

NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG BỘ KIT MTB-PCR ĐỂ CHẨN ĐOÁN LAO TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Bùi Đức Phú¹, Nguyễn Thị Nam Liên¹, Mai Văn Tuấn¹, Châu Thị Mỹ Dung¹,
Trương Diên Hải¹, Lê Thị Thanh Lan¹, Nguyễn Thị Tina¹, Phan Nữ Diệu Hồng¹

TÓM TẮT

Kỹ thuật khuếch đại chuỗi gen (PCR) được áp dụng để phát hiện vi khuẩn lao trên các đối tượng khác nhau.

Mục tiêu: Áp dụng và đánh giá bộ kit MTB PCR trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi lao tại Bệnh viện TW Huế.

Phương pháp nghiên cứu: Chúng tôi đã nghiên cứu các mẫu bệnh phẩm từ 100 bệnh nhân có chẩn đoán lao phổi và lao ngoài phổi đến khám và điều trị tại Bệnh viện Trung ương Huế. Các bệnh phẩm được thử nghiệm đồng thời 3 phương pháp: nhuộm Ziehl-Neelsen, nuôi cấy vi khuẩn lao và PCR phát hiện vi khuẩn lao.

Kết quả: Tỷ lệ phát hiện lao dương tính của các phương pháp lần lượt là 24%, 34% và 46% trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi lao.

Kết quả trên cho thấy thử nghiệm PCR nhạy hơn các phương pháp nhuộm và nuôi cấy để phát hiện vi khuẩn lao trong các mẫu bệnh phẩm.

Từ khóa: Bộ kit MTB PCR, lao, bệnh viện Trung ương Huế.

ABSTRACT

APPLICATION OF MTB-PCR FOR DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS AT HUE CENTRAL HOSPITAL

Bui Duc Phu¹, Nguyen Thi Nam Lien¹, Mai Van Tuan¹, Chau Thi My Dung¹,
Truong Dien Hai¹, Le Thi Thanh Lan¹, Nguyen Thi Tina¹, Phan Nu Dieu Hong¹

The PCR test has been developed for detection of *M. tuberculosis* on many patient groups.

Objective: Evaluation and application of MTB-PCR for diagnosis of tuberculosis at Hue central hospital

Methods: We studied the samples of 100 patients with the diagnostic of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis at Hue Central Hospital. The samples have been tested with 3 methods: Ziehl-Neelsen stain, culture and PCR.

The ratio of positive samples by PCR test was 46%, by culture was 34% and by Ziehl-Neelsen stain was 24%.

This result demonstrated that the PCR test is more sensitive than the culture technique for detection of *M. tuberculosis*.

Key words: MTB-PCR, tuberculosis, Hue central hospital

1. Bệnh viện TW Huế

- Ngày nhận bài (received): 18/3/2014; Ngày phản biện (revised): 17/7/2014
- Ngày đăng bài (Accepted): 20/6/2014
- Người phản biện: TS Trần Thừa Nguyên, PGS TS Phạm Như Hiệp
- Người phản hồi (Corresponding author): Mai Văn Tuấn
- Email: maituanbvh@yahoo.com.vn; ĐT: 0905138797

*** Các chữ viết tắt:**

- ADN: Acid deoxyribonucleic
- AFB: Acid fast bacilli (trực khuẩn kháng acid)
- AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome (Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải).
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Bệnh tật Hoa Kỳ).
- IUATLD: International Union against Tuberculosis and Lung (Hiệp hội chống lao và bệnh phổi thế giới).
- IVD: In-Vitro Diagnostic (chứng chỉ chuyên dụng cho chẩn đoán).
- MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
- PCR: Polymerase Chain Reaction (phản ứng khuếch đại chuỗi gen).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lao là một bệnh nhiễm khuẩn do *Mycobacterium tuberculosis* gây ra, đến nay vẫn thu hút sự quan tâm rất lớn của các nhà chuyên môn trên thế giới vì tỷ lệ mắc bệnh, tỷ lệ tử vong, di chứng và hậu quả về mặt kinh tế và xã hội kèm theo. Hàng năm trên thế giới có khoảng hơn 8 triệu người bị mắc bệnh lao mới và 1,9 triệu ca tử vong hàng năm, trong đó 95% trường hợp xảy ra ở các nước đang phát triển. Số lượng bệnh nhân chết do bệnh lao ở những nước này mỗi năm hơn 2 triệu người, chỉ đứng sau nguyên nhân bệnh AIDS (*). Việt Nam đứng thứ 12 trên 22 nước có số bệnh nhân lao cao trên toàn cầu, (WHO, 2012). Trong khu vực Tây - Thái Bình Dương, Việt Nam đứng thứ ba sau Trung Quốc và Philipinnes về số lượng bệnh nhân lao lưu hành cũng như bệnh nhân lao mới xuất hiện hàng năm. Năm 2011 ước tính có khoảng 286.500 người mắc lao mới, và khoảng 29.300 người chết vì bệnh lao [1], [7].

Việc kiểm soát bệnh lao phụ thuộc nhiều vào việc chẩn đoán nhanh và chính xác. Ở Việt Nam, các kỹ thuật truyền thống để chẩn đoán lao đã trở thành thường quy ở các phòng xét nghiệm, nhưng các phương pháp này hoặc độ nhạy và độ đặc hiệu chưa cao (nhuộm Ziehl-Neelsen), hoặc cần rất nhiều

thời gian để có kết quả (nuôi cấy). Cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, kỹ thuật PCR chẩn đoán lao đã được nghiên cứu, áp dụng đem lại hiệu quả cao trong chẩn đoán và điều trị bệnh lao [2], [3], [4], [5], [6].

Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: Áp dụng và đánh giá bộ kit MTB PCR sản xuất tại Học viện quân y trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi lao tại Bệnh viện TW Huế.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Bệnh nhân

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên 100 bệnh nhân có chẩn đoán ban đầu nghi ngờ lao phổi hay lao ngoài phổi đến khám và điều trị tại Bệnh viện TW Huế.

2.1.2. Bệnh phẩm

Tất cả các bệnh phẩm được thực hiện nhuộm Ziehl-Neelsen, nuôi cấy và PCR và được lấy theo yêu cầu:

- Đàm được lấy vào buổi sáng sớm sau khi bệnh nhân ngủ dậy.
- Dịch phế quản được lấy trong quá trình soi phế quản cho bệnh nhân.
- Các mẫu mủ và một số dịch khớp ... được lấy trong quá trình bác sĩ lâm sàng thao tác thủ thuật.
- Các bệnh phẩm khác đều được lấy theo nguyên tắc vô trùng.
- Không lấy chủng vi khuẩn phân lập được lần thứ hai của một bệnh nhân.

2.1.3. Kit MTB-PCR

Do Học viện Quân y cung cấp trong khuôn khổ của đề tài KC 10-15/06-10.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

+ Sử dụng phương pháp so sánh đối chứng kết quả của PCR với 2 phương pháp truyền thống là nhuộm Ziehl-Neelsen và nuôi cấy.

+ Mỗi mẫu bệnh phẩm sau thu thập được trộn đều chia 3, cho 3 phương pháp chẩn đoán: Nhuộm Ziehl-Neelsen – Nuôi cấy – PCR.

Bệnh viện Trung ương Huế

+ Thu thập số liệu về kết quả xét nghiệm từ 3 phương pháp độc lập, so sánh theo từng cặp:

- MTB-PCR với nuôi cấy
- MTB-PCR với nhuộm Zeihl-Neelsen

+ Lập bảng 2 x 2 cho từng cặp, tính độ nhạy, độ đặc hiệu của PCR theo nuôi cấy và tính chỉ số phù hợp Kappa của PCR với từng phương pháp trên.

2.2.2. Các kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu

* Kỹ thuật nhuộm Ziehl-Neelsen và soi bằng kính hiển vi

Bệnh phẩm được phết mỏng, cố định rồi nhuộm theo phương pháp Ziehl-Neelsen như CDC (*) khuyến cáo. Đọc kết quả theo hệ thống định lượng áp dụng phết lam tìm AFB nhuộm theo phương pháp Ziehl-Neelsen do IUATLD (*) khuyến cáo.

* Kỹ thuật nuôi cấy và định danh vi khuẩn lao

Thực hiện theo tài liệu Hướng dẫn quản lý bệnh lao, Bộ Y tế, chương trình chống lao quốc gia Việt Nam (2009). Gồm các bước sau:

a. Khử nhiễm và tập trung vi khuẩn:

- Thực hiện đối với các mẫu bệnh phẩm là đàm, dịch phế quản và các dịch khác ngoại trừ dịch não tủy. Riêng đối với các dịch có thể tích lớn hơn 3ml phải được quay ly tâm 10 phút với tốc độ 3000 x g/phút trước khi khử nhiễm và tập trung vi khuẩn.

- Dùng phương pháp NaOH-sodium citrate-N-acetyl-L-cysteine (NaOH-NALC): cho đàm vào ống nghiệm ly tâm 50ml. Cho vào một thể tích NaOH-NALC (0,25M NaOH, 25mM Na-citrate, 15mM N-acetyl-L-cysteine) bằng với thể tích đàm. Đánh tan đàm bằng máy vortex khoảng 5 giây. Để trên máy lắc khoảng 20 phút. Cho vào ống nghiệm một lượng lớn nước cất vô trùng cách miệng ống 3cm. Ly tâm 2000 vòng/phút trong 15 phút. Bỏ phần nước nổi, giữ lại cặn lắng.

b. Nuôi cấy:

Dùng pipette hút cặn lắng, nhỏ vào môi trường Lowenstein – Jensen, khoảng 3 giọt/ống nghiệm. Nghiêng sao cho cặn lắng phủ đều trên mặt môi trường. Riêng đối với dịch não tủy, cấy trực tiếp lên

môi trường Lowenstein – Jensen. Để ủ ấm 37°C. Đọc kết quả sau 30, 60, 90 ngày.

c. Định danh vi khuẩn lao:

- Hình thái khuẩn lạc: khuẩn lạc khô, xù xì, gồ ghề

- Thời gian phát triển: phát triển chậm (1-2 tháng)

- Thử nghiệm sinh hóa : Niacin (+), khử Nitrate (+).

* **Kỹ thuật PCR chẩn đoán Lao:** (Theo hướng dẫn sử dụng của bộ sinh phẩm MTB-PCR do Học viện Quân y cung cấp).

+ Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN trực tiếp từ bệnh phẩm:

Bệnh phẩm được xử lý bằng dung dịch Natri dichloroisocyanurate 50% hoặc N-Acetyl L-Systein để đảm bảo tính an toàn, sau đó được ly tâm 6000 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ phòng để thu cặn, (nếu bệnh phẩm là đàm hoặc dịch rửa phế quản có đàm thì phải thêm khoảng 5 ml dung dịch tan đàm, để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút, lắc kỹ trước khi ly tâm). Rửa cặn bằng dung dịch PBS (Phosphate Buffered Saline), ly giải bằng dung dịch Lysis buffer có thành phần là Tris-HCl 1M (pH 8.5), EDTA 0,5M, SDS 10%, NaCl 5M với sự có mặt của Lysozyme 25mg/ml (ủ trong đá 30 phút) sau đó tiếp tục ủ lắc ở 56° C trong 3 giờ với sự có mặt của Proteinase K (10 mg/ml). Dung dịch ly giải được chiết bằng hỗn hợp Phenol: Chloroform: Isoamyl-Alcohol (25:24:1). ADN được rửa bằng cồn 100% sau đó ly tâm 14000 v/p trong 20 phút ở 4° C và rửa bằng cồn 70%. ADN thu được sau khi làm khô được hoà tan trong 100 µl nước khử ion vô trùng.

+ Phương pháp nhân các gen đích bằng kỹ thuật multiplex PCR:

Tiến hành phản ứng PCR đối với từng gen đích IS6110, IS1081 và 23S rDNA song song với sử dụng bộ kit multiplex PCR trên máy GeneAmp PCR System 9700 và Icyler. Sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose 1,5 % sau đó nhuộm bằng Ethidium Bromide và phát hiện bằng máy chụp ảnh Gel – Doc.

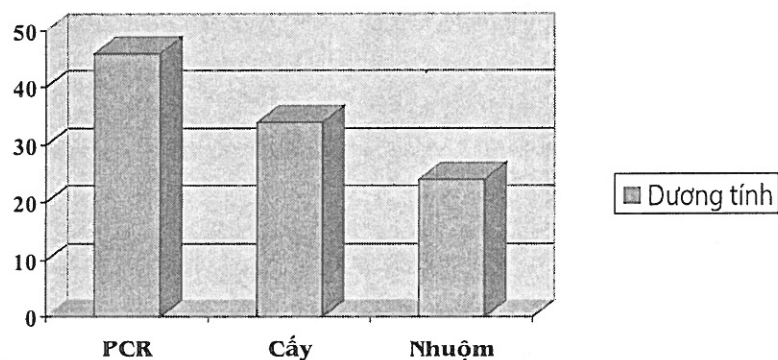
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tổng số mẫu được thực hiện: 100 mẫu.

3.2. Kết quả thực hiện theo từng phương pháp:

- PCR: 46 (+)/100 mẫu (tỷ lệ 46%).
- Nuôi cấy vi khuẩn lao: 34 (+)/100 mẫu (tỷ lệ 34%).
- Nhuộm Ziehl-Neelsen: 24/100 mẫu (tỷ lệ 24%).

Về kết quả phát hiện lao của 3 phương pháp thì kết quả của PCR là cao nhất (46%), sau đó là nuôi cấy (34%), nhuộm Ziehl-Neelsen chỉ phát hiện được 24%. Như vậy độ nhạy chẩn đoán của PCR là cao nhất.



Biểu đồ 3.1. So sánh kết quả phát hiện lao giữa 3 phương pháp

3.3. So sánh kết quả giữa các phương pháp:

3.3.1. Giữa PCR và cấy vi khuẩn lao

	Cấy VK lao (+)	Cấy VK lao (-)	Tổng
PCR (+)	33	13	46
PCR (-)	1	53	54
Tổng	34	66	100

$$K = 0.71, Se = 32/34 = 97,05\%, Sp = 52/66 = 80,3\%.$$

Như vậy, nếu coi nuôi cấy là tiêu chuẩn vàng thì độ nhạy của kit MTB PCR đạt 97,05 %, độ đặc hiệu đạt 80,3 % so với nuôi cấy. Trên thực tế nhiều trường hợp có triệu chứng lao rõ nhưng nuôi cấy vẫn âm tính có thể do lượng vi khuẩn có ít trong bệnh phẩm, một số bị ức chế trong quá trình xử lý bệnh phẩm, số khác do quá trình nuôi cấy bị nhiễm tạp khuẩn, tạp nấm nên không phát hiện được vi khuẩn lao khiến cho độ nhạy của nuôi cấy không phải là tuyệt đối, kết quả âm tính của nuôi cấy không loại trừ được khả năng nhiễm lao. Vì vậy cho đến nay chưa có phương pháp nào thật sự được coi là “chuẩn vàng” trong chẩn đoán lao. Trong khi đó PCR với nguyên lý khuếch đại gen có khả năng khuếch đại hàng triệu lần một đoạn gen đích có trong bệnh phẩm, không phụ thuộc vào việc vi khuẩn còn sống

hay đã chết trong quá trình xử lý bệnh phẩm. Như vậy về mặt lý thuyết PCR có độ nhạy cao hơn so với nuôi cấy, nên sẽ có những trường hợp nuôi cấy âm tính nhưng PCR cho kết quả dương tính. Vì vậy khi lấy nuôi cấy làm tiêu chuẩn vàng tức là mặc nhiên công nhận kết quả âm tính của nuôi cấy là âm tính thật khiến cho độ đặc hiệu của PCR giảm xuống. Đây là một khó khăn khi đánh giá một phương pháp chẩn đoán mới trên lâm sàng trong điều kiện chưa có phương pháp chuẩn. Vì vậy độ nhạy và đặc hiệu trong trường hợp này chưa phản ánh thực chất của kit MTB-PCR mà cần phải đánh giá trên panel mẫu và có thể so sánh thêm với một kit chẩn đoán thương mại đã được cơ quan chuyên môn có thẩm quyền kiểm định (có chứng chỉ IVD dùng cho chẩn đoán) và sử dụng rộng rãi.

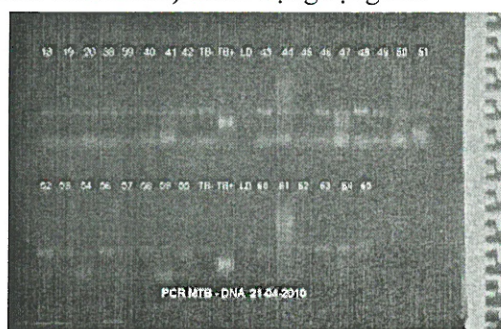
3.3.2. Giữa PCR và nhuộm Ziehl-Neelsen

	Nhuộm (+)	Nhuộm (-)	Tổng
PCR (+)	19	27	46
PCR (-)	5	49	54
Tổng	24	76	100

Độ nhạy của PCR: $Se = 19/24 = 79,17\%$

Độ đặc hiệu của PCR: $Sp = 49/76 = 64,47\%$

Tương tự như trên, do độ nhạy của phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen rất thấp (chỉ dương tính khi số lượng vi khuẩn $\geq 10^4$ AFB/ml bệnh phẩm) nên phần tính độ nhạy và đặc hiệu của PCR ở đây chỉ có tính chất tham khảo, cần phải đánh giá trên panel mẫu và có thể so sánh thêm với một kit chẩn đoán thương mại đã được kiểm định (có chứng chỉ IVD dùng cho chẩn đoán) và sử dụng rộng rãi.



Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm MTB-PCR

Nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước đều ghi nhận PCR là một công cụ có thể cải thiện khả năng chẩn đoán bệnh lao bao gồm cả lao phổi, lao ngoài phổi, và ghi nhận PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn các phương pháp nhuộm và nuôi cấy rất nhiều. Các tác giả ở Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương và Học viện quân y 103 Hà Nội (2003) ghi nhận với PCR, độ nhạy chung là 69%, độ đặc hiệu chung là 97% [4]. Các tác giả Ấn Độ (1998) cũng thực hiện PCR và so sánh với nhuộm Ziehl-Neelsen, nuôi cấy vi khuẩn. Nghiên cứu được thực hiện trên 85 mẫu bệnh phẩm, tỷ lệ dương tính lần lượt là: Nhuộm 30,6%, cấy 36,6% và PCR 69,4% [5]. Tại Thổ Nhĩ Kỳ (2000), các tác giả đã nghiên cứu trên 79 trường hợp (61 bệnh nhân và 18 người khỏe mạnh) và cho kết quả độ nhạy là 96,72%, độ đặc hiệu là 100% [6].

IV. KẾT LUẬN

Phương pháp PCR với bộ kit MTB PCR của Học viện quân y có độ nhạy cao nhất so với hai phương pháp truyền thống là nuôi cấy và nhuộm Ziehl-Neelsen với tỷ lệ phát hiện lần lượt là 46%, 34% và 24% trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi lao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2009), *Tài liệu hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và phòng lao*. Ban hành kèm theo Quyết định số 979/QĐ-BYT ngày 24 tháng 3 năm 2009 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
2. Mai Nguyệt Thu Hồng, Cao Minh Nga, Huỳnh Thanh Bình (2005), “Phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn lao trên một số đối tượng khác nhau”, *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 9 (Phụ bản của số 1), tr. 68-72.
3. Nguyễn Ngọc Lan (2001), *Nghiên cứu áp dụng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase trong chẩn đoán lao*, Luận án Tiến sĩ Y học, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.
4. Hồ Minh Lý, Nguyễn Văn Anh, Phạm Kim Liên và cs, (2003), “Hiệu quả của PCR trong phát hiện *M. tuberculosis* trực tiếp trong bệnh phẩm soi kính âm tính của bệnh nhân lao”, *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 23(3), tr. 14 – 19.
5. J.N. Banavaliker, Bobby Bhalotra, D.C. Sharma, Manoj K. Goel, P.S. Khandekar, and M. Bose (1998), “Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR in clinical specimens”, *Indian Journal of Tuberculosis*, 45 (15), pp. 15 – 18.
6. Okutan O., Kartaloglu Z., Ilvan A., Cerrahoglu K., Kunter E., Aydılek R. (2000), “Polymerase Chain Reaction in Pulmonary Tuberculosis”, *Eastern Journal of Medicine*, 5 (1), pp. 7 – 9.
7. WHO (2012), *Global tuberculosis report 2012*.