

## HIỆU QUẢ CỦA KỸ THUẬT PCR TRONG CHẨN ĐOÁN LAO PHỔI

Nguyễn Đức Trung

Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

### TÓM TẮT

Đề bệnh lao dần được kiểm soát và thanh toán điều quan trọng là phát hiện được nhiều nhất số người mắc lao trong cộng đồng và điều trị khỏi cho họ để giảm dần nguồn lây nhiễm. Kỹ thuật sinh học phân tử là một phương pháp hiệu quả trong phát hiện và xác định các tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR đơn mồi đã được sử dụng để phát hiện trình tự đặc hiệu IS6110 của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* từ mẫu đờm của 117 trường hợp nghi mắc lao phổi đến khám và điều trị tại Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Thái Nguyên. Phương pháp nuôi cấy được sử dụng như là phương pháp chuẩn vàng khi xác định hiệu quả chẩn đoán của kỹ thuật PCR và phương pháp nhuộm soi trực tiếp. Kết quả cho thấy kỹ thuật PCR có độ nhạy 94,4%, độ đặc hiệu 100%, giá trị dự báo dương tính 100% và giá trị dự báo âm tính 88,24%. Trong khi đó, phương pháp nhuộm soi trực tiếp là phương pháp xét nghiệm lao phổ biến hiện nay chỉ có độ nhạy 56,32%, độ đặc hiệu 73,33%, giá trị dự báo dương tính 85,96% và giá trị dự báo âm tính 36,67%.

**Từ khóa:** Lao phổi, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, IS6110

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, bệnh lao vẫn là một bệnh truyền nhiễm nặng nề, Việt Nam đứng thứ 12 trong số 22 nước có số người mắc lao cao nhất thế giới [2], [11]. Hàng năm ước tính có thêm 180.000 bệnh nhân lao, trong đó có khoảng 6000 bệnh nhân lao đa kháng thuốc và khoảng 7400 bệnh nhân lao/HIV. Tuy nhiên chỉ khoảng 60% số bệnh nhân ước tính là được phát hiện [1]. Như vậy việc tăng cường khả năng phát hiện các trường hợp mắc lao và các thể bệnh lao là một trong những ưu tiên hàng đầu trong công tác chống lao hiện nay. Ở Việt Nam, chẩn đoán lao phổi vẫn dựa chủ yếu phương pháp nhuộm soi trực tiếp đờm tìm được vi khuẩn AFB (lao phổi AFB (+)), tuy nhiên trên thực tế vẫn còn nhiều trường hợp được chẩn đoán lao phổi AFB (-) khi việc chẩn đoán xác định phải có sự hỗ trợ của kết quả nuôi cấy hoặc kết quả phim chụp Xquang phổi chuẩn do không tìm thấy vi khuẩn AFB trong đờm [2]. Trên thế giới, kỹ thuật PCR với những thường quy riêng đã được sử dụng tại nhiều phòng xét nghiệm để chẩn đoán và phát hiện sớm những trường hợp mắc lao. Nhiều trình tự gen đặc hiệu đã được sử dụng làm khuôn mẫu cho phương pháp này như

IS6110, IS1081, IS986, P36, 16S- rRNA, trong đó IS6110 là trình tự được sử dụng phổ biến nhất trong phát hiện vi khuẩn lao bằng phương pháp PCR [3], [5], [6], [11]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR đơn mồi phát hiện trình tự đích IS6110 của vi khuẩn lao đã được thực hiện. Xác định được hiệu quả của kỹ thuật trong phát hiện vi khuẩn lao giúp tìm được một phương pháp chẩn đoán mới khắc phục được những hạn chế còn tồn tại của những phương pháp chẩn đoán lao thường dùng hiện nay.

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Đối tượng nghiên cứu:** Các mẫu đờm được thu thập từ 117 bệnh nhân nghi mắc lao phổi đến khám và điều trị tại Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Thái Nguyên từ tháng 01/2010 đến tháng 02/2011.

**Phương pháp nghiên cứu:** Mẫu đờm được lấy từ bệnh nhân, bảo quản và xử lý theo thường quy. Ba phương pháp phát hiện vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* trong đờm đã được sử dụng, bao gồm nhuộm soi trực tiếp bằng phương pháp Ziehl- Neelsen, nuôi cấy xác định đặc điểm phát triển của vi khuẩn lao trên môi trường đặc hiệu Ogawa và phát hiện trình tự đặc hiệu IS6110 của vi khuẩn lao bằng kỹ thuật PCR đơn mồi. Các

\*

phương pháp chẩn đoán được tiến hành độc lập trên những mẫu của đờm bệnh nhân đã qua xử lý. Phương pháp nuôi cấy phát hiện vi khuẩn lao *M. tuberculosis* được coi như là phương pháp chuẩn vàng trong chẩn đoán phát hiện vi khuẩn. Hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao *M. tuberculosis* trong đờm của kỹ thuật PCR và phương pháp nhuộm soi được xác định dựa trên độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính (GTDBDT) và giá trị dự báo âm tính (GTDBAT) của kỹ thuật PCR so với phương pháp chuẩn vàng.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả phát hiện vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* trong đờm

**Bảng 1.** Kết quả phát hiện vi khuẩn lao trong đờm

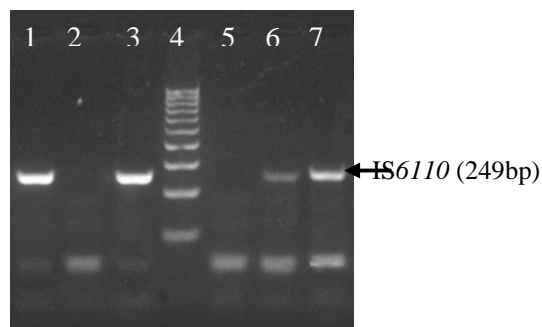
Kết quả chẩn đoán	Nhuộm soi n (%)	Nuôi cấy n (%)	PCR n (%)
Dương tính	57 (48,72)	87 (74,36)	83 (70,94)
Âm tính	60 (51,28)	30 (25,64)	34 (29,06)

Trong 117 trường hợp nghi mắc lao phổi, bằng phương pháp nhuộm soi trực tiếp chỉ phát hiện được 57 trường hợp (48,72%) có vi khuẩn AFB trong đờm. Vi khuẩn kháng acid AFB được phát hiện trong các mẫu đờm bằng kỹ thuật nhuộm Ziehl- Neelsen theo thường quy hướng dẫn [1]. Phương pháp nhuộm soi trực tiếp có quy trình thực hiện đơn giản, cho kết quả nhanh và chi phí không cao do đó tại Việt Nam đây vẫn là kỹ thuật xét nghiệm phổ biến nhất dùng trong phát hiện vi khuẩn lao. Với ưu điểm như vậy nên kỹ thuật này có thể triển khai thực hiện ở tất cả các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Tuy nhiên ngưỡng phát hiện của phương pháp nhuộm soi trực tiếp là  $\geq 10^3$  tế bào vi khuẩn/ml mẫu bệnh phẩm nên trên thực tế với những mẫu đờm có quá ít vi khuẩn AFB thì việc chẩn đoán xác định lao phổi (lao phổi AFB (-)) phải có sự hỗ trợ của kết quả phương pháp nuôi cấy hoặc hình ảnh tổn thương lao tiến triển trên phim Xquang phổi chuẩn [1].

Với phương pháp nuôi cấy đã phát hiện được 87 bệnh nhân mắc lao phổi (74,36%) trong tổng số 117 trường hợp nghi mắc lao phổi

được nghiên cứu. Kết quả chẩn đoán dựa vào nuôi cấy cao hơn so với phương pháp nhuộm soi đờm thông thường. Do có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trong phát hiện vi khuẩn lao nên trong chẩn đoán lao phổi phương pháp nuôi cấy được coi là phương pháp chuẩn vàng [7], [10]. Vi khuẩn lao có đặc điểm sinh sản và phát triển chậm nên để phát hiện được vi khuẩn này dựa vào sự hình thành khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường nuôi cấy cần khoảng thời gian từ 6-8 tuần, phương pháp này chỉ có thể thực hiện ở một số bệnh viện chuyên khoa lao mà phòng xét nghiệm vi sinh có điều kiện thực hiện kỹ thuật nuôi cấy. Do đó, mặc dù có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhưng trên thực tế ở Việt Nam phương pháp nuôi cấy chưa thể triển khai rộng rãi ở các cơ sở y tế nhằm phát hiện sớm những người mắc lao phổi trong cộng đồng.

Qua sử dụng kỹ thuật PCR đơn mồi, trình tự đặc hiệu IS6110 với kích thước khoảng 249 bp của vi khuẩn lao *M. tuberculosis* đã được tìm thấy trong mẫu đờm của 83 trường hợp nghi ngờ mắc lao phổi (70,94%) (Hình 1; Bảng 1). Kết quả phát hiện vi khuẩn lao bằng PCR cao hơn nhiều so với phương pháp nhuộm soi trực tiếp đờm.



**Hình 1.** Điện di đồ trình tự IS6110 trên gel agarose 1%

### Hiệu quả của kỹ thuật PCR khi phát hiện vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* trong đờm

Giá trị của mỗi xét nghiệm chẩn đoán trong y học được đánh giá dựa trên ba khía cạnh: Thứ nhất là giá trị chẩn đoán của phương pháp để loại bỏ những nghi ngờ giúp bác sĩ chẩn

đoán xác định bệnh. Những xét nghiệm chủ đạo trong chẩn đoán bệnh được gọi là chẩn đoán vàng hay tiêu chuẩn vàng. Với bệnh lao, có một số phương pháp có giá trị chẩn đoán xác định hoặc hỗ trợ chẩn đoán xác định bệnh nhưng mỗi phương pháp này đều có ưu điểm và một số hạn chế nhất định, trong những phương pháp đã được sử dụng thì việc tìm thấy vi khuẩn lao (dựa trên đặc điểm phát triển đặc trưng của vi khuẩn) bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường đặc hiệu được coi là chuẩn vàng. Thứ hai là độ chính xác của xét nghiệm, tức là mức độ tin cậy của kết quả có được. Độ tin cậy này được đánh giá dựa trên hai chỉ tiêu là độ nhạy (Sensitivity) và độ đặc hiệu (Specificity), một xét nghiệm vừa có độ nhạy lẫn độ đặc hiệu cao là xét nghiệm lý tưởng nên được lựa chọn để sử dụng với mục đích chẩn đoán xác định bệnh. Thứ ba là thời gian xét nghiệm, thời gian này được rút ngắn thì sẽ có kết quả chẩn đoán xác định sớm hơn và như vậy sẽ nâng cao được hiệu quả điều trị bệnh. Với những bệnh có khả năng lây nhiễm thì việc điều trị bệnh có hiệu quả còn góp phần hạn chế được nguồn lây nhiễm cho cộng đồng.

**Bảng 2.** So sánh kết quả phát hiện vi khuẩn lao trong đờm bằng nhuộm soi và nuôi cấy

	Kết quả nuôi cấy		Tổng số
	Vi khuẩn mọc	Vi khuẩn không mọc	
Kết quả nhuộm soi (+)	49	8	57
Kết quả nhuộm soi (-)	38	22	60
<b>Tổng số</b>	<b>87</b>	<b>30</b>	<b>117</b>

**Bảng 3.** So sánh kết quả phát hiện vi khuẩn lao trong đờm bằng PCR và nuôi cấy

	Kết quả nuôi cấy		Tổng số
	Vi khuẩn mọc	Vi khuẩn không mọc	
Kết quả PCR (+)	83	0	83
Kết quả PCR (-)	4	30	34
<b>Tổng số</b>	<b>87</b>	<b>30</b>	<b>117</b>

Dựa trên kết quả Bảng 2 cho thấy khi phát hiện vi khuẩn trong đờm, phương pháp nhuộm soi trực tiếp có độ nhạy là 56,32%, độ

đặc hiệu là 73,33%, GTDBDT là 85,96% và GTDBAT là 36,67%.

Phân tích kết quả Bảng 3 cho thấy khi phát hiện vi khuẩn trong đờm, kỹ thuật PCR có độ nhạy là 95,4%, độ đặc hiệu là 100%, GTDBDT là 100% và GTDBAT là 88,24%.

So sánh hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao *M. tuberculosis* trong đờm, kết quả cho thấy phương pháp PCR có độ nhạy, độ đặc hiệu cũng như GTDBDT và GTDBAT cao hơn hẳn so với phương pháp nhuộm soi thông thường (Bảng 2, Bảng 3). Tuy có độ nhạy cao (95,4%) nhưng vẫn có 4 trường hợp kết quả nuôi cấy cho chẩn đoán dương tính với vi khuẩn lao trong khi phương pháp PCR cho kết quả âm tính (không phát hiện được trình tự đặc hiệu IS6110) (Bảng 3), điều này có thể do chủng vi khuẩn lao *M. tuberculosis* có mặt trong mẫu bệnh phẩm bị khuyết trình tự IS6110 nên không thể phát hiện được chúng bằng kỹ thuật PCR đơn mồi [4], [10]. Việc không phát hiện được vi khuẩn do hiện tượng khuyết gen có thể khắc phục bằng cách sử dụng kỹ thuật Multiplex PCR có sử dụng nhiều cặp mồi để phát hiện đồng thời nhiều trình tự đích đặc hiệu của vi khuẩn lao.

## KẾT LUẬN

Bằng sử dụng kỹ thuật PCR đơn mồi, kết quả cho thấy khi phát hiện vi khuẩn lao *M. tuberculosis* trong đờm kỹ thuật này có độ nhạy 94,4%, độ đặc hiệu 100%, giá trị dự báo dương tính 100% và giá trị dự báo âm tính 88,24%. Kỹ thuật nhuộm soi trực tiếp chỉ có độ nhạy 56,32%, độ đặc hiệu 73,33%, giá trị dự báo dương tính 85,96% và giá trị dự báo âm tính 36,67%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bộ Y tế, Chương trình chống lao quốc gia (2009), "Hướng dẫn quản lý bệnh lao", Nxb Y học.
- [2]. C Dye, K Lonroth, E Jaramillo, BG Williams & M Raviglione, (2009), "Trends in tuberculosis incidence and their determinants in 134 countries", *Bull. World Health Organization*, Vol. 87, pp. 683-691.
- [3]. Giulia M., Andrea G., Lidia C., et al, (1998), "Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed,

paraffin-embedded tissues: Comparison of four amplification assays”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 36, No. 6, pp. 1512-1517.

[4]. Indulakshmi R., Manju YK., Kumar R A., Sathish M., (2001), “Implications of Low Frequency of IS6110 in Fingerprinting Field Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India”, *J Clin Microbol*, Vol. 39, No. 4, pp.1683.

[5]. Mohammad A., Hossein S K, (2007), “Current trends in molecular epidemiology studies of *Mycobacterium tuberculosis*”, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, Vol. 2, No. 5, pp. 108-115.

[6]. Peter W M Hermans., Dick V S., Jeremy W D., et al, (1990), “Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: A useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 28, No. 9, pp. 2051-2058.

[7]. Sagarika H., Soumitesh C., Manpreet B., Shyamasree D M., Jaya S T., (2007), “Simplified detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum using smear microscopy and PCR with

molecular beacons”, *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 56, pp. 1356-1362.

[8]. Sathish S., Suresh K., Babu B., Balaji N, (2011), “Analysis of sequence of diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: possible implications for PCR based detection”, *Biomedical Informatics*, Vol. 6, No. 8, pp. 283-285.

[9]. Scherer L S., et al, (2011), “Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection”, *BMC Pulmonary Medicine*, Vol. 11, pp.15.

[10]. V C C Cheng., W C Yam., I F N Hung., et al, (2004), “Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis”, *J Clin Pathol*, Vol. 57, pp. 181-185.

[11]. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2010. Printed in Geneva, Switzerland.

## SUMMARY

### THE EFFICIENCY OF PCR TECHNIQUE IN THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Nguyen Dac Trung\*

College of Medicine and Pharmacy - TNU

To control and eliminate tuberculosis (TB) gradually, it is important to detect the most number of TB cases in the community and treated them to reduce the sources of infection. Techniques of molecular biology are effective tools of detecting and identifying microbial agents that cause disease. In the present study, a single-primer PCR assay was used to detect insertion element IS6110 specific for *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples of 117 suspected cases of pulmonary TB cases that were examined and treated at Thai Nguyen Hospital of tuberculosis and lung diseases. Culture method is used as the gold standard method to determine the diagnostic effect of PCR assay and smear microscopy. Results showed that PCR has a sensitivity of 94.4%, specificity 100%, positive predictive value 100% and negative predictive value 88.24%. Meanwhile, the smear microscopy, a common test for detection of TB now only has a sensitivity of 56.32%, specificity 73.33%, positive predictive value 85.96% and negative predictive value 36.67%.

**Key words:** Pulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, IS6110

\*