Vietnam Journal of Community Medicine, Vol 62, No 7 (2021) 83-90

# USE MULTIPLEX REALTIME PCR METHODS FOR RAPID DETECTION OF FIVE BACTERIAL PATHOGENS CAUSING NOSOCOMIAL INFECTION: *STAPHYLOCCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLATED FROM RESPIRATORY SAMPLES AT DUC GIANG AND THANH NHAN HOSPITAL – HANOI CITY, VIET NAM

Nguyen Thi Loan[2,3,*], Nguyen Trong Linh[1], Nguyen Minh Hien[4], La Thi Huyen[1,2]

[1]*Insitute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology - No. 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*
[2]*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology - No. 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*
[3]*Hoa Lu University - Xuan Thanh Street, Ninh Binh City, Vietnam*
[4]*Thanh Nhan Hospital - No. 42 Thanh Nhan, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam*

Received 21/07/2021
Revised 01/09/2021; Accepted 19/10/2021

**ABSTRACT**

**Purposes:** Using the multiplex realtime PCR assay to simultaneously detect five nosocomial pathogens: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetorbacter bauminnii* isolated from respiratory specimens.

**Objectives and Methods:** 47 respiratory specimens from patients were treated at Thanh Nhan and Duc Giang hospitals as nosocomial infection. The patient samples were divided into 2 parts, one part was used for culture test and the other part was performed by multiplex real-time PCR assay.

**Results:** 40/47 samples were positive (85.1%), the multiplex real-time PCR method can simultaneously detect 5 nosocomial pathogens from respiratory specimens, similarity coefficient with the culture method is 0.97 ($p<0.05$).

*Keywords:* Respiratory specimens, Multiplex real-time PCR, nosocomial infection, nosocomial pathogens.

*Corressponding author
Email address: ntloan@hluv.edu.vn
Phone number: (+84) 942 987 419
https://doi.org/10.52163/yhc.v62i7.214

# SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP MULTIPLEX REALTIME PCR NHẰM PHÁT HIỆN NHANH 5 VI KHUẨN GÂY NHIỄM KHUẨN BỆNH VIỆN *STAPHYLOCCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ACINETOBACTER BAUMANNII* TỪ BỆNH PHẨM HÔ HẤP TẠI BỆNH VIỆN ĐỨC GIANG VÀ THANH NHÀN - HÀ NỘI

Nguyễn Thị Loan[2,3,*], Nguyễn Trọng Linh[1], Nguyễn Minh Hiền[4], Lã Thị Huyền[1,2]

*[1]Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn Lâm KH&CN Việt Nam - Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*
*[2]Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam - Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*
*[3]Trường Đại Học Hoa Lư - Đường Xuân Thành, thành phố Ninh Bình, Việt Nam*
*[4]Bệnh viện Thanh Nhàn - Số 42 Thanh Nhàn, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam*

Ngày nhận bài: 21 tháng 07 năm 2021
Chỉnh sửa ngày: 01 tháng 09 năm 2021; Ngày duyệt đăng: 19 tháng 10 năm 2021

## TÓM TẮT

**Mục tiêu**: Sử dụng phương pháp multiplex realtime PCR để phát hiện đồng thời năm tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện là *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae, Acinetorbacter bauminnii* từ các mẫu bệnh phẩm hô hấp.

**Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 47 mẫu bệnh phẩm hô hấp từ bệnh nhân được chẩn đoán là nhiễm khuẩn bệnh viện được điều trị tại khoa Hồi sức tích cực của 2 Bệnh viện Thanh Nhàn và Đức Giang. Các mẫu bệnh phẩm được chia làm 2 phần, một phần làm xét nghiệm nuôi cấy, một phần được thực hiện kĩ thuật sinh học phân tử multiplex realtime PCR.

**Kết quả**: 40/47 mẫu bệnh phẩm dương tính với tác nhân gây bệnh (85,1%), phương pháp multiplex realtime PCR có thể phát hiện nhanh, chính xác đồng thời 5 tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện từ mẫu bệnh phẩm hô hấp, hệ số tương đồng với phương pháp nuôi cấy là 0,97 ($p<0,05$).

*Từ khoá:* Bệnh phẩm hô hấp, multiplex realtime PCR, nhiễm khuẩn bệnh viện, tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện.

*Tác giả liên hệ
Email: ntloan@hluv.edu.vn
Điện thoại: (+84) 942 987 419
https://doi.org/10.52163/yhc.v62i7.214

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, nhiễm khuẩn bệnh viện (Hospital Aquired Infections) (NKBV) là một trong những thách thức và mối quan tâm hàng đầu trong công tác chăm sóc sức khoẻ tại Việt Nam cũng như trên toàn thế giới. Theo ước tính của Trung tâm Phòng chống và kiểm soát bệnh châu Âu (2015-2016), tỷ lệ NKBV của khu vực là 6,3% trong đó các nhiễm khuẩn thường gặp nhất là nhiễm khuẩn hô hấp (41,8%), nhiễm khuẩn tiêu hoá (20,8%), nhiễm khuẩn tiết niệu (18,4%), tiếp đến là nhiễm khuẩn sau khi phẫu thuật, nhiễm khuẩn da và mô mềm và một số nhiễm khuẩn khác [1], [2].

Tại Mỹ (2015), tỷ lệ nhiễm khuẩn bệnh viện vào khoảng 3,2% (thấp hơn so với năm 2011 là 4%). Các nhiễm khuẩn phổ biến nhất là viêm phổi bệnh viện, nhiễm trùng đường tiêu hoá và nhiễm trùng tại chỗ phẫu thuật [3].

Ở Việt Nam, nghiên cứu của Đinh Vạn Trung (2016) tại Bệnh viên TW Quân đội 108 tỷ lệ nhiễm khuẩn bệnh viện là 3,86% trong đó nhiễm khuẩn vết mổ chiếm tỷ lệ cao nhất 37,25 % [4].

Theo Nguyễn Huy Ngọc ở Bệnh viện Đa khoa Phú Thọ (2016) có 5 loại NKBV thường gặp nhất trong khoa hồi sức tích cực trong đó viêm phổi bệnh viện chiếm tỷ lệ cao nhất 38%, nhiễm khuẩn huyết 14%, viêm màng não 14%, nhiễm khuẩn ổ bụng chiếm 14%, nhiễm khuẩn liên qua đến ống thông 11%. Các vi khuẩn gây NKBV chủ yếu là vi khuẩn Gram (-) 72%, Gram (+) 28%. Trong đó *Acinetobacter baumannii* 21,5%, *Pseudomonas aeruginosa* 14,45%, *Staphylococcus aureus* 14,4%, *Klebsiella pneumoniae* 7,1%, *E. coli* 7,1% [5].

Nuôi cấy vi sinh vật là một trong các tiêu chuẩn vàng để xác định tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện song phương pháp này còn nhiều hạn chế về thời gian và độ nhạy không cao. Để phát hiện sớm vi sinh vật gây nhiễm khuẩn trong cơ thể, các nghiên cứu gần đây đã đưa ra những định hướng mới đó là phát hiện DNA đặc hiệu của vi khuẩn. Việc phát hiện DNA của vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân được cho là một phương pháp có độ nhạy và chính xác cao, thời gian phát hiện ngắn, có ý nghĩa rất lớn trong chẩn đoán nhiễm khuẩn. Sử dụng bộ KIT multiplex realtime PCR để phát hiện nhanh *Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* từ bệnh phẩm hô hấp đồng thời đánh giá độ tương đồng của phương pháp multiplex realtime PCR với phương pháp nuôi cấy là mục tiêu của nghiên cứu này.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- 47 mẫu lâm sàng của bệnh nhân nghi nhiễm khuẩn bệnh viện do Bệnh viện Đức Giang và Bệnh viện Thanh Nhàn Hà Nội cung cấp.

**- Các thiết bị**: Tủ an toàn sinh học cấp 2, máy realtime PCR (ống chạy realtime PCR tương thích máy). Máy ly tâm (High speed microcentrifuge>12000rpn), Máy trộn (Vortex mixer), Máy đo OD, Box mix phản ứng. Micro pipettes (20 µl, 5 µl, 1 µl), bể ổn nhiệt.

**- Hóa chất***:* Bộ kit tách DNA QIAamp@ DNA Mini Kit của QIAgen bao gồm hóa chất tách chiết. Bộ kit multiplex realtime PCR gồm 15 test chứa đầy đủ các thành phần (6 cặp mồi, 6 mẫu dò, realtime master mix, các đối chứng dương) cho phản ứng multiplex realtime PCR với liều lượng xét nghiệm là 8 µl/mẫu.. Ngoài ra cung cấp thêm chứng dương (hỗn hợp 6 DNA plasmid); nước cất khử ion ($H_20$ free DNase), bổ sung đủ 10 µl/mẫu.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

*Phương pháp nuôi cấy, phâp lập*: Vi khuẩn được nuôi cấy, phân lập trên môi trường thạch: thạch máu Columbia, thạch chocolate, chai cấy ái khí của BioMerieux.

Quy trình nuôi cấy bệnh phẩm đường hô hấp được thực hiện theo quy trình thực hành vi sinh µµµcủa Bộ Y tế.

Định danh vi khuẩn: Dựa vào hình thể, tính chất sinh hoá (Sử dụng bộ định danh: Api 20E, Api 20NE, Api Stap) (Hãng BioMirieux).

*Phương pháp Multiplex realtime PCR* ***(theo hướng dẫn của nhà cung cấp bộ KIT)***

Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn bằng Kit QIAgen.

DNA của vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm hô hấp của bệnh nhân được tách theo chỉ dẫn của kit tách DNA tổng số của QIAgen: thu tế bào, bổ sung 180 đệm lysis chứa enzyme lysozyme 1mg/ml ủ ở 37$^o$ C trong vòng 30 phút và tiến hành tách chiết theo protocol của bộ kit thu lại DNA tổng số của vi khuẩn trong 50nước khử ion vô trùng.

Chương trình phản ứng real-time PCR**:** bước 1: biến tính 95$^0$C trong 3 phút; bước 2: chu trình lặp lại 40 chu kỳ (95$^0$C trong 15 giây, 60$^0$C trong 60 giây).

Thực hiện phản ứng realtime PCR

- Chuẩn bị các ống thích hợp

- Bổ sung 8 µl master mix 1 vào các ống 1 của từng mẫu

- Bổ sung 82 vào các ống 2 của từng mẫu

- Bổ sung DNA tách chiết từ bệnh phẩm

- Bổ sung nước để đủ thể tích 10

- Ống chứng âm 8µl master mix và 02 µl nước cất free DNA nase

- Ống chứng dương 8µl master mix và 01 µl hỗn hợp 6 plasmid

- Đặt các ống đã chuẩn bị vào máy và khởi động chương trình realtime PCR theo dõi tín hiệu huỳnh quang thu được.

Nhận biết kết quả:

- Chứng dương: mỗi ống chứng dương đều lên tín hiệu huỳnh quang với giá trị Ct khoảng 20

- Mẫu nhiễm dương tính: dựa trên các màu tương ứng xác định giá trị Ct của các vi khuẩn có trong mẫu.

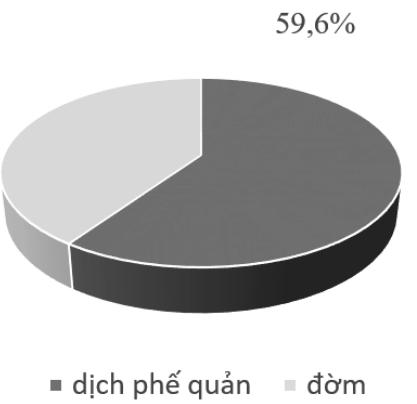
- Chứng âm (nước cất) không có tín hiệu huỳnh quang hoặc tín hiệu sau chu kỳ 35.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả thu thập các mẫu bệnh phẩm

Năm 2018, khi tiến hành thu thập mẫu bệnh phẩm tại 2 Bệnh viện Thanh Nhàn và Đức Giang để xác định các tác nhân vi sinh vật gây nhiễm khuẩn bệnh viện từ bệnh phẩm hô hấp chúng tôi thu được 47 mẫu bệnh phẩm trong đó có 28 mẫu dịch phế quản chiếm 59,6%, 19 mẫu đờm chiếm 40,4%.

***Hình 1. Tỷ lệ các mẫu của bệnh phẩm hô hấp***




Như vậy trong các mẫu bệnh phẩm hô hấp thì bệnh phẩm dịch phế quản chiếm tỷ lệ 59,6% còn bệnh phẩm đờm chiếm 40,4%.

### 3.2. Kết quả xác định các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện từ mẫu bệnh phẩm hô hấp bằng phương pháp nuôi cấy và phương pháp multiplex realtime PCR

47 mẫu bệnh phẩm hô hấp được chia làm 2 phần, một phần làm xét nghiệm nuôi cấy, 1 phần được thực hiện kĩ thuật sinh học phân tử multiplex realtime PCR. Các mẫu đã được mã hoá để tăng tính khách quan. Sau thời gian 7 ngày chúng tôi thu được kết quả như sau:

***Bảng 1. So sánh kết quả xác định vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện bằng phương pháp Multiplex realtime PCR với phương pháp nuôi cấy***

| STT | Mã NC | Loại bệnh phẩm | Kết quả Multiplex realtime PCR | Kết quả nuôi cấy |
|---|---|---|---|---|
| 1 | D1 | Dịch phế quản | *Klebsiella pneumonia* | *Klebsiella pneumonia* |
| 2 | D2 | Dịch phế quản | *Escherichia coli* | *Escherichia coli* |
| 3 | D3 | Dịch phế quản | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| 4 | D4 | Dịch phế quản | *Klebsiella pneumonia* | *Klebsiella pneumonia* |
| 5 | D5 | Dịch phế quản | *Pseudomonas aeruginosa* | *Pseudomonas aeruginosa* |
| 6 | D6 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 7 | D7 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 8 | D8 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 9 | D9 | Dịch phế quản | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| 10 | D10 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 11 | D11 | Dịch phế quản | *Pseudomonas aeruginosa* | *Pseudomonas aeruginosa* |
| 12 | D12 | Dịch phế quản | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| 13 | D13 | Dịch phế quản | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| **14** | **D14** | **Dịch phế quản** | Âm tính | ***Acinetobacter baumannii*** |
| 15 | D15 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 16 | D16 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 17 | D17 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 18 | D18 | Dịch phế quản | *Escherichia coli* | *Escherichia coli* |
| 19 | D19 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 20 | D20 | Dịch phế quản | *Escherichia coli* | *Escherichia coli* |
| 21 | D21 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 22 | D22 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 23 | D23 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 24 | D24 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 25 | D25 | Dịch phế quản | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| 26 | D26 | Dịch phế quản | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| 27 | D27 | Dịch phế quản | *Staphylococcus aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| 28 | D28 | Dịch phế quản | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 29 | Đờm 1 | Đờm | *Klebsiella pneumonia* | *Klebsiella pneumonia* |
| 30 | Đờm 2 | Đờm | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 31 | Đờm 3 | Đờm | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |

| STT | Mã NC | Loại bệnh phẩm | Kết quả Multiplex realtime PCR | Kết quả nuôi cấy |
|---|---|---|---|---|
| 32 | Đờm 4 | Đờm | *Pseudomonas aeruginosa* | *Pseudomonas aeruginosa* |
| **33** | Đờm 8 | Đờm | ***Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*** | ***Staphylococcus aureus*** |
| 34 | Đờm 9 | Đờm | *Klebsiella pneumonia* | *Klebsiella pneumonia* |
| 35 | Đờm 12 | Đờm | *Escherichia coli* | *Escherichia coli* |
| 36 | DG1 | Đờm 1 | Âm tính | Âm tính |
| 37 | DG2 | Đờm 2 | *Acinetobacter baumannii* | *Acinetobacter baumannii* |
| 38 | DG3 | Đờm 3 | *Acinetobacter baumannii* *Klebsiella pneumoniae* | *Acinetobacter baumannii* *Klebsiella pneumoniae* |
| 39 | DG4 | Đờm 4 | *Pseudomonas aeruginosa* | *Pseudomonas aeruginosa* |
| 40 | DG5 | Đờm 5 | *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonie* | *Acinetobacter baumannii* *Klebsiella pneumoniae* |
| 41 | DG6 | Đờm 6 | Âm tính | Âm tính |
| 42 | DG7 | Đờm 7 | Âm tính | Âm tính |
| 43 | DG8 | Đờm 8 | Âm tính | Âm tính |
| 44 | DG9 | Đờm 9 | *Klebsiella pneumoniae* | *Klebsiella pneumoniae* |
| 45 | DG10 | Đờm 10 | Âm tính | Âm tính |
| 46 | DG11 | Đờm 11 | Âm tính | Âm tính |
| **47** | **DG12** | **Đờm 12** | ***Escherichia coli*** | **Âm tính** |

Từ bảng 1 cho thấy: Trong số 47 mẫu bệnh phẩm hô hấp được tiến hành nghiên cứu có 40/47 mẫu bệnh phẩm dương tính, có chứa tác nhân vi sinh vật gây nhiễm khuẩn bệnh viện chiếm tỉ lệ 85,1% còn 7/47 mẫu âm tính không chứa các tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên có sự khác nhau về các mẫu âm tính và dương tính khi sử dụng 2 phương pháp nuôi cấy và multiplex realtime PCR.

## 4. BÀN LUẬN

Qua 47 mẫu bệnh phẩm hô hấp thu được từ 2 Bệnh viện Thanh Nhàn và Đức Giang chúng tôi thấy tỷ lệ mẫu dương tính là 85,1%. Điều này cho thấy việc sử dụng 2 phương pháp phát hiện vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện của chúng tôi là hợp lý. Tuy nhiên với 2 phương pháp này vẫn có sự khác biệt về kết quả.

***Tỷ lệ các mẫu bệnh phẩm chứa tác nhân vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện***

Tiến hành định danh các tác nhân vi sinh vật gây nhiễm khuẩn bệnh viện bằng bộ định danh Api 20E, Api 20NE, Api Stap) (Hãng BioMirieux- Pháp) đồng thời sử dụng phương pháp multiplex realtime PCR chúng tôi nhận thấy tỷ lệ các mẫu dương tính có chứa số lượng các tác nhân vi khuẩn gây bệnh là khác nhau ở 2 phương pháp điều này được thể hiện ở bảng 3. Với phương pháp nuôi cấy, chúng tôi chỉ phát hiện được 2 mẫu bệnh phẩm là DG3 và DG5 chứa đồng thời 2 tác nhân gây bệnh là *Acinetobacter baumannii và Klebsiella pneumoniae* trong khi đó với phương pháp multiplex realtime PCR phát hiện thêm được mẫu bệnh phẩm Đ8 cũng chứa 2 tác nhân gây bệnh là Staphylococcus aureus và *Acinetobacter baumannii.* Điều đó thể hiện tính ưu việt của bộ KIT maultiplex realtime PCR.

***Bảng 2. Tỷ lệ các mẫu chứa vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện***

| Mẫu / Tỷ lệ | Mẫu chứa 1 tác nhân gây bệnh | | Mẫu chứa 2 tác nhân gây bệnh | | Tổng |
|---|---|---|---|---|---|
| | Nuôi cấy | Multiplex realtime PCR | Nuôi cấy | Multiplex realtime PCR | |
| n | 38 | 39 | 2 | 1 | 40 |
| % | 95 | 97,5 | 5 | 2,5 | 100 |

***Tỷ lệ các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện từ mẫu bệnh phẩm hô hấp***

Dữ liệu ở bảng 1 cho thấy trong 47 mẫu bệnh phẩm thu được bằng phương pháp nuôi cấy và phương pháp multiplex realtime PCR xác định được 40/47 mẫu dương tính (85,1%), 7 mẫu âm tính. Kết quả xác định các vi khuẩn gây bệnh ở các mẫu dương tính là hoàn toàn giống nhau ở cả 2 phương pháp, ở mẫu đờm 8 khi sử dụng phương pháp multiplex real-time PCR phát hiện thêm so với phương pháp nuôi cấy sự xuất hiện vi khuẩn *Acinetobacter baumannii*, mẫu đờm 12 phương pháp multiplex realtime phát hiện được tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *Escherichia coli* trong khi nuôi cấy không phát hiện được. Điều này chứng tỏ phương pháp multiplex realtime PCR nhạy hơn có thể phát hiện được các vi khuẩn mà phương pháp nuôi cấy không phát hiện được. Tuy nhiên ở mẫu D14 phương pháp nuôi cấy phát hiện được tác nhân gây bệnh *Acinetobacter baumannii* trong khi đó phương pháp multiplex realtime PCR không phát hiện được. Điều này có thể giải thích do nồng độ vi khuẩn trong ống thí nghiệm chưa đủ lượng tối thiểu theo bộ Kit khuyến cáo là $10^4$.

***Bảng 3: Kết quả phát hiện loại vi sinh vật bằng phương pháp multiplex realtime PCR so với phương pháp cấy máu***

| Loại vi sinh vật | Multiplex realtime PCR (+) | Nuôi cấy vi sinh vật (+) |
|---|---|---|
| *Acinetobacter baumannii* | 19 | 19 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 7 | 7 |
| *Escherichia coli* | 5 | 4 |
| *Staphylococcus aureus* | 8 | 8 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 4 | 4 |
| Tổng | 43 | 42 |
| Kappa (ƙ) | 0.97 (p=0.05) | |

Bảng 3 cho thấy trong 40 mẫu dương tính có 43 tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện trong đó có 2 mẫu lên đồng thời 2 tác nhân ở cả phương pháp nuôi cấy và phương pháp multiplex realtime PCR (đờm 3 và đờm 5 của Bệnh viện Đức Giang), có 1 mẫu (đờm 8 của Bệnh viện Thanh Nhàn) phát hiện thêm 1 tác nhân so với phương pháp nuôi cấy, chỉ số tương đồng của 2 phương pháp để phát hiện 5 loại vi khuẩn 0,97($p<0.05$).

Kết quả nghiên cứu trong 47 mẫu vi sinh vật nuôi cấy trên các bệnh phẩm dịch phế quản, đờm, so sánh độ tương đồng của 2 phương pháp trên các mẫu bệnh phẩm là khá tốt (kappa: 0,97; $p<0,05$). Yang.Q và cộng sự cũng đã ứng dụng phương pháp multiplex realtime PCR phát hiện *Acinetobacter baumannii* và *Acinetobacter spp* có độ nhạy và độ đặc hiệu 100% trên các mẫu đờm [6]. Wang HY cũng cho thấy sử dụng phương pháp realtime PCR phát hiện *Staphylococcus aerus* trong máu có độ nhạy, độ đặc hiệu là 99,5% và 100%, sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử thời gian xét nghiệm chỉ mất 3 giờ trong khi bằng phương nuôi cấy mất 48-72 giờ [7].

## 5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 47 mẫu bệnh phẩm hô hấp thu được từ Bệnh viện Thanh Nhàn và Đức Giang chúng tôi có những kết luận sau:

1. Sử dụng phương pháp multiplex realtime PCR để phát hiện nhanh và đồng thời 5 tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Acinetorbacter bauminni và Klebsiella pneumoniae* với tỷ lệ 85,1% mẫu dương tính.

2. Độ tương đồng của 2 phương pháp nuôi cấy và multiplex realtime PCR để phát hiện 5 đồng thời tác nhân thường gặp gây nhiễm khuẩn bệnh viện từ bệnh phẩm hô hấp là 0,97 (p< 0,05).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] European Centrer for Disease Prevention and Control, Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, 2017. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/publications/ Publications/ antimicrobial - resistance - europe - 2015.pdf

[2] European Centre of disease Prevention and Control, Health care- associated infections acquited in intensive care units. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm. ECDC, 2018.

[3] Shelley SM, Erin OL, Sarah JJ et al., Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. N Engl J Med; 2018, 379:1732 -1744. DOI: 10.1056/NEJMoa1801550.

[4] Trung DV, Research on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus and Escherichia coli at 108 Central Military Hospital from April to June 2016", Clinical Medicine 108, 2017; 5:157-161.

[5] Ngoc NH, Characteristics of bacteria causing nosocomial infections at the Intensive Care Unit of Phu Tho General Hospital in 2016", Vietnamese Medicine, 2017; 1:73-78.

[6] Yang Q, Rui Y, Two Multiplex Real-Time PCR Assays to Detect andDifferentiate Acinetobacter baumannii and Non- baumannii Acinetobacter spp. Carrying blaNDM, blaOXA-23-Like, blaOXA-40-Like, blaOXA-51-Like, and blaOXA-58-Like Genes. PLoS One, 11(7): p. e0158958, 201.

[7] Wang HY, Comparison of multiplex real-time PCR and PCR-reverse blot hybridization assay for the direct and rapid detection of bacteria and antibiotic resistance determinants in positive culture bottles. J Med Microbiol, 2016; 65(9): 962-74.