

So sánh các kỹ thuật định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh Whitmore

Hoàng Việt Hà¹, Bùi Nguyễn Hải Linh¹, Trần Thị Lệ Quyên¹, Phạm Thị Huyền¹, Hoàng Quang Trung¹, Trần Anh Đào¹, Nguyễn Vũ Trung¹ và Trịnh Thành Trung^{2*}

¹Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh

²Trên 3, sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Bệnh viện Đa khoa tỉnh Nghệ An

⁴Trường Đại học Y Hà Nội

Nyay nhận bài 19/2/2020, ngày chuyển phản biện 21/2/2020, ngày nhận phản biện 19/3/2020, ngày chấp nhận đăng 27/3/2020

Tóm tắt:

Burkholderia pseudomallei là một loại vi khuẩn sống trong đất, lây truyền và gây nhiễm melioidosis (hay còn gọi là bệnh Whitmore) cho người và nhiều loài động vật. Đặc điểm sinh học của *B. pseudomallei* là trực khuẩn Gram âm, oxydase dương, kháng tự nhiên với kháng sinh gentamicin (Gen) và colistin (Col) nhưng nhạy cảm với amoxicillin clavulanic acid (AmC). Để áp dụng đặc trưng điển hình này trong định danh các chủng *B. pseudomallei* phân lập từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng, các tác giả đã tiến hành nghiên cứu 169 chủng trực khuẩn Gram âm, oxydase dương phân lập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh từ tháng 7/2018 đến 12/2018. Kết quả định danh bằng real-time PCR đặc hiệu gene 16S rDNA, giải trình tự gene *recA* và 16S rRNA bằng định 17 chủng là *B. pseudomallei*. 17 chủng này đều đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh với đường kính (r) kháng Gen (r = 6 mm), kháng Col (r = 6 mm) và nhạy AmC (18 mm < r < 26 mm). Độ chính xác của phương pháp định danh *B. pseudomallei* bằng 3 khoảng kháng sinh này là 100%, trong khi đó độ chính xác của phương pháp sinh hóa API 20NE và Vitek 2 lần lượt là 76,4% (13/17) và 29,4% (5/17). 5 chủng vi khuẩn *Cupriavidus malaysiensis* cũng kháng Gen và Col nhưng đường kính vòng nhạy cảm AmC là khoảng 42-43 mm. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, phương pháp định danh *B. pseudomallei* bằng 3 khoảng kháng sinh có độ chính xác cao và có thể triển khai tại nhiều phòng xét nghiệm vi sinh ở Việt Nam nhằm hạn chế việc định danh sai vi khuẩn *B. pseudomallei* và bỏ sót xét nghiệm ca nhiễm melioidosis.

Từ khóa: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, Whitmore, 3 khoảng kháng sinh.

Chí số phân loại: 3.1

Bài văn đề

Burkholderia pseudomallei là một loài vi khuẩn sống hoại sinh trong đất và trong nước ở các vùng nhiệt đới, đặc biệt là ở Đông Nam Á và vùng phía Bắc Australia [1]. *B. pseudomallei* là căn nguyên gây nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore). Bệnh gặp cả trên người và nhiều loài động vật. Con đường lây truyền chính của bệnh là (i) qua tiếp xúc trực tiếp vết trầy xước da với đất hoặc nước nhiễm khuẩn; (ii) qua hít phải các hạt bụi hoặc hạt sỏi khi có chứa vi khuẩn; (iii) qua con đường tiêu hóa khi ăn đồ sống phải thực phẩm nhiễm khuẩn. Melioidosis gặp ở mọi lứa tuổi, trong đó độ tuổi >45 chiếm đa số. Bên cạnh các yếu tố nguy cơ như nghiện rượu, sử dụng corticoid dài ngày, bệnh phổi và thận mạn tính thì người bị tiêu đường thuộc nhóm đối tượng có nguy cơ nhiễm

bệnh cao nhất (gấp 13 lần) [2, 3]. Melioidosis là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm gây tử vong cao và tử vong nhanh trước 48 giờ nhập viện nếu bệnh nhân không được chẩn đoán sớm và điều trị kháng sinh kịp thời theo khuyến cáo [2]. Trong số các ca nhiễm melioidosis, hầu hết các bệnh nhân có biểu hiện nhiễm khuẩn huyết và viêm phổi, một nửa số bệnh nhân này có biểu hiện sốc nhiễm khuẩn và có thể tử vong trước 48 giờ nhập viện [4, 5]. Do khả năng lây truyền qua đường hô hấp cùng tính chất gây bệnh nguy hiểm, *B. pseudomallei* được Trung tâm Kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Mỹ (CDC) xếp vào nhóm các tác nhân có thể sử dụng làm vũ khí sinh học ở cấp độ nguy hiểm loại 1 (tier 1 select agent, <https://www.selectagents.gov/>).

Nhiều thập kỷ qua, Việt Nam được coi là nước nằm

Comparison of different identification methods for *B. pseudomallei* in the diagnosis of Whitmore's disease

Viet Ha Hoang¹, Nguyen Hai Linh Bui², Thi Le Quyen Tran³,
Thi Huyen Pham¹, Quang Trung Hoang¹, Anh Dao Tran¹,
Vu Trung Nguyen⁴ and Thanh Trung Trinh^{2*}

¹*Ha Tinh General Hospital*

²*Institute of Microbiology and Biotechnology,*

Vietnam National University, Hanoi

³*Nghe An General Hospital*

Hanoi Medical University

Received 19 February 2020; accepted 27 March 2020

Abstract:

Burkholderia pseudomallei is a soil-dwelling bacterium which can infect human and animals causing a fatal infectious disease of melioidosis (or Whitmore's disease). The biological characteristics of this bacterium are Gram-negative bacilli, oxidase-positive, naturally resistant to gentamicin (Gen) and colistin (Col) but sensitive to amoxicillin-clavulanic acid (AmC). To use these particular characteristics for the identification of *B. pseudomallei*, the authors investigated 169 oxidase-positive and Gram-negative bacilli strains isolated from clinical specimens at Ha Tinh General Hospital from July to December 2018. TTSS1 real-time PCR assay, *recA* and 16S rRNA gene sequence analyses confirmed 17 strains as *B. pseudomallei*. These 17 strains demonstrated the particular characteristics of three-antibiotic disc test with the diameter (r) Gen resistance ($r=6$ mm), Col resistance ($r=6$ mm) and AmC sensitivity ($18\text{ mm}<r<26$ mm). The identification accuracy of this method for *B. pseudomallei* was 100% while the accuracy of the two biochemistry methods API 20NE and Vitek 2 were 76.4% (13/17) and 29.4% (5/17), respectively. Five strains of *Cupriavidus malaysiensis* were also resistant to Gen and Col but sensitive to AmC with inhibition zone diameter of 42-43 mm. In comparison with the routine identification methods, the identification of *B. pseudomallei* from oxidase-positive and Gram-negative bacilli using three-antibiotic disc test was a reliable and accurate method and could be implemented in the medical microbiology laboratories in Vietnam to reduce and avoid the misdiagnosis of melioidosis.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, three-antibiotic disc test, Whitmore.

Classification number: 3.1

trong tâm điểm lưu hành của melioidosis ở cấp bảo động độ (cấp cao nhất) trên bản đồ dịch tễ học toàn cầu [1]. Tại Thái Lan, mỗi năm có khoảng hơn 4 000 ca melioidosis được phát hiện và số lượng tử vong là gần 2.000 ca [6]. Gần đây, số lượng ca bệnh phát hiện ở các nước láng giềng là Lào và Campuchia cũng tăng lên đáng kể [7, 8]. Mặc dù có sự tương đồng về địa lý, khí hậu và hình thức canh tác nông nghiệp như những nước trong khu vực nhưng số liệu dịch tễ học về tỷ lệ người dân Việt Nam bị nhiễm bệnh cũng như sự phân bố của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong các vùng đất canh tác nông nghiệp là gần như không có. Các lý do khiến dẫn cho sự thiếu vắng thông tin của bệnh này là (i) giáo trình dạy cho sinh viên y khoa tại các trường đại học chưa đề cập nhiều đến bệnh, (ii) sinh viên và các kỹ thuật viên không được thực hành xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn, và (iii) các thiết bị xét nghiệm thường quy thực hiện tại các bệnh viện như kỹ thuật định danh vi khuẩn sử dụng thanh thư API 20NE hoặc máy định danh vi khuẩn tự động Vitek 2, Phoenix và MicroScan WalkAway hoặc thậm chí máy định danh dựa trên kỹ thuật khối phổ protein MALDI-TOF thường tra sai kết quả định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* thành những loài vi khuẩn khác, dẫn đến chẩn đoán nhầm và bỏ sót ca bệnh [9]. Tất cả các nguyên nhân đó đã làm cho các bác sỹ lâm sàng cũng như các cán bộ xét nghiệm vi sinh tại các bệnh viện (đặc biệt là bệnh viện tuyến dưới) chưa thực sự đề ý và chưa có phản ứng nghi ngờ ca bệnh. Điều đó dẫn đến melioidosis đã trở thành căn bệnh bị lãng quên ở Việt Nam trong suốt nhiều thập kỷ qua [10].

B. pseudomallei là trực khuẩn Gram âm, oxidase dương, kháng tự nhiên với Gen và Col nhưng nhạy cảm với AmC [11]. Ngoài ra, *B. pseudomallei* còn có một số đặc tính khác như khuẩn lạc có ánh kim khi nhìn kính dưới đèn ánh sáng trắng hoặc tế bào có hình kim băng khi quan sát nhuộm soi Gram dưới kính hiển vi. Dựa trên những đặc tính sinh học đặc trưng này, thời gian vừa qua, chúng tôi đã tiến phong hướng dẫn nhiều bệnh viện triển khai kỹ thuật nuôi cấy định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* sử dụng 3 khoanh giấy kháng sinh Gen, Col và AmC [5]. Mặc dù phương pháp đơn giản này đã giúp nhiều bệnh viện tuyến dưới phát hiện ra ca nhiễm melioidosis nhưng độ chính xác của kỹ thuật định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng 3 khoanh giấy kháng sinh vẫn chưa được đánh giá và kiểm chứng rõ ràng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành so sánh kỹ thuật định danh 3 khoanh giấy kháng sinh với các kỹ thuật định danh thường quy khác là API 20NE và máy định danh tự động Vitek 2. Độ chính xác của các kỹ thuật được đánh giá dựa trên kết quả định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật real-time PCR gene TTSS1 đặc hiệu *B. pseudomallei* và kỹ thuật giải trình tự gene *recA* và 16S rRNA [12-14].

Bối trường và phương pháp

Chung và khuẩn nghiên cứu

Từ tháng 7/2018 đến 12/2018, chúng tôi tiến hành thu thập 169 chủng trực khuẩn Gram âm, oxy hóa đường phân lập được từ các loại mẫu bệnh phẩm máu (n=124) đốm (n=18), mũi (n=13) và tiêu (n=14) tại Khoa Vi sinh, Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh. Các chủng vi khuẩn được lưu giữ lạnh sâu trong môi trường Luria-Bertani chưa 20% glycerol ở -70°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp thử tính nhạy cảm kháng sinh

Từ ống lạnh sâu, vi khuẩn được nuôi cấy hoạt hóa qua đêm trên môi trường thạch máu Columbia chưa 5% máu cừu ở 37°C. Tính nhạy cảm kháng sinh được thử bằng phương pháp khuếch tán khoan giấy thấm bông. Các kháng sinh hướng dẫn của Viện Chuẩn thức lâm sàng và Thử nghiệm Mỹ (CLSI M02-A12). Theo đó, tế bào vi khuẩn hoạt hóa được hòa với dung dịch nước muối sinh lý NaCl 0,9% đạt đến giá trị 0,5 McFarland và được cấy tra đều trên môi trường thạch Mueller-Hilton bằng que tăm bông. Các kháng sinh kháng sinh (Mast Diagnostics, Anh) gồm Gen (10 µg), Col (10 µg) và AmC (20 µg) được lần lượt đặt lên bề mặt môi trường thạch. Đĩa thạch sau đó được nuôi cấy ở 37°C. Kích thước vòng nhạy cảm kháng sinh được đo sau 24 giờ nuôi cấy. Kết quả nhạy cảm kháng sinh của *B. pseudomallei* được phiên giải theo hướng dẫn của Hodgson và cs (2009) [11].

Định danh vi khuẩn bằng thanh thử API 20N

Phương pháp định danh này được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Theo đó, khuẩn lạc đã được hoạt hóa trên môi trường thạch máu được đưa bằng que cấy bông vào ống môi trường API NaCl 0,85% cho đạt mật độ 0,5 McFarland. Phần huyền phù vi khuẩn này được đưa vào các ống phản ứng trên thanh API 20N (Biomerieux, Pháp). Các ống phản ứng thử nghiệm lên men đường được phủ kín bằng khoáng dầu. Thanh API được ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, kết quả âm tính và dương tính do sự mất phản ứng sinh hóa được đọc theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Kết quả thử nghiệm được chuyển sang dạng số gồm 7 chữ số và được tra cứu trực tuyến trên website của nhà sản xuất <http://apiweb.biomerieux.com>.

Định danh vi khuẩn bằng máy tự động Vitek 2

Phương pháp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Theo đó, tế bào vi khuẩn được hòa vào nước muối NaCl 0,45% cho đạt mật độ 0,5 McFarland. Huyền phù tế bào vi khuẩn được chuyển vào ống GN định danh

vi khuẩn Gram âm và được đưa vào máy Vitek 2 Compact (Biomerieux, Mỹ). Các thông số của máy định danh được cài đặt theo chế độ chuẩn của hãng. Kết quả định danh được máy tra tự động sau 6 đến 24 giờ.

Định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng kỹ thuật real-time PCR đặc hiệu gene TTSS1

DNA tổng số của vi khuẩn được tách chiết bằng dung môi hữu cơ sử dụng chloroform: isoamyl alcohol. Sau khi kết tủa trong cồn lạnh, DNA được hòa vào đệm TE (10 mM Tris HCl 0,1 M Na₂EDTA) và lưu giữ ở -20°C. Nồng độ và mức độ tinh sạch của DNA được kiểm tra trên máy NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Tiếp theo, 1 µl DNA khuôn này được tra vào ống real-time PCR chứa 12,5 µl Maxima Probe qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Lithuania), 10 pmol mỗi chuỗi BpTT4176F (5'-CGTCTCTATACTGTCGAGCAATCG-3'), 10 pmol mỗi ngược BpTT4290R (5'-CGTGCACACCGGTCAGTATC-3'), 0,26 mM đầu dò BpTT4208P (5'-CCGGATCTGGATCACCCACTTTC-3'), 400 ng bovine serum albumin (BSA; ThermoFisher Scientific, Mỹ) và nước cho đến đủ 25 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được thực hiện ở 50°C trong 2 phút, 95°C trong 10 phút và 40 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây và 60°C trong 1 phút. Real-time PCR được thực hiện trên máy AriaMX Real-time PCR System (Agilent Technologies). Tín hiệu huỳnh quang được ghi nhận trên phần mềm Agilent AriaMX Software v1.5 và giá trị ngưỡng (threshold) được tính toán tự động sử dụng thuật toán baseline-corrected raw fluorescence. Real-time PCR dương tính được ghi nhận khi đường tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt giá trị ngưỡng.

Định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gene *recA*

Phản ứng PCR khuếch đại gene *recA* được tiến hành trong thể tích 25 µl phản ứng chứa 12,5 µl DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Lithuania), 1 µl DNA vi khuẩn đã tách chiết như đã mô tả ở trên, 10 pmol mỗi loại mỗi gồm BURI (5'-GATCGA(AG)AAGCAGTTC-GGCA-3') và BUR2 (5'-TTGCTCTTCCCTG (AG)CCGAT-3') và nước cho đến đủ 25 µl. Sau khi biến tính DNA ở 95°C trong 5 phút, phản ứng khuếch đại gene được thực hiện trong 40 chu trình, với mỗi chu trình nhiệt được cài đặt là 95°C trong 30 giây để biến tính tách mạch DNA, 60°C trong 30 giây để gắn mồi, 72°C trong 1 phút để khuếch đại gene. Cuối cùng, chu trình kết thúc ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di và kiểm tra trên gel agarose 1% có bổ sung chất phát huỳnh quang RedSafe (Intros Biotechnology, Hàn Quốc). Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng

kit Qiaquick của Hãng Qiagen. Với mỗi phản ứng giải trình tự, 10 ng sản phẩm PCR tinh sạch được đưa vào các phản ứng khuếch đại sử dụng kit BigDye[®] terminator v.3.1 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Applied Biosystem). Sau khi khuếch đại bằng mỗi mô tả như trên, trình tự DNA được đọc trên máy giải trình tự 3100 Avant Genetic Analyzer sử dụng POP-6 polymer. Sắc độ trình tự được kiểm tra và chỉnh sửa trên phần mềm Chromas lite 2.1. Trình tự của 2 mô tả được kết nối trên phần mềm Clone Manager (Clone Manager Professional Suite version 8). Mức độ tương đồng về trình tự gene *recA* của chủng nghiên cứu so với các chủng đã công bố trên ngân hàng gen được so sánh, sử dụng công cụ tra cứu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gene 16S rRNA

Phản ứng PCR khuếch đại gene 16S rRNA được tiến hành trong thể tích 25 μ l chứa 12,5 μ l DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Lithuania), 10 pmol mỗi loại mỗi 27F (5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3') và mỗi 1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCA GCC-3') và 1 μ l ADN vi khuẩn đã tách chiết như đã mô tả ở trên. Sau khi biến tính DNA ở 95°C trong 5 phút, phản ứng khuếch đại gene được thực hiện trong 35 chu trình, với mỗi chu trình nhiệt được cài đặt như sau: 95°C trong 30 giây để biến tính tách mạch ADN, 55°C trong 30 giây để gắn mỗi, 72°C trong 1 phút 45 giây để khuếch đại gene. Sản phẩm PCR với kích thước 1.499 bp được điện di và kiểm tra trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự như đã mô tả ở trên. Phản ứng giải trình tự được thực hiện với mỗi 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3') và mỗi 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Trình tự của 2 mô tả 518F và 800R được kết nối trên phần mềm Clone Manager (Clone Manager Professional Suite version 8). Mức độ tương đồng cao nhất về trình tự đoạn 16S rDNA của chủng nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố được tra cứu sử dụng công cụ 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net/>) cập nhật đến ngày 31/12/2019.

Kết quả

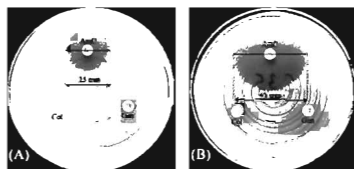
Đặc tính nhạy cảm với 3 khoan kháng sinh

169 chủng vi khuẩn được thử nghiệm tính nhạy cảm với 3 khoan kháng sinh. 22 chủng đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* là kháng Gen ($r=6$ mm) và Col ($r=6$ mm) nhưng nhạy cảm AmC ($r>18$ mm). Trong số này, 17 chủng có vòng nhạy cảm AmC trong khoảng đường kính 23-26 mm. 5 chủng có vòng nhạy cảm ở đường kính 42-43 mm. 147 chủng còn lại có các kiểu nhạy cảm khác nhau với 3 khoan kháng sinh thử nghiệm. Nhóm chủng

này được gọi chung là nhóm không đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoan kháng sinh.

Định danh nhóm đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoan kháng sinh

Kỹ thuật real-time PCR được triển khai trên 22 chủng đáp ứng tiêu chí. 17 chủng có phản ứng dương tính với gene TTSS1 đặc hiệu *B. pseudomallei*. Trình tự gene *recA* của 17 chủng này tương đồng 100% so với chủng chuẩn *B. pseudomallei* K96243¹. Các chủng này đều có đặc tính kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC với đường kính trong khoảng 23-26 mm (hình 1A) Định danh bằng kỹ thuật sinh hóa API 20NE cho kết quả 13 chủng là *B. pseudomallei* với ID từ 81,7 đến 99,9%. 4 chủng còn lại được định danh là *B. cepacia* với ID từ 77,5 đến 86,3%. Định danh bằng kỹ thuật Vitek 2 cho kết quả 5 chủng là *B. pseudomallei* với ID từ 94,0 đến 99,0%. Các chủng còn lại được định danh là *P. aeruginosa* (n=9), *B. cepacia* (n=2), *S. paucimobilis* (n=1) (bảng 1).



Hình 1. Đặc tính nhạy cảm 3 khoan kháng sinh của chủng kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC với vòng nhạy cảm trong khoảng 23-26 mm (A); kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC với vòng nhạy cảm trong khoảng 42-43 mm (B).

5 chủng còn lại có phản ứng real-time PCR gene TTSS1 âm tính. Trình tự gene *recA* của 2 trong 5 chủng này tương đồng thấp với chủng *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19425¹ là 95,1%. Vì cơ sở dữ liệu gene *recA* không đầy đủ trong hệ thống phân loại vi khuẩn nên chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gene 16S rRNA để định danh và trình tự gene của 5 chủng này đều giống nhau và đều có độ tương đồng là 99,95% so với chủng chuẩn *C. malaysiensis* USMAA1020¹. Các chủng này đều có đặc tính kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC ở đường kính trong khoảng 42-43 mm (hình 1B). Định danh bằng kỹ thuật sinh hóa API 20NE cho kết quả 5 chủng là *C. pauculus* với ID là 98,6%. Định danh bằng kỹ thuật Vitek 2 cho kết quả là *Francisella tularensis* (n=1), *Bordetella bronchiseptica* (n=2), *Moraxella* spp. (n=1) và *C. pauculus* (n=1) (bảng 1).

Bảng 1 Kết quả định danh các chủng đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh bằng kỹ thuật sinh hóa API 20NE và Vitek 2

STT	Chủng	API 20NE		Vitek 2		
		Mô profile	Tên loài	% ID	Tên loài	% ID
Nhóm kháng Gen vi Col nhưng nhạy cảm AmC đường kính 24-26 mm						
1	HT01	11565***	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>B. pseudomallei</i>	99,9
2	HT03	11565***	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>B. pseudomallei</i>	99,9
3	HT04	11565***	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>B. pseudomallei</i>	99,9
4	HT37	11565***	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>B. pseudomallei</i>	99,9
5	HT72	11565***	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>B. cepacia</i>	97,0
6	HT38	10565*6	<i>B. pseudomallei</i>	91,7	<i>B. pseudomallei</i>	93,0
7	HT40	10565**	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	93,0
8	HT61	10565**	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	93,0
9	HT63	10565*6	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. cepacia</i>	97,0
10	HT02	10565**	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	97,0
11	HT88	10565*6	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	97,0
12	HT162	10565**	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	94,0
13	HT168	10565*6	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	94,0
14	HT126	14465***	<i>B. cepacia</i>	78,3	<i>B. pseudomallei</i>	99,0
15	HT26	14465***	<i>B. cepacia</i>	77,5	<i>B. pseudomallei</i>	99,0
16	HT52	14465***	<i>B. cepacia</i>	77,5	<i>Sp.</i>	96,0
17	HT129	14465***	<i>B. cepacia</i>	77,5	<i>B. pseudomallei</i>	99,0
Nhóm kháng Gen vi Col nhưng nhạy cảm AmC đường kính 22-23 mm						
18	HT120	02044**	<i>C. parvulus</i>	99,6	<i>C. parvulus</i>	99,9
19	HT35	02044**	<i>C. parvulus</i>	99,6	<i>Bom. baetica</i>	97,0
20	HT85	02044**	<i>C. parvulus</i>	99,6	<i>Ba.</i>	97,0
21	HT121	02044**	<i>C. parvulus</i>	99,6	<i>Moraxella</i> spp.	96,0
22	HT152	02044**	<i>C. parvulus</i>	99,6	<i>C. parvulus</i>	98,0

Ghi chú: B=Burkholderia B=Borderella C=Cupriavidus F=Fransosella P=Pseudomonas Sp=Sphingomonas

Định danh nhóm vi khuẩn không đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh

Real-time PCR gene ITSS1 đều âm tính đối với tất cả 147 chủng không đáp ứng tiêu chí nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh của vi khuẩn *B. pseudomallei*. Điều đó một phần minh chứng các chủng vi khuẩn này không phải là *B. pseudomallei*. Để làm rõ hơn về thành phần loài vi khuẩn này, chúng tôi tiến hành cấy ria 3 pha trên môi trường thạch Ashdown không có kháng sinh Gen và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C. Sau 3 ngày, hình thái khuẩn lạc của các chủng được quan sát dựa vào màu sắc, kích thước, cấu trúc bề mặt, cấu trúc mềp khuẩn lạc và đặc tính nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh, chung

tôi chia các chủng này thành 20 nhóm khuẩn lạc khác nhau. Mỗi chủng đại diện trong mỗi nhóm khuẩn lạc đặc trưng này được lựa chọn để định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA. Các chủng đó được định danh vào 13 loài là *Cupriavidus misuavis*, *Aeromonas dhakensis*, *Acetivibrio taenialis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia territorii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzihabitus*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Ralstonia insidiosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis* và *Serratophomonas maltophilia* (bảng 2).

Bảng 2 Kết quả định danh các chủng không đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh bằng kỹ thuật giải trình tự gene 16S rRNA.

STT	Tên loài	Độ tương đồng (%)	Mã số trình tự được chia sẻ bằng Genbank	Số lượng (n=147)
1	<i>Cupriavidus misuavis</i>	100	HM148681.1 NC_20856	2
2	<i>Aeromonas dhakensis</i>	99,3	CBBI01000057 CP_107599 ¹	4
3	<i>Acetivibrio taenialis</i>	100	BBQ001000024 NC_23112 ¹	3
4	<i>Burkholderia multivorans</i>	99,7	U178101000276 BA_C24 ²	3
5	<i>Burkholderia territorii</i>	100	LAJ02598 MG_26165 ³	55
6	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99,8	U190955 F189	1
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	BM1101000316 JG_M5_0962	3
8	<i>Pseudomonas oryzihabitus</i>	100	BB101000012 NCBI_102199 ⁴	3
9	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100	BB101000030 NCBI_103162 ⁵	2
10	<i>Ralstonia insidiosa</i>	99,8	AF488790 AU2944 ⁶	3
11	<i>Vibrio cholerae</i>	99,5	X76937 CCCT514 ⁷	1
12	<i>Vibrio fluvialis</i>	100	BCZ801000036 NCBI_103150 ⁸	1
13	<i>Serratophomonas maltophilia</i>	99,9	JALX01000026 MGCC_834 ⁹	64

Ước định độ chính xác của các phương pháp định danh vi khuẩn *B. pseudomallei*

Kết quả nghiên cứu giải trình tự gene *recA*, 16S rRNA và real-time PCR gene ITSS1 đặc hiệu không định có 17 chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* trong bộ 169 chủng thực khuẩn Gram âm, oxydase dương thu thập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh từ 7/2018 đến 12/2018. Sử dụng kết quả định danh của các phương pháp sinh học phân tử đó để so sánh độ chính xác với các phương pháp sinh hóa khác cho thấy, phương pháp định danh bằng thành thử API 20NE và máy Vitek 2 có độ chính xác lần lượt là 76,4 (13/17) và 29,4% (5/17). Phương pháp định danh dựa trên tính chất nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh Gen (r=6 mm), Col (r=6 mm) và AmC (r=18 mm) nhận diện sai các chủng *C. malayensis* thành *B. pseudomallei*. Tuy nhiên, nếu đặt tiêu chuẩn mới về nhạy cảm 3 khoảng kháng sinh là Gen (r=6 mm), Col (r=6 mm) và AmC (18 mm-r=26 mm) thì độ chính xác của phương pháp 3 khoảng kháng sinh trong định danh *B. pseudomallei* từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng là 100% (17/17).

Bàn luận

Định danh chính xác căn nguyên vi khuẩn gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng không chỉ có ý nghĩa giúp cho bác sĩ định hướng điều trị đúng kháng sinh cho bệnh nhân mà còn giúp cho các nhà quản lý y tế nắm rõ sự tồn tại của một loại bệnh truyền nhiễm cụ thể nào đó tại địa phương cũng như hiểu rõ tính hình dịch tễ của bệnh tại địa phương. Mỗi vùng địa lý khác nhau có một mô hình bệnh tật khác nhau và có sự khác nhau về đặc điểm sinh học của mỗi căn nguyên vi khuẩn gây bệnh [15, 16]. Điều đó dẫn đến mỗi kỹ thuật định danh vi khuẩn dựa trên các tính chất sinh hóa đều có độ chính xác khác nhau ở các vùng địa lý khác nhau [9]. Vì vậy, các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại như PCR nhận biết gene đặc hiệu hoặc giải trình tự gene thường được coi là tiêu chuẩn vàng trong định danh vi sinh vật, làm giảm độ lệch về kết quả xét nghiệm ở các vùng địa lý. Tuy nhiên, kỹ thuật sinh học phân tử đòi hỏi sự đầu tư các trang thiết bị hiện đại cùng với đào tạo nguồn nhân lực. Đây cũng là sự hạn chế trong công tác triển khai các xét nghiệm kỹ thuật cao này ở các vùng kinh tế còn khó khăn, đặc biệt là các bệnh viện tuyến dưới ở Việt Nam. Trước tình hình đó, việc nghiên cứu triển khai các kỹ thuật đơn giản và đánh giá được độ chính xác của kỹ thuật là điều rất cần thiết nhằm giúp các bệnh viện tuyến dưới sớm tiếp cận và triển khai được phương pháp xét nghiệm bệnh, giảm thiểu bỏ sót ca bệnh.

Kỹ thuật giải trình tự ADN để định danh vi khuẩn đã được ứng dụng từ lâu trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh truyền nhiễm. Đối với các sinh vật nhân sơ (prokaryote), gene 16S rRNA là gene phổ dụng thường dùng trong phân loại và định danh các loài vi khuẩn. Payne và cs (2005) [12] đã minh chứng trình tự gene *recA* có khả năng phân tách tốt các loài trong chi *Burkholderia* hơn so với gene 16S rRNA. Cây phát sinh chủng loại xây dựng dựa trên trình tự gene *recA* phân tách rõ *B. pseudomallei* với các loài có quan hệ gần gũi như *B. mallei* và *B. thailandensis*. Vì vậy, trình tự gene *recA* đã được sử dụng phổ biến trong định danh kháng định vi khuẩn *B. pseudomallei* [4, 5, 17].

Giống như nhiều loài vi khuẩn Gram âm khác, *B. pseudomallei* có hệ thống tiết dạng 3 (type three secretion system) có tác dụng tiết các protein hiệu ứng để chống lại các tế bào miễn dịch của vật chủ trong quá trình gây bệnh. Nghiên cứu của Price và cs (2012) [18] trên bộ 2.205 chủng *Burkholderia* có 1.954 chủng *B. pseudomallei* cho thấy, real-time PCR gene TTSS1 có tính đặc hiệu tuyệt đối với *B. pseudomallei* và gene này chỉ có ở *B. pseudomallei* chứ không có ở các loài có quan hệ gần gũi như *B. mallei* và *B. thailandensis*. Kỹ thuật real-time PCR này đã được ứng dụng nhiều trong phát hiện định tính và định lượng *B.*

pseudomallei từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng và môi trường [5, 14, 19]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi minh chứng các chủng trực khuẩn Gram âm, oxydase dương không đạt ứng tiêu chí nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh đặc trưng của *B. pseudomallei* đều âm tính với real-time PCR gene TTSS1. Điều đó cho thấy, các chủng trực khuẩn này không phải là *B. pseudomallei*. Kết quả đó phù hợp với kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA (bảng 2).

Các kỹ thuật định danh dựa trên tính chất sinh hóa thường được sử dụng trong hệ thống xét nghiệm chẩn đoán vi sinh lâm sàng là API 20NE, Vitek 2, Phoenix và MicroScan WalkAway hoặc thậm chí máy định danh dựa trên kỹ thuật khối phổ protein MALDI-TOF. Tuy nhiên, các kỹ thuật này đã tỏ ra có nhiều nhược điểm khi sử dụng định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* [9]. Các kỹ thuật này thường trả kết quả định danh sai vi khuẩn *B. pseudomallei* thành những loài vi sinh vật khác như *B. cepacia*, *P. aeruginosa* và *P. fluorescens* với mức độ sai lệch kết quả phụ thuộc vào từng vùng địa lý khác nhau [20-22]. Đặc biệt, máy tự động Phoenix luôn luôn trả kết quả định danh sai vi khuẩn *B. pseudomallei* [9]. Trong nghiên cứu này, API 20NE cho kết quả định danh đúng *B. pseudomallei* là 76,4% (13/17), trong khi đó kết quả định danh đúng của Vitek 2 chỉ là 29,4% (5/17). Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu ở các vùng khác trên thế giới.

Vi khuẩn *B. pseudomallei* có đặc tính kháng tự nhiên với Col và nhóm kháng sinh aminoglycoside. Năm 2009, Hodgson và cs (2009) [11] nghiên cứu trên bộ 43 chủng có 30 chủng *B. pseudomallei* đã phát hiện tất cả các chủng *B. pseudomallei* đều nhạy cảm với AmC. Cùng với tính chất vi khuẩn học kinh điển của *B. pseudomallei* là trực khuẩn Gram âm và oxydase dương, các nhà khoa học đã đề xuất sử dụng các tính chất đơn giản đó để định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* ở những phòng xét nghiệm vi sinh có điều kiện trang thiết bị hạn chế. Năm 2018, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã trình bày trên tạp chí kỹ thuật 3 khoanh kháng sinh tới nhiều bệnh viện tuyến dưới tại Việt Nam. Song song với việc khẳng định kết quả định danh bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, nhóm chúng tôi đã giúp nhiều bệnh viện phát hiện ra những ca nhiễm melioidosis đầu tiên và giúp nhiều bệnh viện tuyến dưới làm chủ quy trình kỹ thuật phát hiện ra nhiều ca bệnh. Với nghiên cứu này, chúng tôi khẳng định kết quả định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng 3 khoanh kháng sinh có độ chính xác là 100%, tương đương với các kỹ thuật sinh học phân tử. Tiêu chí đánh giá đường kính nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh là Gen ($r=6$ mm), Col ($r=6$ mm) và AmC (18 mm \leq r \leq 26 mm). Vì vậy, kỹ thuật này hoàn toàn có thể sử dụng để xét nghiệm chẩn đoán và sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis tại các bệnh viện tuyến dưới ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

Các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* phân lập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh đều có đặc tính kháng Gen (r=6 mm), Col (r=6 mm) và nhạy cảm AmC (18 mm-r=26 mm) Định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng phương pháp 3 khoanh kháng sinh có độ chính xác là 100%^o, trong khi đó phương pháp định danh bằng thanh thử API 20NF và máy Vitek 2 có độ chính xác lần lượt là 76,4 và 29,4 % Phương pháp định danh *B. pseudomallei* bằng 3 khoanh kháng sinh có thể áp dụng trong xét nghiệm chẩn đoán kháng định nhiễm melioidosis.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện thông qua nhiệm vụ quỹ gene "Nghiên cứu khai thác nguồn gene vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* và đánh giá đặc tính sinh học nhằm nâng cao hiệu quả chẩn đoán, dự phòng và điều trị" (mã số NA QG-2018-08) do Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. Unmuthaisakul, et al. (2016). "Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis", *Sat. Microbiol.*, **10(1)**, Doi: 10.1038/nmic.2016.88

[2] W.J. Wiersinga, B.J. Currie, S.J. Peacock (2012). "Melioidosis", *N Engl J Med.*, **367(11)**, pp.1035-1044

[3] K. Hodgson, et al. (2015). "Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections", *Immunology.* **144(2)**, pp.171-185

[4] D.M. Phuong, et al. (2008). "Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam", *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **102** (Suppl. 1), pp.S30-36

[5] T.T. Trinh, et al. (2018a). "A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-poor areas: a study from north-central Vietnam", *Clin Microbiol Infect.* **24(1)**, pp.S4e1-S4e4

[6] S. Himjot, et al. (2018). "Melioidosis in Thailand: present and future", *Trop Med Infect Dis.* **3(2)**, Doi: 10.3390/tropicalmed3020038

[7] D.A.B. Dance, et al. (2018). "Melioidosis in the Lao People's Democratic Republic", *Trop Med Infect Dis.* **3(1)**, Doi: 10.3390/tropicalmed3010021

[8] S. Bory, et al. (2018). "A report from the Cambodia training event for awareness of Melioidosis (C-TI AM) - October 2017", *Trop Med Infect Dis.* **3(1)**, Doi: 10.3390/tropicalmed3010023

[9] A.R. Hoffmaster, et al. (2015). "Melioidosis diagnostic workshops 2013", *Emerg Infect Dis.* **21(2)**, Doi: 10.3201/eid2102.141045

[10] T.T. Trinh, et al. (2018-b). "Melioidosis in Vietnam: recently improved recognition but still an uncertain disease burden after almost a century of reporting", *Trop Med Infect Dis.* **3(2)**, Doi: 10.3390/tropicalmed3020039

[11] K. Hodgson et al. (2009). "Comparison of routine bench and molecular diagnostic methods in identification of *Burkholderia pseudomallei*", *J. Clin Microbiol.*, **47(5)**, pp.1578-1580.

[12] G.W. Payne, et al. (2005). "Development of a recA gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus", *Appl Environ Microbiol.* **71(7)**, pp.2917-2927.

[13] S.H. Yoon, et al. (2017). "Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies", *Int J Syst Evol Microbiol.*, **67(5)**, pp.1613-1617.

[14] T.T. Trinh, et al. (2011). "Highly sensitive direct detection and identification of *Burkholderia pseudomallei* bacteria in environmental soil samples by using real-time PCR", *Appl Environ Microbiol.*, **77(18)**, pp.6266-6294

[15] J. Deen, et al. (2012). "Community-acquired bacterial bloodstream infections in developing countries in south and southeast Asia: a systematic review", *Emerg Infect Dis.* **12(6)**, pp.480-487

[16] E.A. Reddy, A.V. Shaw, J.A. Crump (2010). "Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis", *Lancet Infect Dis.* **10(6)**, pp.417-432

[17] J.L. Guthrie, et al. (2015). "Identification of *Burkholderia pseudomallei* near-neighbor species in the Northern Territory of Australia", *PLoS Negl Trop Dis.* **9(6)**, Doi: 10.1371/journal.pntd.0003892.

[18] E.P. Price, et al. (2012). "Development and validation of *Burkholderia pseudomallei*-specific real-time PCR assays for clinical, environmental or forensic detection applications", *PLOS ONE*, **7(5)**, Doi: 10.1371/journal.pone.0037723

[19] J.M. Mcumann, et al. (2006). "Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis", *J Clin Microbiol.*, **44(8)**, pp.3028-3030

[20] Y. Podin, et al. (2013). "Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent", *J. Clin Microbiol.*, **51(9)**, pp.3076-3078

[21] P. Karasin, et al. (2007). "Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*", *Diagn Microbiol Infect Dis.* **59(3)**, pp.277-281.

[22] T.J. Inglis, et al. (2005). "Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*", *J. Clin Microbiol.*, **43(5)**, pp.2201-2206