHPT@ESBL - 2 (VEB, GES, PER), SHPT@Carba - 1 (NDM, SPM, VIM), SHPT@Carba - 2 (IMP, AIM, KPC/BIC, DIM), SHPT@Carba - 3 (Oxa23 như nhóm, OXA48 như nhóm, Oxa58 như nhóm) đã được thiết kế. Trong các bộ mồi trên, thì bộ mồi SHPT@Carba - 3 (OXA nhóm) chúng tôi thiết kế nhằm hướng tới bắt tất cả các mục tiêu dựa trên khu vực bảo tồn của họ gen ESBL (SHV, TEM, CTX - M, VEB, GES, PER) hoặc họ gen carbapenemase (NDM, SPM, VIM, IMP, AIM, KPC/BIC, DIM). Các bộ mồi sử dụng để sàng lọc các gen mã hóa ESBL hoặc carbapenemase được liệt kê trong bảng 2. Các chủng vi khuẩn mang gen OXA48, VIM, SIM, SPM, AIM, IMP, KPC, BIC, DIM được Laurent Poirel cung cấp<sup>[9]</sup>.

**Bảng 2. Trình tự mồi sử dụng để sàng lọc các gen mã hóa cho ESBL hoặc carbapenemase**

SHPT@ESBL - 1(SHV, TEM, CTX - M)			Nồng độ mồi (nM)
590	SHPT108@CTX-M-U1-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	0.4
	SHPT108@CTX-M-U2-R	GGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	0.4
422	SHPT108@TEM-U-F	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGAC	0.08
	SHPT108@TEM-U-R	CAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG	0.08
739	SHPT108@TR-SHV-F	TGTATTATCTC(C/T)CTGTTAGCC(A/G)CCCTG	0.48
	SHPT108@TR-SHV-R	GCTCTGCTTGTATTCCGGCCAAGC	0.48
SHPT@ESBL - 2(VEB, GES, PER)			
391	SHPT108@TR-VIM-F	GATGGTGTGGTGGCATATCGCAAC	0.08
	SHPT108@TR-VIM-R	CATCGCTGTGGGGTTCACCAATTT	0.08
604	SHPT108@TR-SPM-F	CTGGCAGGGATCGCTCACTC	0.08
	SHPT108@TR-SPM-R	GGTTCCGATCAGCCACCTCTCA	0.08
731	SHPT108@NDM-1-F primer	CAGTGTGGGGGCTGACGAT	0.08
	SHPT108@NDM-1-R primer	CTGAGCA ACC TGC GCA ATR ATA GCT T	0.08
SHPT@Carba - 1(NDM, SPM, VIM)			
320	SHPT108@TR-VIM-F	GATGGTGTGGTGGCATATCGCAAC	0.04
	SHPT108@TR-VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAGGATAGAA	0.04
291	SHPT108@TR-SPM-F	CGTTTGAAAATCTGGGTACGCAAACG	0.04
	SHPT108@TR-SPM-R	GTTTCAAATCAAAAACATTATCCGCTGGAACAG	0.04
200	SHPT108@NDM-1-F primer	CGAAAGTCAGGCTGTGTTCGGC	0.08
	SHPT108@NDM-1-R primer	GACCGCCAGATCCTCAACTG	0.08

SHPT@ESBL - 1(SHV, TEM, CTX - M)			Nồng độ mồi (nM)
SHPT@Carba - 2(IMP, AIM, KPC/BIC, DIM)			
710	SHPT108@Tr-DIM-F	TATTCAGCTTGTCTTCGCTTCTAACG	0.08
	SHPT108@Tr-DIM-R	GTTAGCGTTCGGCTGGATTGATTG	0.08
412	TR-KPC-BIC-F	GCTTCT(T/G)GCTG(C/G)CGC(T/C)GTGCT	0.2
	TR-KPC-BIC-R	AGCCAATCAAC(A/C)A(A/G)CTGCTG(C/A)CGC	0.2
326	SHPT108@AIM-F	CCCTGAAGGTGTACGGAAACAC	0.04
	SHPT108@AIM-R	GGGTTCCGGCCACCTCGAATTG	0.04
204	Tr-IMP-F	AC(G/A)GG(C/G/T)GGAATAGAGTGGCTTAA(T/C)TCTC	0.02
	TR-IMP-R	TTCAGG(C/T)A(A/G)CCAAACYACTASGTTATCT	0.02
SHPT@Carba - 3(Oxa23 like group, OXA48 like group, Oxa58 like group)			
599	SHPT108@Oxa-58-F	CCCCTCTGCGCTCTACATACAACATC	0.08
	SHPT108@Oxa-58-R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTGAGCATAG	0.08
482	Tr-OXA-G23-F2	AGAATATGT(G/C)CC(A/T)GC(C/A)TC(T/A)ACA TTTAA(A/G)ATG	0.2
	TR-OXA-G23-R2	CCCA(G/A)CC(G/T)GT(C/T)AACCA(G/A)CC	0.2
286b	Tr-Oxa-G48-F2	CACCAAGTCTTTAAGTGGGATGGACA	0.08
	Tr-Oxa-G48-R2	CCGATACGTGTAACCTATTGTGATACAGCTT	0.08

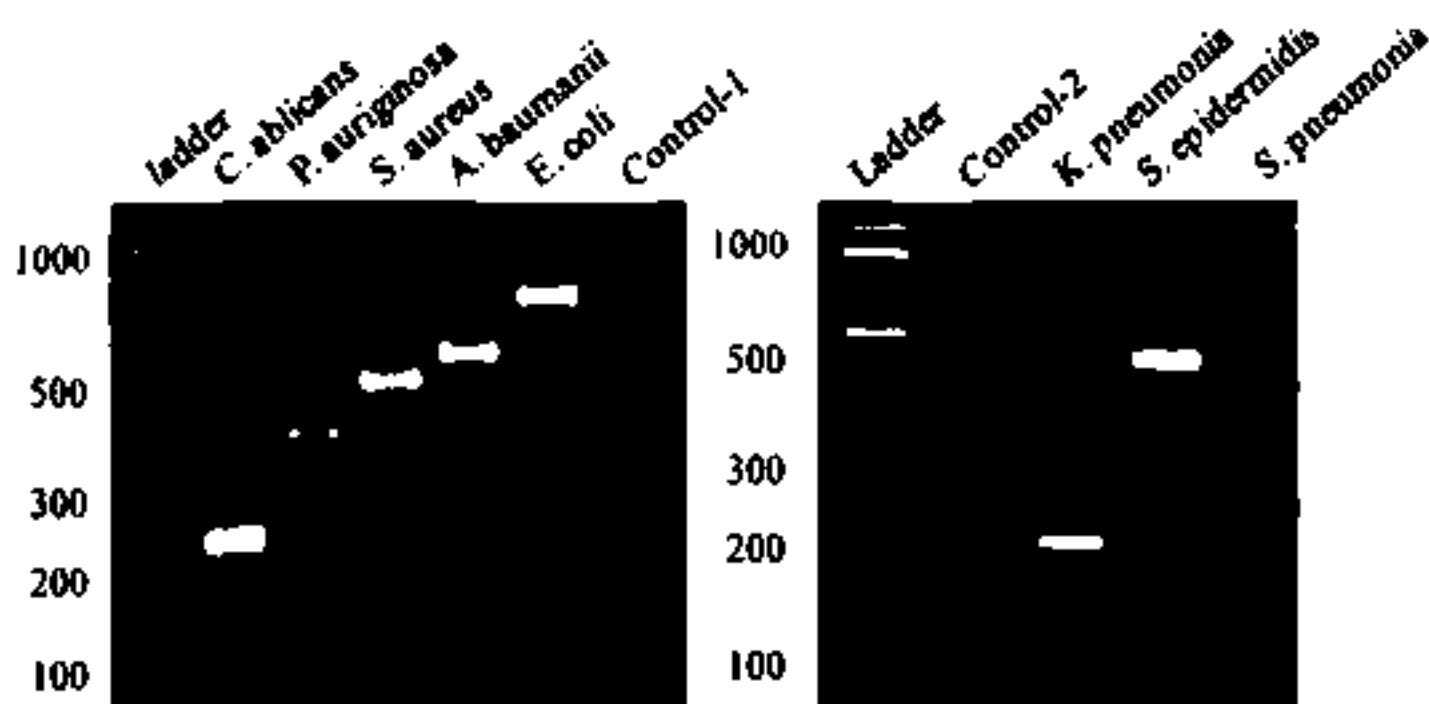
**Tách chiết ADN và thực hiện phản ứng PCR**

Mẫu bệnh phẩm được ly tâm thu cặn, sau đó thêm vào 300µl dung dịch universal lysis solution (200mM NaOH, 1% SDS) để ủ ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút. Sau đó trung hòa bằng 250µl trisHCL 1M sao cho pH đạt mức 7,5. Thêm 400µl dung dịch phenol/chloroform/isoamyl alcohol vào hỗn hợp trên sau đó ly tâm 13,000g trong 5 phút<sup>[10]</sup>. Lấy khoảng 600µl dịch nổi chuyển sang một ống eppendorf mới và thêm vào dung dịch thu được này iso-propanol theo tỷ lệ 1:1. Trộn đều dung dịch và ly tâm 16,000g trong 30 phút thu được cặn ADN, tiếp tục rửa hai lần bằng cồn 70% và làm khô ADN. Cuối cùng thêm 150µl TE (25mM Tris - base pH 8.0, 1mM EDTA) và sử dụng 5µl cho phản ứng PCR thể tích 25µl bao gồm: 10mM Tris - HCl pH 8.3/50mM KCl/1.5mM Mg<sup>2+</sup>, 250µM dNTP và lượng mồi theo bảng 1 và 2. Chu trình nhiệt độ như sau: 95°C trong 4 phút, (95°C trong 25 giây, 58°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút) x 35 chu kỳ; 72°C trong 5 phút. Trong thí nghiệm này, các sản phẩm khuếch đại được tinh sạch làm khuôn cho phản ứng PCR giải trình tự gen. Kết quả giải trình tự được đọc và so sánh đối chiếu với các trình tự gen đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## KẾT QUẢ

### Kết quả PCR đa môi phát hiện tác nhân nâng cao tỷ lệ dương tính của SSI

Sau khi tối ưu hóa điều kiện phản ứng cho hai bộ môi MicroSHPT@5leX và MicroSHPT@3leX (Hình 1, Bảng 1), chúng tôi tiến hành sàng lọc trên 91 mẫu bệnh phẩm. Kết quả cụ thể ở bảng 3.



**Hình 1: Các phản ứng Multiplex PCR assays sàng lọc vi sinh vật gây nhiễm khuẩn vết mổ**

Panel trái phản ứng MicroSHPT@5leX đặc hiệu cho *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, trong khi đó panel phải MicroSHPT@3leX khuếch đại các gene đặc hiệu cho *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*. Control - 1, control - 2 là DNA người.

**Bảng 3: Kết quả PCR đa môi và nuôi cấy phát hiện tác nhân gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm nhiễm khuẩn vết mổ**

Mầm bệnh	Kết quả nuôi cấy	PCR đa môi
<i>Candida albicans</i>	0	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	13
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3
<i>Escherichia coli</i>	6	10
<i>Citrobacter sp</i>	1	0
<b>Tổng số mẫu (dương tính)</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Tổng số mẫu</b>	<b>91</b>	<b>91</b>

Kết quả cho thấy, 40 trong số 91 bệnh phẩm SSIs cho kết quả dương tính bằng nuôi cấy khuẩn (mọc khuẩn lạc

của ít nhất 01 loài vi sinh vật) trong khi đó 60 bệnh phẩm cho kết quả dương tính bằng PCR đa môi (MicroSHPT@5leX or MicroSHPT@3leX reactions) với ít nhất 01 loài vi sinh vật (bảng 3). Ngoại trừ *Citrobacter spp*, tất cả các khuẩn lạc đều được khẳng định lại bằng kết quả dương tính bởi MicroSHPT@5leX hoặc MicroSHPT@3leX. Có bốn mẫu được xác định là âm tính với nuôi cấy nhưng dương tính với PCR. Kết quả cũng chỉ ra rằng, nuôi cấy vi khuẩn có tỷ lệ dương tính thấp hơn so với PCR đa môi. Điều này chứng tỏ rằng thử nghiệm PCR đa môi mà chúng tôi thiết kế có độ nhạy cao và chính xác trong chẩn đoán SSI hơn phương pháp nuôi cấy.

### Kết quả sàng lọc kiểu gen mã hóa enzyme betalactamase từ các mẫu bệnh phẩm SSI

Kết quả PCR đa môi sử dụng các bộ môi SHPT@ESBL - 1, SHPT@ESBL - 2, SHPT@Carba - 1, SHPT@Carba - 2, SHPT@Carba - 3 cụ thể ở hình 2. Năm phản ứng PCR đa môi được tiến hành để sàng lọc các gene mã hóa enzyme sinh ESBL hoặc carbapenemase từ 60 mẫu được xác định là dương tính bằng PCR (Bảng 3). Kết quả sàng lọc cho thấy tỷ lệ dương tính với họ gen SHV cao nhất là 10/60 ca (chiếm 16,6%). Ngoài ra các họ gen sinh ESBL khác như CTX - M hoặc TEM cũng được phát hiện trên các mẫu SSI. Đặc biệt có năm mẫu PCR dương tính như (NKSM9, NKSM11, NKSM28, NKSM33, NKSM40) cho kết quả dương tính với NDM - 1 mã hóa enzyme carbapenemase và cũng dương tính với SHV, CTX - M hoặc TEM. Mẫu NKSM 28 dương tính với kiểu gen Turkey - specific ESBL (*PER - 1*) và các gen thuộc họ gen oxaciline như (*Oxa23* và *Oxa58*) ở bảng 4 dưới đây:



**Hình 2: Phản ứng Multiplex PCR sàng lọc gene ESBL và carbapenemase**

Panel trên cùng SHPT@ESBL - 1 sẵn tìm các gene ESBL thuộc họ SHV, TEM, CTX - M; panel giữa bên trái là phản ứng SHPT@ESBL - 2 phát hiện các gene ESBL thuộc họ VEB, GES, PER genes; trong khi đó panel giữa bên phải là phản ứng SHPT@Carba - 2 phát hiện IMP, AIM,

KPC/BIC, DIM; panel dưới cùng bên trái là phản ứng SHPT@Carba - 1 phát hiện NDM, SPM, VIM; panel dưới cùng bên phải là phản ứng SHPT@Carba - 3 phát hiện Oxa23 like group, Oxa48 like group và Oxa58 like group; Mẫu chứng là genomics DNA người.

**Bảng 4: Kết quả sàng lọc kiểu gen mã hóa cho enzyme betalactamases detected từ mẫu bệnh phẩm SSI**

SSI ID	Kết quả xác định mầm bệnh		Kết quả PCR đa môi sàng lọc các kiểu gen mã hóa enzyme betalactamases								
	PCR đa môi	Nuôi cấy	NDM 1	SHV	CTX-M	TEM	OXA23	Per-1	GIM-1	VEB	OXA-58
NKSM9	<i>E. coli, K. pneumoniae, A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính					
NKSM11	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính					
NKSM28	<i>A. baumannii</i>	Âm tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính			Dương tính	Dương tính	Dương tính
NKSM33	<i>E. coli, K. pneumoniae, A. baumannii, P. aeruginosa</i>	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính					
NKSM40	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính					
NKSM49	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>		Dương tính							
NKSM53	<i>P. aeruginosa, S. aureus, E. coli</i>	<i>E. coli</i>		Dương tính		Dương tính					
NKSM54	<i>A. baumannii</i>	Âm tính		Dương tính							
NKSM55	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>		Dương tính							
NKSM91	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>					Dương tính	Dương tính			Dương tính
<b>Tổng số n(%)</b>			<b>5(5)</b>	<b>9(9)</b>	<b>5(5)</b>	<b>6(6)</b>	<b>1(1)</b>	<b>1(1)</b>	<b>1(1)</b>	<b>1(1)</b>	<b>2(2)</b>

## BÀN LUẬN

Các tác nhân gây nhiễm trùng bệnh viện sau phẫu thuật và tính kháng kháng sinh là mối đe dọa tới sức khỏe cộng đồng. Ở nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu hóa hai thử nghiệm PCR đa môi: i) Phát hiện tám tác nhân gây bệnh thường gặp nhất như *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* và *Escherichia coli* có khả năng phát hiện từ 10 - 50 CFU/ml máu người (số liệu chưa công bố). Đối chiếu với kết quả nuôi cấy, kết quả PCR đa môi có số trường hợp dương tính cao hơn ở mẫu nhiễm khuẩn vết mổ. Đặc biệt là PCR nhạy hơn so với phương pháp cấy máu.

Một phần khác không thể không nhắc tới trong nhiễm trùng bệnh viện là hiện tượng kháng kháng sinh ngày càng gia tăng và việc đòi hỏi phát triển công cụ giám sát và theo dõi là cần thiết. Tuy nhiên, với những trường hợp

đã điều trị kháng sinh thì việc nuôi cấy sẽ gặp khó khăn, thậm chí việc nuôi cấy sẽ thất bại thì việc xác định tính kháng của mầm bệnh là điều không thể. Do vậy trong thử nghiệm này chúng tôi đề xuất phương pháp PCR đa môi sàng lọc các gen mã hóa cho enzyme betalactamase với khả năng thủy phân dược chất betalactam ở các mức độ khác nhau và hoạt tính carbapenemase. Chúng tôi đã tối ưu hóa phản ứng PCR đa môi hướng đích phát hiện các kiểu gen Vietnam - specific ESBL như VEB<sup>[11]</sup>, họ gen *bla*CTX - M - 15, *bla*CTX - M - 27<sup>[12]</sup> hoặc họ gen ESBL khác như NDM - 1, OXA48, GIM - 1. Kết quả của chúng tôi cho thấy rằng, mặc dù không có kết quả nuôi cấy phân lập của các mẫu NKSM28, NKSM54 (bảng 4) nhưng bằng PCR đa môi chúng tôi vẫn có thể xác định được mầm bệnh có trong các mẫu này và sàng lọc được các gen mã hóa cho các enzyme betalactamase như (NDM - 1, SHV, CTX - M, GIM - 1, VEB, OXA - 58 trong mẫu bệnh NKSM28, hoặc SHV trong NKSM54, bảng 4).

Mặc dù kỹ thuật PCR có độ nhạy cao và có thể xác định tác nhân vi sinh vật gây nhiễm khuẩn vết mổ, chúng ta vẫn chưa thể bỏ qua phương pháp cấy khuẩn truyền thống. Thêm vào đó phản ứng PCR không thể cho phổ toàn diện các vi sinh vật gây bệnh cũng như tính chất kháng kháng sinh của vi khuẩn. Vì thế cả hai phương pháp nên được sử dụng theo cách bổ trợ cho nhau.

## KẾT LUẬN

- Sử dụng phương pháp PCR đa mồi đã tối ưu làm

tăng khả năng chẩn đoán các tác nhân gây bệnh trong các trường hợp nhiễm khuẩn vết mổ SSI so với phương pháp nuôi cấy truyền thống.

- Sử dụng PCR đa mồi có thể nhanh chóng đưa ra kết quả về các kiểu gen mã hóa enzyme betalactamase sinh tính kháng betalactam của vi khuẩn.

- Nghiên cứu lần đầu tiên phát hiện được kiểu gen Turkey - specific ESBL (PER - 1) bag hai họ gen (*Oxa23* và *Oxa58*) tại Việt Nam.

---

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Owens, C.D. and K. Stoessel, Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *J Hosp Infect*, 2008. 70 Suppl 2: p. 3 - 10.
2. Qadan, M. and W.G. Cheadle, Common microbial pathogens in surgical practice. *Surg Clin North Am*, 2009. 89(2): p. 295 - 310, vii.
3. Mancini, N., et al., The era of molecular and other non - culture - based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev*, 2010. 23(1): p. 235 - 51.
4. Cao, V., et al., Distribution of extended - spectrum beta - lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(12): p. 3739 - 43.
5. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel, Global spread of Carbapenemase - producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*, 2011. 17(10): p. 1791 - 8.
6. Jacoby, G.A. and L.S. Munoz - Price, The new beta - lactamases. *N Engl J Med*, 2005. 352(4): p. 380 - 91.
7. Nguyen, D., et al., Incidence and predictors of surgical - site infections in Vietnam. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2001. 22(8): p. 485 - 92.
8. Patrick R. Murray, E.J.B., Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H. Yolken, *Manual of Clinical Microbiology*. Washington. D.C. ASM Press, 1999.
9. Poirel, L., et al., Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011. 70(1): p. 119 - 23.
10. Ausubel, F.B., R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.G.; Smith, J.; Struhl, K., *Short Protocols in Molecular Biology* 3rd ed. 1995( ): p. page 2 - 3.
11. Naas, T., et al., Integron - located VEB - 1 extended - spectrum beta - lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. *J Antimicrob Chemother*, 2000. 46(5): p. 703 - 11.
12. Trang, N.H., et al., The characterization of ESBL genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infections in Vietnam. *J Infect Dev Ctries*, 2013. 7(12): p. 922 - 8.

**SIMPLE MULTIPLEX PCR ASSAYS TO DETEC COMMON PATHOGENS AND ASSOCIATED GENES ENCODING FOR ACQUIRED EXTENDED SPECTRUM BETALACTAMASES (ESBL) OR CARBAPENEMASES FROM SURGICAL SITE SPECIMENS IN VIETNAM**

**Summary**

Surgical site infection (SSI) is common in Vietnamese post - operative patients. It contributes to increased morbidity, mortality, hospitalization time and health care expenditure. Bacterial culture is considered the gold standard procedure to identify SSI pathogens and antibiotic resistant properties; However, it can detect microbes that can readily grow and is time - consuming. We propose optimized multiplex PCR assays to detect the most relevant microbes and associated genes encoding for acquired extended spectrum betalactamases (ESBL) or carbapenemases from Vietnamese patients with SSI in a hospital setting in Hanoi. Methods: Ninety one samples

from patients (n = 91) were collected in order to identify microbial pathogens and associated genes encoding for acquired extended spectrum betalactamases (ESBL) or carbapenemases by both conventional bacterial culture and in-house multiplex PCR assays. Results and Conclusions: The novel in - house multiplex PCR assays were comparable to the bacterial culture approach in screening for common pathogens causing SSI and for relevant genotypes conferring betalactam/carbapenem resistance for bacteria. This is the first report of Turkey - specific ESBL gene (PER - 1) and two Oxacilinase families (Oxa23 and Oxa 58) in Vietnam.

**Key words:** Multiplex PCR, surgical site infection (SSI), ESBL, carbapenem.