

## GIÁ TRỊ CỦA PCR ĐA MÔI TRONG CHẨN ĐOÁN CĂN NGUYÊN VIÊM MÀNG NÃO NHIỄM KHUẨN TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG

Mai Trần Hạnh Linh<sup>1</sup>, Phùng Thị Bích Thủy<sup>2</sup>,  
Vũ Thị Minh Phượng<sup>2</sup>, Phạm Nhật An<sup>1</sup>

1. Trường Đại học Y Hà Nội, 2. Bệnh viện Nhi Trung ương.

### TÓM TẮT

**Mục tiêu nghiên cứu:** Xác định giá trị của phương pháp sinh học phân tử real-time PCR đa môi trong chẩn đoán vi khuẩn gây viêm màng não tại Bệnh viện Nhi trung ương. **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang, 98 trẻ trên 1 tháng tuổi được chẩn đoán viêm màng não nhiễm khuẩn điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 01/2019 đến tháng 12/2019, được chọc dịch não để nuôi cấy và xét nghiệm real-time PCR đa môi tìm căn nguyên. **Kết quả:** Real-time PCR đa môi đã xác định được căn nguyên cho 45,9% trường hợp, trong khi phương pháp cấy dịch não tủy chỉ xác định được 21,4% trường hợp. Các vi khuẩn gây viêm màng não thường gặp nhất là *Streptococcus pneumoniae* (27,6%), tiếp theo là *Escherichia coli* (8,2%), *Group B Streptococcus* (7,1%), *Haemophilus influenzae* (3,1%) và *Neisseria meningitidis* (0,9%). **Kết luận:** Phương pháp real-time PCR đa môi có độ nhạy cao hơn, đồng thời rút ngắn thời gian xác định căn nguyên viêm màng não nhiễm khuẩn hơn so với phương pháp nuôi cấy dịch não tủy.

### ABSTRACT

#### VALIDATION OF MULTIPLEX REAL-TIME PCR FOR FINDING THE PATHOGEN OF BACTERIAL MENINGITIS IN VIETNAM NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL

**Aims:** To determine the value of multiplex real-time PCR in diagnosis pathogens of bacterial meningitis at Vietnam National Children's Hospital. **Methods:** Descriptive cross-sectional study. 98 children from one month old, suspected bacterial meningitis at Vietnam National Children's Hospital, from January 2019 to December 2019 were done CSF culture and multiplex real-time PCR for detecting pathogenic bacteria. **Results:** Multiplex real-time PCR detected pathogenic bacteria for 45.9% of patients, while cerebrospinal fluid by cultures technic was detected only 21.4%. The most common causal bacteria was *Streptococcus pneumoniae* (27.6%), followed by *Escherichia coli* (8.2%), and *Group B Streptococcus* (7.1%), *Haemophilus influenzae* (3.1%), *Neisseria meningitidis* (0.9%). **Conclusion:** Multiplex real-time PCR has a higher sensitivity and shortens the time to confirm pathogen in comparing to CSF culture in suspected bacterial meningitis children.

**Từ khóa:** Viêm màng não nhiễm khuẩn, PCR đa môi, trẻ em.

Nhận bài: 20-5-2020; Chấp nhận: 15-6-2020

Người chịu trách nhiệm chính: Phùng Thị Bích Thủy

Địa chỉ: Bệnh viện Nhi Trung ương. Email: thuyphung.nhp@gmail.com

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm màng não nhiễm khuẩn (VMNNK) là một trong các bệnh nhiễm trùng trẻ em khá thường gặp, diễn biến nặng, nguy hiểm, đòi hỏi chẩn đoán và điều trị kịp thời. Tỷ lệ tử vong của viêm màng não do vi khuẩn không được điều trị là 100%. Tiên lượng của bệnh phụ thuộc vào thể bệnh, căn nguyên gây bệnh và đặc biệt là thời gian chẩn đoán sớm hay muộn... [1].

Hiện nay, bên cạnh nhuộm soi, nuôi cấy dịch não tủy là kỹ thuật phổ biến, tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán và xác định vi khuẩn gây bệnh; kỹ thuật sinh học phân tử real-time PCR đa mục đích đã được ứng dụng trong chẩn đoán sớm các tác nhân gây nhiễm trùng thần kinh ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương, có thể phát hiện 6 căn nguyên gây viêm màng não nhiễm khuẩn thường gặp nhất ở trẻ em là: Escherichia coli K1 (E. coli K1), Group B Streptococcus (GBS), Haemophilus influenzae (HI), Listeria monocytogenes (LM), Neisseria meningitidis (NM) và Streptococcus pneumoniae (SP). Hơn nữa, khác với real-time PCR thông thường chỉ đọc tín hiệu tại bước nhiệt độ gắn mỗi, công nghệ định lượng đa đích MuDT (Multiple Detection Temperatures) đọc tín hiệu tại cả hai nhiệt độ gắn mỗi và kéo dài, cho phép phát hiện hai đích trong cùng một kênh màu giúp đưa ra các kết quả định lượng chính xác mà không cần bước phân tích đường cong nóng chảy, giúp rút ngắn thời gian tiến hành tương tự như một phản ứng real-time PCR thông thường. Vì vậy nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu: *Xác định giá trị của xét nghiệm PCR đa mục đích trong chẩn đoán căn nguyên VMNNK tại Bệnh viện Nhi Trung ương.*

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng

#### *Tiêu chuẩn lựa chọn*

- Bệnh nhân từ 1 tháng tuổi trở lên, được chẩn đoán VMNNK theo tiêu chuẩn ca bệnh của Bệnh viện Nhi Trung ương (2012) [2]:

+ Triệu chứng lâm sàng phù hợp và dịch não tủy thay đổi (trên 100 BC/mm<sup>3</sup> hoặc glucose dưới 0,4g/L hoặc protein trên 1g/L).

+ Cây máu có vi khuẩn và triệu chứng lâm sàng phù hợp và dịch não tủy biến đổi (trên 10 BC/mm<sup>3</sup> hoặc glucose < 0,45mmol/L hoặc protein > 1g/L).

- Xác định căn nguyên gây bệnh bằng 2 xét nghiệm: Nuôi cấy định danh vi khuẩn và real-time PCR đa mục đích 6 vi khuẩn từ bệnh phẩm dịch não tủy.

*Tiêu chuẩn loại trừ:* Gia đình bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Trong kỹ thuật real-time PCR đa mục đích, tách chiết vật chất di truyền theo kit MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, thực hiện trên hệ thống tự động của Roche. Sau đó phản ứng real-time PCR đa mục đích thực hiện trên kit Allplex Meningitis-B Assay (Seegen-Hàn Quốc).

**2.3. Phân tích số liệu:** Số liệu thu thập được làm sạch, mã hoá và xử lý trên máy tính, sử dụng phần mềm SPSS 20.0. Xử lý số liệu theo các thuật toán thống kê y học.

**2.4. Cỡ mẫu:** Mẫu thuận tiện, gồm tất cả bệnh nhân đáp ứng tiêu chuẩn.

**2.5. Địa điểm và thời gian:** Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm bệnh nhiệt đới - Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 01/2019 đến tháng 12/2019.

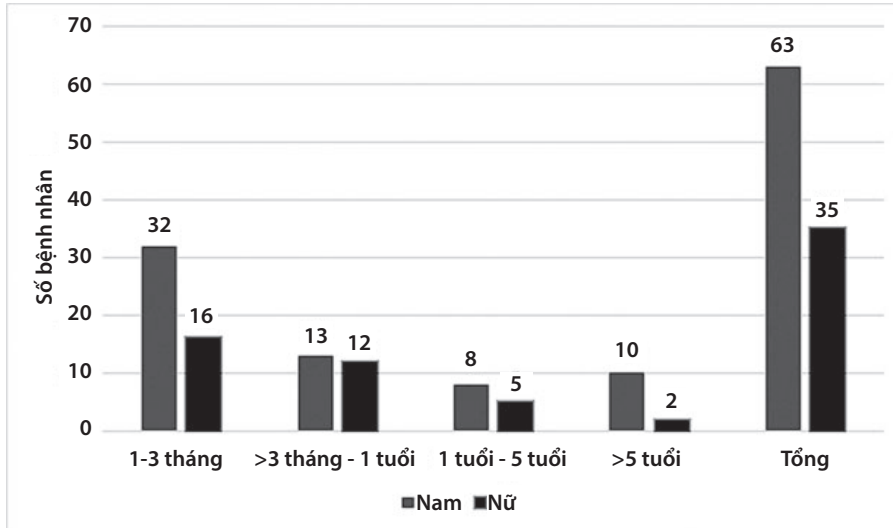
### 2.6. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu này không tiến hành can thiệp nào ngoài quy trình chẩn đoán và điều trị bệnh VMNNK theo quy chuẩn. Nghiên cứu không ảnh hưởng đến bất kỳ quyền lợi nào của người bệnh và cộng đồng.

- Việc tiến hành nghiên cứu được sự đồng ý của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y học của Bệnh viện Nhi Trung ương. Thông tin trong nghiên cứu trung thực, chính xác và được giữ bí mật, không sử dụng cho mục đích khác.

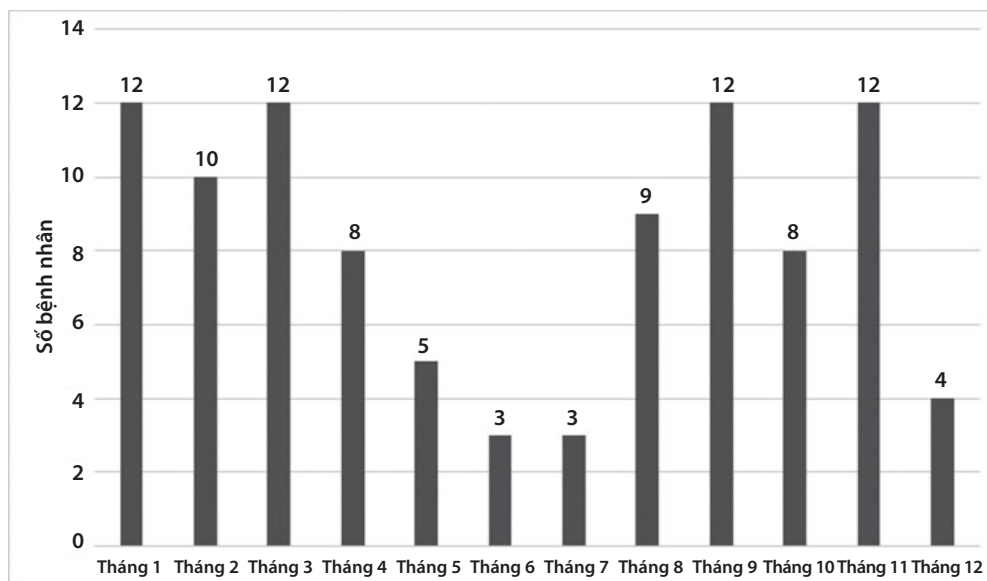
### 3. KẾT QUẢ

#### 3.1 Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu



**Biểu đồ 1. Phân nhóm bệnh nhân theo tuổi và giới (N=98)**

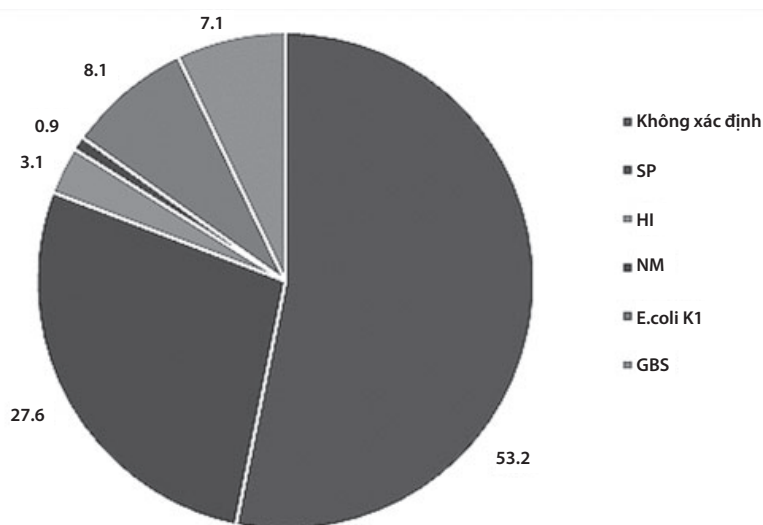
Nhóm tuổi từ 1-3 tháng chiếm phần lớn (49,0%), tiếp theo là nhóm trên 3 tháng đến 1 tuổi chiếm 25,5%. Tỷ lệ nam nhiều hơn nữ ở tất cả các nhóm tuổi.



**Biểu đồ 2. Phân nhóm bệnh nhân theo thời gian nhập viện trong năm (N=98)**

Tỷ lệ bệnh nhân viêm màng não nhiễm khuẩn nhập viện cao nhất ở hai giai đoạn, từ tháng 1 đến tháng 3 và tháng 9 đến tháng 11.

3.2. Giá trị của PCR đa môi trường trong chẩn đoán căn nguyên VMNNK



Biểu đồ 3. Tỷ lệ căn nguyên vi khuẩn xác định được (N=98)

Kết quả có 47,1% trường hợp xác định được căn nguyên vi khuẩn, trong đó SP là căn nguyên hay gặp nhất chiếm 27,6% trong tổng số bệnh nhân và 58,7% trong các trường hợp xác định được căn nguyên, tiếp theo là E.coliK1 và GBS.

Bảng 1. Số ca bệnh theo từng căn nguyên xác định bằng nuôi cấy và PCR đa môi trường dịch não tủy (N=98)

Căn nguyên	Nuôi cấy (+)	PCR (+)	Tổng
SP	13	27	27
E.coli K1	5	8	8
GBS	2	7	7
HI	1	3	3
Não mô cầu	0	1	1
Tổng	21	46	46

PCR đa môi trường có tỷ lệ phát hiện tất cả các căn nguyên đều cao hơn nuôi cấy dịch não tủy, trong đó VMNNK do SP, chỉ có 48,1% xác định được bằng nuôi cấy, các trường hợp còn lại đều được xác định bằng PCR đa môi trường. Tương tự, VMNNK do E.coliK1 và GBS tỷ lệ phát hiện được bằng nuôi cấy lần lượt là 62,5% và 28,6%.

**Bảng 2. Mức độ phù hợp giữa kết quả PCR đa môi và nuôi cấy vi khuẩn dịch não tủy trong chẩn đoán VMNNK do SP, E.coliK1 và GBS**

SP	Nuôi cấy (+)	Nuôi cấy (-)	Tổng	Kappa
PCR +	13 (13,3)	14(14,2)	27 (27,6)	0,57
PCR -	0	71 (72,5)	71 (72,4)	
Tổng	13 (13,3)	85 (86,7)	98 (100,0)	
E.coliK1	Nuôi cấy (+)	Nuôi cấy (-)	Tổng	Kappa
PCR +	5 (5,1)	3 (3,1)	8 (8,2)	0,75
PCR -	0	90 (91,8)	90 (91,8)	
Tổng	5 (5,1)	93 (94,9)	98 (100,0)	
GBS	Nuôi cấy (+)	Nuôi cấy (-)	Tổng	Kappa
PCR +	2 (2,0)	5 (5,1)	7 (7,1)	0,43
PCR -	0	91 (92,9)	91 (92,9)	
Tổng	2 (2,0)	96 (98,0)	98 (100,0)	

Chỉ số Kappa trong đánh giá mức độ phù hợp giữa 2 phương pháp trong chẩn đoán căn nguyên sau khi đã loại bỏ vai trò của yếu tố ngẫu nhiên đều cho thấy mức độ phù hợp từ trung bình (0,4-0,6) đến tốt (0,61-0,8).

#### 4. BÀN LUẬN

Về đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu, bệnh nhân phần lớn ở nhóm tuổi từ 1-3 tháng chiếm 49%, sau đó giảm dần khi tuổi tăng dần, với 25,5% trẻ trên 1 tháng đến 1 tuổi và 25,5% trẻ trên 1 tuổi. Nam nhiều hơn nữ ở tất cả các nhóm tuổi, với tỷ lệ nam/nữ chung là 1,8/1. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Phạm Nhật An và cộng sự năm 2011 trên 70 bệnh nhân VMNNK với 78,5% bệnh nhân dưới 2 tuổi và tỷ lệ nam/nữ là 1,3, và nghiên cứu của Đỗ Thiện Hải năm 2017 với 66,4% bệnh nhân từ 1 tháng đến 1 tuổi và nam/nữ là 1,6/1 [3][4].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, SP là căn nguyên hay gặp nhất chiếm 27,6% trong tổng số bệnh nhân và 58,7% trong các trường hợp

xác định được căn nguyên, sau đó đến E.coliK1 và GBS chiếm lần lượt là 17,4% và 15,2% trong số các căn nguyên, không phát hiện LM. Tỷ lệ này khá tương đồng với kết quả của Đỗ Thiện Hải và cộng sự nghiên cứu từ năm 2015-2016 về viêm màng não nhiễm khuẩn cũng cho thấy SP là căn nguyên hay gặp nhất (73,6%) sau đó đến E.coliK1 (9,6%), HI (5,6%), không phát hiện trường hợp nào VMNNK do GBS [4]. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ viêm màng não do E.coliK1 cao hơn, và phát hiện một tỷ lệ đáng kể các trường hợp GBS gây viêm màng não, trong đó có chỉ 2/7 (28,6%) trường hợp nuôi cấy dương tính, các trường hợp còn lại phát hiện bằng PCR đa môi. Trong một nghiên cứu sử dụng PCR đa môi chẩn đoán căn nguyên VMNNK của R.C.Albuquerque và cộng sự, SP chiếm tỷ lệ nhiều nhất trong các

căn nguyên xác định được (40%), sau đó đến não mô cầu (35%). Chỉ có 1 trường hợp bệnh do GBS, không phát hiện E.coli, LM và HI phản ánh sự khác biệt về căn nguyên viêm màng não theo dịch tễ từng khu vực trong đó châu Phi được coi là vùng bệnh dịch tễ của viêm màng não do não mô cầu [5].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ phát hiện vi khuẩn gây viêm màng não là 45,9% khi sử dụng PCR đa môi trường khi tỷ lệ phát hiện bằng phương pháp cấy dịch não tủy truyền thống là 21,4%. Trong số bệnh nhân VMNNK do SP, 48,1% xác định được bằng nuôi cấy, các trường hợp còn lại đều được xác định bằng PCR đa môi. Tương tự, VMNNK do E.coliK1 và GBS tỷ lệ phát hiện được bằng nuôi cấy lần lượt là 62,5% và 28,6%; các trường hợp còn lại cũng đều được phát hiện bằng PCR đa môi. Điều này có thể do ảnh hưởng của việc sử dụng kháng sinh trước khi bệnh nhân được đến bệnh viện điều trị nên hầu hết các kết quả nuôi cấy là âm tính và không phát hiện được căn nguyên gây bệnh.

Chỉ số Kappa đánh giá mức độ phù hợp giữa 2 phương pháp chẩn đoán sau khi đã loại bỏ vai trò của yếu tố ngẫu nhiên đều cho thấy mức độ phù hợp trong chẩn đoán VMNNK do SP (0,57), GBS (0,43) ở mức trung bình (0,4-0,6) và E.coliK1 (0,75) ở mức tốt (0,61-0,8). Sự so sánh và đánh giá ban đầu về độ nhạy và khả năng chẩn đoán cũng như thời gian cho kết quả của kỹ thuật real-time PCR so với phương pháp cấy máu đã được công bố trong một vài nghiên cứu gần đây. Nghiên cứu của R.C.Albuquerque và cộng sự tại Brazil năm 2019 áp dụng kỹ thuật real-time PCR đa môi (phát hiện gen fbsA (*Streptococcus agalactiae*), lytA (*Streptococcus pneumoniae*), crtA (*Neisseria meningitidis*), p6 (*Haemophilus influenzae*) và 16S rRNA (một số vi khuẩn khác)) và phương pháp nuôi cấy thông thường trên 447 trường hợp nghi ngờ viêm màng não cho thấy tỷ lệ dương tính của PCR là 8,9% và của nuôi cấy là 6,0% [5]. Nghiên cứu xác định giá trị của kỹ thuật PCR đa môi trong chẩn đoán căn nguyên vi khuẩn gây viêm màng

não của S. M. Almeida và cộng sự năm 2019, sử dụng bộ kit do Seeplex (Seegene Inc., Seoul, Hàn Quốc), có khả năng phát hiện năm loài vi khuẩn gây viêm màng não, *S. pneumoniae* (gen gyrB), *H. enzae* (P6), *N. meningitidis* (ctrA), *S. agalactiae* (Cfb), *L. monocytogenes* (Hly) kết luận PCR đa môi có tính đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính và giá trị chẩn đoán cao với nhóm có thay đổi về tế bào và sinh hóa dịch não tủy của viêm màng não cấp nhưng nuôi cấy dịch não tủy âm tính [6]. Một nghiên cứu khác của So Youn Shin năm 2012 đánh giá bộ kit Seeplex Meningitis ACE Detection của Seegene (Hàn Quốc) - có thể phát hiện 12 mầm bệnh vi khuẩn và virus phổ biến nhất gây viêm màng não cấp ở người (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, Group B *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes*, HSV-1, HSV-2, virus *Varicella-zoster*, virus Epstein-Barr, *Cytomegalovirus*, HHV-6 và HEV) kết luận xét nghiệm có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trong xác định căn nguyên gây bệnh [7]. Nghiên cứu của Carolina năm 2018 so sánh kết quả của xét nghiệm PCR đa môi-sử dụng Biofire FilmArray™ Meningitis/Encephalitis panel (phát hiện 14 loại căn nguyên bao gồm vi khuẩn, virus và nấm) với phương pháp nuôi cấy dịch não tủy trong xác định căn nguyên gây nhiễm trùng thần kinh trung ương, cho kết quả 8/93 trường hợp xác định được mầm bệnh, trong đó 5/8 trường hợp là vi khuẩn và đều được phát hiện qua PCR, kết quả nuôi cấy âm tính; 5 ca bệnh này đều được thay đổi kháng sinh điều trị sau khi có kết quả PCR. [8]

## 5. KẾT LUẬN

Phương pháp realtime PCR đáp ứng được yêu cầu về thời gian, có kết quả nhanh, đồng thời cho kết quả chính xác với độ nhạy cao hơn so với kỹ thuật cấy dịch não tủy thông thường, tăng khả năng phát hiện được các tác nhân gây bệnh, là công cụ đắc lực trong chẩn đoán và điều trị bệnh VMNNK.

**LỜI CẢM ƠN**

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn bệnh nhi và gia đình trẻ đã tham gia, hợp tác tốt trong quá trình nghiên cứu. Xin cảm ơn Trung tâm Bệnh nhiệt đới và khoa Sinh học phân tử các bệnh truyền nhiễm Bệnh viện Nhi Trung ương đã tạo điều kiện thuận lợi để nhóm nghiên cứu có thể thu thập số liệu và hoàn thành nghiên cứu.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Sheldon L Kaplan (2018). Bacterial meningitis in children older than one month: Clinical features and diagnosis. Uptodate, <https://www.uptodate.com/contents/bacterial-meningitis-in-children-older-than-one-month-clinical-features-and-diagnosis/print>.
2. Bệnh viện Nhi Trung ương (2012). Viêm màng não mủ. Ban hành kèm theo quyết định số 1048 ngày 26/7/2012 của Giám đốc Bệnh viện Nhi Trung ương.
3. Trần Thị Thanh Nhàn, Phạm Nhật An (2011). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và một số yếu tố tiên lượng bệnh viêm màng não nhiễm khuẩn ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Luận văn Thạc sĩ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội.
4. Đỗ Thiện Hải, Trần Thanh Dương, Trần Minh Điển (2018). Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị bệnh viêm màng não do vi khuẩn ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương.
5. A. C. R. Moreno R. C. Albuquerque, S. R. Santos et al (2019). Multiplex-PCR for diagnosis of bacterial meningitis. Braz J Microbiol. 50(2): 435-443.
6. S. M. Almeida, C Siebra et al (2019). Validation of multiplex PCR for the diagnosis of acute bacterial meningitis in culture negative cerebrospinal fluid. Arq Neuropsiquiatr. 77(4): 224-231.
7. S Y Shin, K C Kwon, J W Park et al (2012). Evaluation of the Seeplex® Meningitis ACE Detection Kit for the Detection of 12 Common Bacterial and Viral Pathogens of Acute Meningitis. Ann Lab Med; 32:44-49.
8. Carolina G, Archana A, Rotem L et al (2018). Clinical Use of a Multiplex PCR Meningitis/Encephalitis Panel at an Urban Tertiary Care Center. Infectious Diseases Society of American. Volume 5, Issue 1, Page 135.