

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Trần Thị Lệ Quyên

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN CÁC KỸ THUẬT MỚI
ỨNG DỤNG ĐỂ PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Burkholderia*
pseudomallei TRONG CÁC MẪU BỆNH PHẨM
LÂM SÀNG VÀ NGOÀI MÔI TRƯỜNG

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9420101.07

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: TS. Trịnh Thành Trung

PGS. TS. Bùi Thị Việt Hà

Phản biện: PGS. TS. Phan Quốc Hoàn

Phản biện: PGS. TS. Phí Quyết Tiến

Phản biện: TS. Trần Huy Hoàng

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ
hợp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN vào hồi
9 giờ 00 ngày 25 tháng 01 năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam

- Trung tâm Thư viện và Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Burkholderia pseudomallei là căn nguyên gây nhiễm trùng melioidosis-bệnh truyền nhiễm cấp tính có tỉ lệ tử vong cao và nhanh. Việt Nam được coi là nước nằm trong tâm điểm lưu hành của melioidosis. Tuy nhiên, số liệu điều tra tỷ lệ melioidosis tại nước ta còn rất xa so với số ca nhiễm dự đoán (chỉ bằng khoảng 1,5%).

Trong chẩn đoán melioidosis, nuôi cấy vi sinh được xem là “tiêu chuẩn vàng”. Tuy nhiên, xét nghiệm vi sinh tại các bệnh viện gặp rất nhiều khó khăn và đòi hỏi người xét nghiệm phải được đào tạo và có kinh nghiệm trong việc nhận dạng *B. pseudomallei*. Hơn nữa, xét nghiệm thường quy *B. pseudomallei* kéo dài từ 3-5 ngày, trong khi bệnh nhân melioidosis sốc nhiễm khuẩn huyết có thể tử vong trong 48 giờ nhập viện nếu không được điều trị đúng kháng sinh kịp thời. Điều này đặt ra yêu cầu cấp thiết cần phải có quy trình xét nghiệm nhanh melioidosis để phục vụ cho điều trị.

Bên cạnh đó, *B. pseudomallei* tồn tại ngoài môi trường nên việc hiểu về dịch tễ học vi khuẩn rất có ý nghĩa với sức khỏe cộng đồng. Hiện nay, nuôi cấy và qPCR TTSS1 là hai phương pháp chính được dùng trong điều tra *B. pseudomallei* từ mẫu môi trường. Trong đó, nuôi cấy theo hướng dẫn chuẩn tuy đã có những thành công trong việc phát hiện *B. pseudomallei* nhưng độ nhạy thấp. qPCR cho độ nhạy cao hơn nhưng kết quả dương tính mới là nhận định ban đầu về khu vực ô nhiễm vi khuẩn mà không thể thay thế cho nuôi cấy vi khuẩn để khẳng định sự có mặt của vi khuẩn vừa phục vụ nghiên cứu. Vì vậy, phát triển phương pháp nuôi cấy có độ nhạy cao trong điều tra *B. pseudomallei* ngoài môi trường rất cần được quan tâm nghiên cứu.

Đề tài “Nghiên cứu phát triển các kỹ thuật mới ứng dụng để phát hiện vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng và ngoài môi trường” được thực hiện nhằm phát triển kỹ thuật mới

phục vụ xét nghiệm nhanh melioidosis trong lâm sàng, và điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường với độ nhạy cao.

Mục tiêu của nghiên cứu:

- Phát triển và ứng dụng được kỹ thuật miễn dịch xét nghiệm nhanh melioidosis từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

- Phát triển và ứng dụng được kỹ thuật nuôi cấy có độ nhạy cao để điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu môi trường.

Tính mới của luận án:

- Phát triển thành công WC/Hcp1-ELISA sử dụng kháng nguyên *B. pseudomallei* VTCC70157 thuộc ST46 phổ biến ở Việt Nam để xét nghiệm melioidosis có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (98,4% và 95,1%). Kỹ thuật được ứng dụng xét nghiệm melioidosis tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh và BV TƯ Huế.

- Phát triển thành công kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) điều tra *B. pseudomallei* trong đất với tỷ lệ phát hiện cao hơn gần 2 và 6 lần so với hướng dẫn chuẩn (TBSS-C50 48 giờ) khi đánh giá bằng qPCR và phân lập trên thạch Ashdown. Kỹ thuật ứng dụng để điều tra sự có mặt của *B. pseudomallei* ngoài môi trường tại Triệu Sơn (Thanh Hóa) và Sóc Sơn (Hà Nội).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. VI KHUẨN *Burkholderia pseudomallei* VÀ BỆNH NHIỄM TRÙNG MELIOIDOSIS

1.1.1. Giới thiệu về chi vi khuẩn *Burkholderia* và loài *B. pseudomallei*

Chi vi khuẩn *Burkholderia* thuộc họ *Burkholderiaceae*, bộ *Burkholderiales*, lớp *Betaproteobacteria*, ngành *Proteobacteria* (Vio et al., 2020). Một trong các loài đầu tiên của chi *Burkholderia* được mô tả là *Burkholderia caryophylli* (trước đây được gọi là *Phytomonas caryophylli*) - gây bệnh thối thân ở thực vật (Dowson, 1929). Năm 1942,

loài vi khuẩn này đã được nhà vi sinh vật học người Mỹ là Walter Burkholder phân loại lại vào chi *Pseudomonas* nhóm II với tên gọi là *Pseudomonas caryophylli* (Burkholder, 1942).

Năm 1992, Yabuuchi và cs đã phân loại chi *Pseudomonas* nhóm II thành chi *Burkholderia* gồm 7 loài (Yabuuchi et al., 1992). Là những loài đầu tiên thuộc chi *Burkholderia*, *B. pseudomallei* và *B. mallei* là tác nhân gây bệnh cho người và động vật; *B. caryophylli* và *B. gladioli* gây bệnh trên thực vật; loài *B. cepacia* theo mô tả ban đầu là tác nhân gây bệnh thối củ trên hành tây; riêng 2 loài *B. solanacearum* gây bệnh trên thực vật và *B. pickettii* gây bệnh cơ hội trên người sau đó được chuyển sang chi *Ralstonia* (Eberl and Vandamme, 2016). Loài *B. cepacia* được chỉ định là loài chuẩn (Depoorter et al., 2016).

Thuộc chi *Burkholderia*, loài *B. pseudomallei* là vi khuẩn gây nhiễm trùng melioidosis được Whitmore và Krishnaswami mô tả lần đầu tiên ở Rangoon, Myanmar vào năm 1912 (Whitmore and Krishnaswami, 1912). Do độc lực cao, khả năng gây bệnh nguy hiểm cho người và động vật cùng với mối lo ngại về việc lây truyền qua đường khí dung, *B. pseudomallei* đã được Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh Hoa Kỳ (US CDC) phân loại là tác nhân gây khủng bố sinh học ở cấp độ vi sinh vật nguy hiểm loại B. Trên cây phát sinh chủng loại, *B. pseudomallei* cùng với 2 loài *B. mallei* và *B. thailandensis* có quan hệ rất gần gũi với nhau. Trong khi *B. mallei* ký sinh bắt buộc trên động vật và cũng được CDC xếp vào nhóm tác nhân đe dọa sinh học cấp độ B, thì *B. thailandensis* phân bố tự nhiên trong đất và trong nước và không gây bệnh cho người và động vật.

1.1.2. Bệnh nhiễm trùng melioidosis

Melioidosis được ghi nhận lần đầu tiên ở Rangoon, Myanmar (Whitmore and Krishnaswami, 1912). Các con đường lây truyền chính của melioidosis 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 khí dung có chứa vi khuẩn; (iii) qua đường tiêu hóa khi ăn uống phải thực phẩm/nước nhiễm khuẩn. Melioidosis là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm gây tử vong cao và nhanh (trong vòng 48 giờ nhập viện) nếu bệnh nhân không được chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời đúng kháng sinh (Wiersinga et al., 2012).

Biểu hiện lâm sàng của melioidosis vô cùng đa dạng, từ nhiễm trùng huyết cấp tính đến bệnh lý mạn tính, nhiễm trùng tiềm ẩn có thể khởi phát sau nhiều thập kỷ phơi nhiễm (Maharjan et al., 2005). Do vậy, melioidosis cũng được gọi với thuật ngữ “the great mimicker” nhằm ám chỉ một bệnh có triệu chứng lâm sàng không điển hình và thường bị nhầm lẫn với các bệnh truyền nhiễm khác như lao phổi hoặc sốt thương hàn (Vidyalakshmi et al., 2008). Tỷ lệ tử vong do melioidosis dao động từ 30-70%, tùy thuộc vào điều kiện y tế ở từng quốc gia và bệnh nhân có bị nhiễm trùng huyết hay không (Vidyalakshmi et al., 2008; Puthuchery et al., 2009).

1.2. NGHIÊN CỨU VỀ *B. pseudomallei* VÀ MELIOIDOSIS TẠI VIỆT NAM

Bằng chứng đầu tiên về khả năng sống hoại sinh ngoài môi trường tự nhiên của *B. pseudomallei* đã được Vaucel chứng minh tại Việt Nam vào năm 1937 (Vaucel 1937). Khoảng 20 năm sau, Chambon đã công bố bằng chứng phân lập trực tiếp *B. pseudomallei* mẫu môi trường tại miền Nam Việt Nam (Chambon 1955). Năm 1961, Luong cũng phân lập được hai chủng các mẫu nước ruộng rau muống tại miền Nam Việt Nam (Luong and Kim 1961). Cùng với đó tại miền Nam, nghiên cứu khác cũng công bố phân lập được *B. pseudomallei* từ các mẫu đất thu ruộng lúa ở ngoại thành Tp HCM từ năm 1992-1998 (Parry et al. 1999). Dự đoán gần đây về phân bố của *B. pseudomallei* trên toàn thế giới cho thấy tính chất tự nhiên của đất trên phần lớn lãnh

thổ Việt Nam rất phù hợp cho sự tồn tại của *B. pseudomallei* (Limmathurotsakul et al. 2016).

Ca nhiễm melioidosis đầu tiên ở người tại Việt Nam được phát hiện vào năm 1925 trên một bệnh nhân nữ đang mang thai tháng thứ năm, sống tại Tp HCM (Pons and Advier 1927). Các ca nhiễm melioidosis sau đó được công bố bởi Menard vào năm 1928 ở Tp HCM và năm 1930 ở Hà Nội (Pons 1930). Sau đó, các trường hợp nhiễm melioidosis được xác nhận bằng nuôi cấy, bao gồm các trường hợp liên quan đến tai nạn giao thông, đã được công bố ở Huế và miền Bắc (Vaucel 1937). Năm 1947, 28 ca nhiễm melioidosis cấp tính, bán cấp tính và mạn tính đã được mô tả ở các bệnh viện tại miền Nam (Alain et al. 1949). Từ năm 1951-1953, 5 trường hợp viêm phổi nhiễm melioidosis đã được chẩn đoán tại các bệnh viện ở miền Nam Việt Nam và Pháp. Tất cả các trường hợp này đều là công dân Pháp từng cư trú hoặc đóng quân tại các khu vực Đông Dương (Duroux 1965). Từ năm 1948-1954, khoảng 100 ca melioidosis đã được báo cáo trong số 400.000 quân Pháp đóng tại Việt Nam, Lào và Campuchia (Sanford 1978).

Trong khi số lượng lớn các ca melioidosis liên quan đến Việt Nam trong thời gian này được công bố, nhưng rất ít thông tin về bệnh này được báo cáo trên người Việt. Năm 1991, một luận án tại Đại học Y Hà Nội đã mô tả 16 ca melioidosis tại các bệnh viện ở Hà Nội trong thời gian từ 1980-1990 (Trinh et al. 2018). Sau đó, Phung và cs (1993) đã công bố 6,4-31,8% người dân thuộc các vùng dân cư sống ở ngoại thành Hà Nội có huyết thanh dương tính với xét nghiệm IHA. Năm 1999, nghiên cứu hồi cứu đã công bố 9 ca melioidosis từ 3.653 ca cấy máu của bệnh nhân sốt nhập viện tại bệnh viện bệnh nhiệt đới lớn nhất Tp HCM vào năm 1992-1998 (Parry et al. 1999). Năm 2008, nghiên cứu hồi cứu khác tại BV Bạch

Mai đã báo cáo 55 ca melioidosis xác nhận bằng nuôi cấy từ năm 1997-2005. Dựa vào địa chỉ cư trú của các bệnh nhân, nghiên cứu kết luận melioidosis phân bố rộng và xảy ra ở ít nhất 18 trong số 25 tỉnh phía Bắc (Phuong et al. 2008).

Từ đề tài “Thiết lập mạng lưới Quốc gia về nghiên cứu chẩn đoán và điều trị bệnh melioidosis tại Việt Nam” (RENOMAB), Trung và cs (2018) đã công bố 70 ca melioidosis trong 7 tháng tại 5 bệnh viện ở Bắc Trung Bộ. Theo kết quả điều tra, melioidosis chiếm tỉ lệ 3,4-10,2% số ca cấy máu dương tính. Mặc dù RENOMAB đã đạt được những kết quả quan trọng, nhưng cũng như nhiều khu vực khác của Việt Nam, gánh nặng thực sự của melioidosis ở Bắc Trung Bộ vẫn cần được tiếp tục nghiên cứu điều tra (Trinh et al. 2018).

1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM VI KHUẨN *B. pseudomallei* TỪ MẪU BỆNH PHẨM LÂM SÀNG

1.3.1. Các phương pháp xét nghiệm phụ thuộc nuôi cấy

Bệnh phẩm được nuôi cấy trực tiếp trên môi trường đĩa thạch thường quy hoặc chọn lọc Ashdown nhằm phân lập khuẩn lạc vi khuẩn nghi ngờ là *B. pseudomallei*. Đối với các bệnh phẩm tạp nhiễm, bước làm giàu trong môi trường dịch thể chọn lọc sẽ được thực hiện trước khi cấy trải trên đĩa thạch. Sau đó, các khuẩn lạc nghi ngờ *B. pseudomallei* sẽ được định danh bằng các kỹ thuật khác nhau, tùy điều kiện của phòng xét nghiệm.

1.3.1.1. Định danh bằng hình thái khuẩn lạc và tế bào

Nuôi cấy thường quy *B. pseudomallei* tại phòng xét nghiệm vi sinh gặp nhiều khó khăn do vi khuẩn có tốc độ sinh trưởng chậm, dẫn đến bị loài sinh trưởng nhanh lấn át và thường bị bỏ sót. Hơn nữa, khuẩn lạc *B. pseudomallei* có hình thái đa dạng dẫn đến nhầm lẫn trong nhận dạng. Do vậy, nhận dạng khuẩn lạc *B. pseudomallei* đòi hỏi kỹ thuật viên được đào tạo và thường thao tác với *B. pseudomallei*.

1.3.1.2. Định danh bằng phương pháp thường quy

Các hệ thống định danh *B. pseudomallei* thường quy được sử dụng rộng rãi trong phòng xét nghiệm như API 20NE, VITEK 2, Phoenix và MicroScan WalkAway 96. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy các xét nghiệm trên có thể định danh nhầm *B. pseudomallei* (Lowe et al., 2006, Kiratisin et al., 2007, Deepak et al., 2008)

1.3.1.3. Định danh bằng phương pháp phân tử

Hiện nay, MALDI-TOF MS được đánh giá là một công cụ linh hoạt và hiệu quả để xác định nhanh *B. pseudomallei* nếu cơ sở dữ liệu phù hợp và liên tục được cập nhật (Wang et al., 2016). Bên cạnh đó phân tích trình tự gen rRNA 16S là một phần không thể thiếu trong định danh nhiều chi vi khuẩn, nhưng việc sử dụng gen này trong phân loại chi *Burkholderia* có nhiều hạn chế, đặc biệt là các loài *B. cepacia* complex. Trong khi đó, gen *recA* đã được sử dụng rộng rãi trong các hệ thống phân loại vi khuẩn (Karlín et al., 1995) và là công cụ hiệu quả trong định danh các loài *B. cepacia* complex (Mahenthiralingam et al., 2000). Ngoài ra, các phương pháp sinh học phân tử khác cũng được nghiên cứu để định danh *B. pseudomallei*. Novak và cs (2006) đã phát triển real-time PCR không chỉ dựa trên tính đặc hiệu lý thuyết mà còn dựa vào sự đa dạng phân bố của các chủng. Đoạn trình tự đích có kích thước 115 bp thuộc gen *orf2* của cụm TTSS1 có thể phân biệt *B. pseudomallei* với các loài khác (Novak et al., 2006). Năm 2020, kỹ thuật PCR đẳng nhiệt (iiPCR) khuếch đại gen đích *bimA* (BPSS1492) để định danh *B. pseudomallei* đã được Chua và cs (2020) phát triển.

1.3.1.4. Định danh bằng phương pháp miễn dịch

Steinmetz và cs (1999) đã phát triển kỹ thuật ngưng kết miễn dịch latex sử dụng MAb3015 IgG1 và đánh giá hiệu quả trong định danh nhanh các chủng *B. pseudomallei* phân lập từ các vùng địa lý khác nhau cho thấy 100% chủng *B. pseudomallei* cho phản ứng dương tính mạnh mẽ với latex MAb3015,

và không có phản ứng chéo (Steinmetz et al., 1999). Năm 2014, Duval và cs cũng phát triển thành công và thương mại latex test sử dụng MAb4B11 định danh nhanh *B. pseudomallei* có độ nhạy 98,7% (Duval et al., 2014). Tuy nhiên, latex test có hạn chế trong phân biệt *B. pseudomallei* và *B. thailandensis* phân lập từ môi trường (Songsri et al., 2018).

1.3.2. Các phương pháp xét nghiệm không phụ thuộc nuôi cấy

1.3.2.1. Xét nghiệm melioidosis bằng phương pháp sinh học phân tử

Nhiều kỹ thuật PCR phát hiện nhanh *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm đã được các nhà khoa học Úc và Thái Lan phát triển (Haase et al., 1998; Kunakorn et al., 2000; Gal et al., 2005; Supaprom et al., 2007; Meumann et al., 2006).

1.3.2.2. Xét nghiệm melioidosis bằng phương pháp miễn dịch

Xét nghiệm nhanh bằng kỹ thuật ngưng kết hồng cầu gián tiếp (IHA) phát hiện kháng thể kháng *B. pseudomallei* trong huyết thanh của người bệnh đã được phát triển từ năm 1965 và được sử dụng phổ biến trong các bệnh viện. Tuy nhiên, độ nhạy và đặc hiệu của phương pháp IHA không cao, có thể cho kết quả dương tính giả do phản ứng chéo với một số kháng nguyên từ các loài có quan hệ gần gũi với *B. pseudomallei* như *B. mallei* và *B. thailandensis* (Tiyawisutsri et al., 2005; Gilmore., 2007). Vì vậy, phương pháp IHA chỉ dùng để xác định khả năng phơi nhiễm với vi khuẩn *B. pseudomallei* chứ không có giá trị chẩn đoán melioidosis vì tỷ lệ huyết thanh dương tính với IHA của người dân sinh sống trong vùng dịch bệnh lưu hành là rất cao.

ELISA là một kỹ thuật xét nghiệm nhanh, có độ nhạy cao để phát hiện sự có mặt của protein đặc hiệu trong mẫu cần phân tích. Trong xét nghiệm melioidosis, nhiều nghiên cứu đã công bố kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (Chantratita et

al., 2007; Hara et al., 2013; Chieng et al., 2015; Pumpuang et al., 2017; Kritsiriwuthinan et al., 2018).

1.3.2.3. Xét nghiệm melioidosis bằng que sắc ký miễn dịch

Kế thừa kết quả từ quá trình nghiên cứu tìm kiếm các kháng nguyên có độ nhạy và đặc hiệu cao trong xét nghiệm melioidosis, các nhóm nghiên cứu tại Mỹ, Thái Lan và Đức đã phát triển thành công các que test nhanh sắc ký miễn dịch xét nghiệm melioidosis từ mẫu bệnh phẩm với độ nhạy và độ đặc hiệu cao (Houghton et al., 2014; Peeters et al., 2018; Phokrai et al., 2018; Felgner et al., 2009; Kohler et al., 2016; Wagner et al., 2020). Hiện nay, ba sản phẩm trên vẫn đang trong quá trình thương mại hóa, chưa chính thức được sử dụng cho xét nghiệm melioidosis tại các bệnh viện.

1.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN *B. pseudomallei* NGOÀI MÔI TRƯỜNG

1.4.1. Phương pháp nuôi cấy

Hiện nay phương pháp nuôi cấy vẫn được xem là “tiêu chuẩn vàng” trong xác định *B. pseudomallei* từ các mẫu lâm sàng hoặc môi trường (Cheng and Currie, 2005). Các môi trường nuôi cấy chọn lọc được khuyến nghị sử dụng để làm giàu vi khuẩn, sau đó kết hợp với thạch Ashdown để phân lập *B.pseudomallei*. Đặc biệt, các mẫu bệnh phẩm tạt nhiễm và mẫu môi trường sẽ được làm giàu trong môi trường chọn lọc trước khi phân lập trên thạch Ashdown (Ashdown, 1979; Galimand and Dodin, 1982; Wuthiekanun et al., 1995).

Tại Hội nghị quốc tế lần thứ VI về melioidosis (2010), các nhà khoa học đã thành lập nhóm chuyên gia quốc tế về “Phát hiện vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* ngoài môi trường” (DEBWorP). Năm 2013, 16 nhà khoa học của DEBWorP đưa ra hướng dẫn chuẩn sử dụng TBSS-C50 làm giàu 48 giờ để điều tra *B. pseudomallei* ngoài môi trường nhằm

hạn chế kết quả âm tính giả và có thể áp dụng ở các quốc gia lưu hành bệnh (Limmathurotsakul et al., 2013).

1.4.2. Phương pháp sinh học phân tử

Nhiều nghiên cứu chứng minh PCR có hiệu quả trong việc phát hiện *B. pseudomallei* ngoài môi trường với độ nhạy cao hơn đáng kể so với nuôi cấy (Kaestli et al., 2007; Trung et al., 2011; Göhler et al., 2017; Dance et al., 2018). Một nghiên cứu ở Lào sử dụng real-time PCR để đánh giá mẫu dịch làm giàu TBSS-C50 đã phát hiện DNA của *B. pseudomallei* ở mức cao hơn nhiều so với tỷ lệ phân lập được (Knappik et al., 2015).

1.5. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU CỦA LUẬN ÁN

1.5.1. Cách tiếp cận của nghiên cứu phát triển kỹ thuật xét nghiệm nhanh melioidosis

Trên cơ sở tham khảo các công trình nghiên cứu, luận án đã lựa chọn 3 kháng nguyên protein Hcp, GroEL1, AhpC và kháng nguyên toàn tế bào WC để phát triển kỹ thuật ELISA. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở để phát triển que test nhanh, đáp ứng được nhu cầu sử dụng tại chỗ cho các bệnh viện tuyến nơi điều kiện cơ sở vật chất còn hạn chế.

1.5.2. Cách tiếp cận của nghiên cứu phát triển kỹ thuật phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường

Quy trình làm giàu *B. pseudomallei* từ mẫu đất sử dụng môi trường mới EM và môi trường theo hướng dẫn chuẩn TBSS-C50 được so sánh, đánh giá qua kỹ thuật làm giàu một bước (48 giờ và 144 giờ) và hai bước (bước 1 trong 48 giờ và bước 2 trong 96 giờ). 640 dịch làm giàu 80 mẫu đất trên hai loại môi trường (TBSS-C50 và EM) sử dụng hai quy trình nuôi cấy (làm giàu một bước và hai bước) đã được phân tích bằng qPCR TTSS1 và nuôi cấy trên thạch Ashdown để đánh giá hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy mới.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

2.1.1. *Chủng vi sinh vật*

Chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 (thuộc ST46- phổ biến ở Việt Nam) được sử dụng để chuẩn bị kháng nguyên toàn tế bào và kháng nguyên tái tổ hợp AhpC, Hcp1 và GroEL1.

2.1.2. *Mẫu huyết thanh*

Bộ huyết thanh để phát triển phương pháp ELISA: 185 mẫu huyết thanh được thu tại 4 BVĐK tỉnh: Bắc Giang (n= 13), Nghệ An (n=76), Hà Tĩnh (n=13) và Bình Định (n= 83) trong khoảng thời gian từ tháng 1/2018-12/2020. Mẫu huyết thanh được chia thành 3 nhóm: (1) nhóm dương tính với melioidosis được khẳng định bằng phương pháp nuôi cấy (n=63); (2) nhóm dương tính với nhiễm khuẩn khác được khẳng định bằng nuôi cấy (n=62) và (3) nhóm khỏe mạnh (n=60).

Bộ huyết thanh để ứng dụng phương pháp ELISA: 1.011 mẫu được thu tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh (n=511) và BV TƯ Huế (n=500) vào tháng 10-11/2020. Huyết thanh được thu tại ngày thứ 1 đến 5 sau khi bệnh nhân nhập viện với các biểu hiện nghi ngờ nhiễm melioidosis.

2.1.3. *Mẫu môi trường*

Mẫu đất để phát triển phương pháp nuôi cấy: tháng 6-7/2018, 80 mẫu đất được lấy tại 16 điểm, gồm 9 điểm ở Bắc Trung Bộ (nơi có nhiều ca melioidosis: Thanh Hóa (n=3), Hà Tĩnh (n=6)); và 7 điểm ở Nam Trung Bộ (nơi chưa có ca melioidosis: Quảng Ngãi (n=2), Bình Định (n=3), Phú Yên (n=1) và Khánh Hòa (n=1)).

Mẫu môi trường cho ứng dụng phương pháp nuôi cấy:

(1) Mẫu nước ruộng lúa tại Triệu Sơn-Thanh Hóa: Năm 2019, 800 mẫu nước ruộng lúa đã được thu tại 100 điểm khác nhau (mỗi điểm cách nhau 2,5 m) vào 8 thời điểm trong thời gian canh tác lúa (27/2; 10/4;

9/5; 23/5; 11/6; 16/7; 15/8 và 20/9) huyện Triệu Sơn-Thanh Hóa.

(2) Mẫu đất và nước tại khu vực gia đình 3 trẻ em tử vong do melioidosis (huyện Sốc Sơn-Hà Nội) được thu vào 2 đợt:

Đợt 1 (17/11/2019): 7 mẫu đất vườn ở độ sâu 10 cm, 9 mẫu nước giếng từ 3 giếng (giếng tắm A, giếng chăn nuôi B và giếng ăn C) và 1 mẫu nước uống của gia đình nạn nhân.

Đợt 2 (23/11/2019): 46 mẫu đất vườn tại 10 điểm quanh giếng A ở các độ sâu khác nhau (10-50 cm); 40 mẫu đất ruộng tại 8 ruộng lúa ở độ sâu 30 cm; 26 mẫu nước giếng từ giếng A sau mỗi 5 phút bơm từ phút 0 đến 240; 39 mẫu nước giếng từ giếng B, C và 11 giếng của các hộ hàng xóm; 30 mẫu nước ao từ 10 ao xung quanh khu đất nhà nạn nhân.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. *Phương pháp chuẩn bị kháng nguyên toàn tế bào (WC)*

2.2.2. *Phương pháp chuẩn bị kháng nguyên tái tổ hợp*

2.2.3. *Phương pháp ELISA chẩn đoán nhanh melioidosis*

2.2.4. *Phương pháp nuôi cấy trực tiếp vi khuẩn B. pseudomallei*

2.2.5. *Phương pháp nuôi cấy làm giàu vi khuẩn B. pseudomallei*

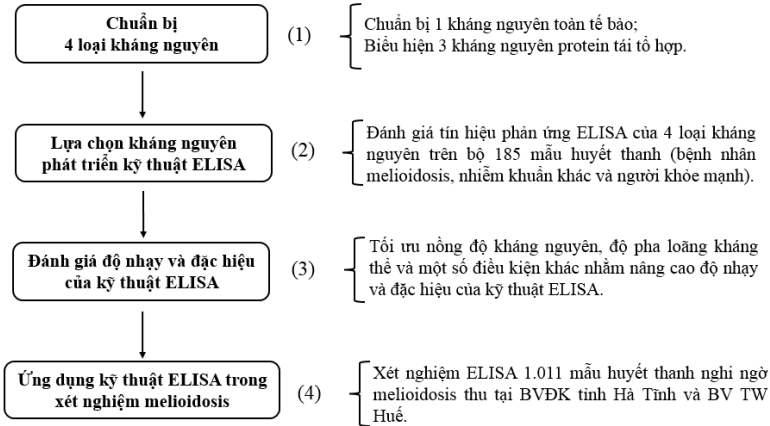
2.2.6. *Phương pháp real-time PCR TTSS1*

2.2.7. *Phương pháp phân tích MLST*

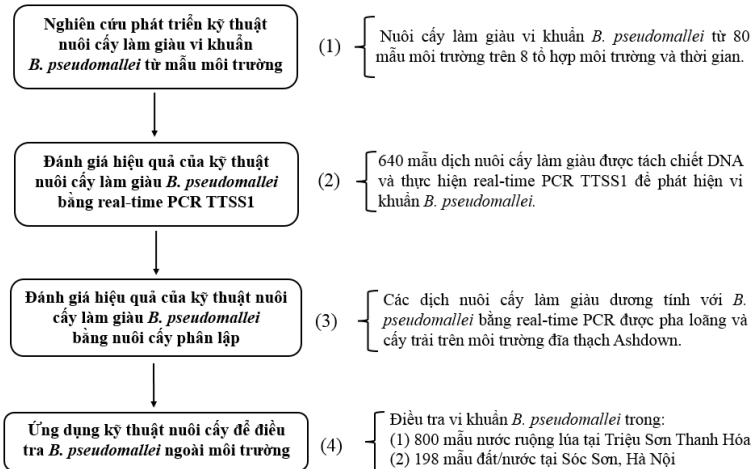
2.2.8. *Thống kê xử lý số liệu*

2.3. Sơ đồ nghiên cứu

Sơ đồ các bước nghiên cứu phát triển và ứng dụng kỹ thuật miễn dịch xét nghiệm nhanh melioidosis từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng



Sơ đồ các bước nghiên cứu phát triển và ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy để điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường



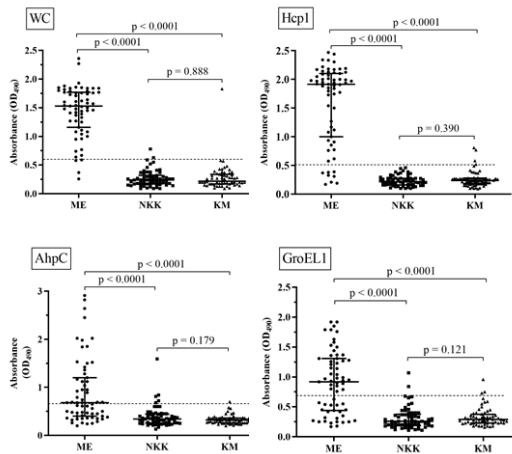
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM NHANH MELIOIDOSIS TỪ MẪU BỆNH PHẨM LÂM SÀNG

3.1.1. Nghiên cứu phát triển kỹ thuật ELISA xét nghiệm nhanh melioidosis

Các protein kháng nguyên tái tổ hợp AhpC, Hcp1 và GroEL1 được mã hóa bởi các gen *BPSL 2096*, *BPSS1498* và *BPSL 2697* đã được biểu hiện thành trên dòng *E. coli* BL21(DE3) pLysS với kích thước tương ứng là 20,7, 22,3 và 59,1 kDa và nồng độ lần lượt là 19,0; 9,9 và 21,4 $\mu\text{g/mL}$.

Hiệu quả của 4 xét nghiệm WC/AhpC/Hcp1/GroEL1-ELISA được đánh giá với bộ 185 mẫu huyết thanh. Kết quả cho thấy giá trị OD trung bình của nhóm bệnh nhân melioidosis cao hơn đáng kể so với của hai nhóm còn lại ($P < 0,0001$) (Hình 3.5), và giá trị OD trung bình của nhóm các bệnh nhiễm trùng khác bằng với giá trị OD của nhóm người khỏe mạnh ($P > 0,05$). Xét nghiệm Hcp1-ELISA cho giá trị OD trung bình cao nhất trên nhóm melioidosis (1,916), sau đó là WC-ELISA (1,530), GroEL1-ELISA (0,920) và AhpC-ELISA (0,680).



Hình 3.5. Giá trị OD₄₉₀ của các xét nghiệm WC/Hcp1/AhpC/GroEL1-ELISA sử dụng bộ 185 mẫu huyết thanh của các nhóm (1) bệnh nhân melioidosis (ME, n=63); (2) bệnh nhân nhiễm khuẩn khác (NKK, n=62) và người khỏe mạnh

(KM, n=60). Nét đứt ngang thể hiện giá trị cut-off của mỗi xét nghiệm ELISA đảm bảo độ đặc hiệu >95%.

Đường cong ROC biểu diễn mối tương quan giữa giá trị cut-off và độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm ELISA. Diện tích dưới đường cong ROC của xét nghiệm WC-ELISA (0,982) và Hcp1-ELISA (0,957) là cao hơn so với GroEL1-ELISA (0,854) và AhpC-ELISA (0,832).

Giá trị cut-off được ước tính để tất cả các xét nghiệm ELISA đạt được độ đặc hiệu trên 95%. Ở ngưỡng cut-off là 0,60, độ nhạy và độ đặc hiệu của WC-ELISA tương ứng là 93,7% và 97,5%. Ở ngưỡng cut-off là 0,50, độ nhạy và độ đặc hiệu của Hcp1-ELISA lần lượt là 87,3% và 96,7%. Ở ngưỡng cut-off là 0,68, độ nhạy và độ đặc hiệu của GroEL1-ELISA lần lượt là 61,9% và 95,1%. Ở ngưỡng cut-off là 0,6, độ nhạy và độ đặc hiệu của AhpC-ELISA lần lượt là 57,1% và 95,1%.

Khi kết hợp hai kết quả xét nghiệm WC-ELISA và Hcp1-ELISA, độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm chẩn đoán huyết thanh tương ứng là 98,4% và 95,1%. Vì vậy, xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA đã được lựa chọn để chẩn đoán huyết thanh bệnh nhân nghi nhiễm melioidosis.

3.1.2. Đánh giá hiệu quả xét nghiệm melioidosis của WC/Hcp1-ELISA

3.1.2.1. Kết quả ứng dụng WC/Hcp1-ELISA xét nghiệm melioidosis tại BV TƯ Huế

Xét nghiệm WC/Hcp1-ELISA phát hiện 41/500 (8,2%) mẫu huyết thanh thu tại BV TƯ Huế dương tính với melioidosis (Bảng 3.6). Trong đó, số huyết thanh dương tính với melioidosis bằng xét nghiệm WC-ELISA là 41 (8,2%) mẫu cao hơn đáng kể so với Hcp1-ELISA là 24 (4,8%) mẫu ($p < 0,05$). So sánh kết quả giữa mỗi xét nghiệm cho thấy 24 (100%) mẫu huyết thanh dương tính với Hcp1-ELISA cũng dương tính với WC-ELISA.

Trong số 500 bệnh nhân được thu thập huyết thanh, có 23 (4,6%) bệnh nhân được chẩn đoán nhiễm melioidosis bằng phương pháp nuôi cấy. Xét nghiệm WC-ELISA, Hcp1-ELISA và kết hợp WC/Hcp1-ELISA đã phát hiện lần lượt 21/23 (91,3%), 12/23 (52,2%) và 21/23 (91,3%) bệnh nhân nhiễm melioidosis được khẳng định nuôi cấy (Bảng 3.7). Kết quả xét nghiệm ELISA cho thấy khả năng phát hiện melioidosis của WC-ELISA là cao hơn so với Hcp1-ELISA. Có 2/23 (8,7%) trường hợp dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy nhưng không được phát hiện bằng ELISA. ELISA âm tính giả được báo cáo ở 20% ca melioidosis không có kháng thể IgG đặc hiệu với tất cả các xét nghiệm OPS/CPS/WC/CF-ELISA (Suttisunhakul 2016.). Hiện tượng này có thể do bệnh nhân nhập viện ngay khi khởi phát nhiễm trùng và kháng thể IgG đáp ứng kháng nguyên *B. pseudomallei* chưa tạo thành khi xét nghiệm ELISA.

3.1.2.2. Kết quả ứng dụng WC/Hcp1-ELISA xét nghiệm melioidosis tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh

52/511 (10,2%) mẫu huyết thanh thu ại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh dương tính với melioidosis bằng xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA. Hai xét nghiệm WC-ELISA và Hcp1-ELISA cho số lượng huyết thanh dương tính với melioidosis tương đương nhau ($p > 0,05$), 39 (7,6%) mẫu dương tính bằng WC-ELISA và 34 (6,7%) mẫu dương tính bằng Hcp1-ELISA (Bảng 3.6). Tuy nhiên, chỉ có 21 (61,7%) mẫu huyết thanh dương tính bằng Hcp1-ELISA dương tính với WC-ELISA.

Bảng 3.6. Kết quả xét nghiệm ELISA huyết thanh thu thập tại BV TU Huế và BVĐK tỉnh Hà Tĩnh dương tính với melioidosis

| Bệnh viện | WC-ELISA (cut-off > 0,6) | Hcp1-ELISA (cut-off > 0,5) | Xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| BV TƯ Huế (n=500) | 41 (8,2%) | 24 (4,8%) | 41 (8,2%) |
| BVĐK tỉnh Hà Tĩnh (n=511) | 39 (7,6%) | 34 (6,7%) | 52 (10,2%) |

Trong số 511 bệnh nhân được thu huyết thanh, có 14 (2,8%) bệnh nhân dương tính với *B. pseudomallei* bằng xét nghiệm nuôi cấy. Cả hai xét độc lập WC-ELISA và Hcp1-ELISA đều phát hiện được 13/14 (92,8%) trường hợp nuôi cấy xác nhận nhiễm melioidosis. Xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA đã phát hiện 14/14 (100%) ca nhiễm melioidosis được xác nhận bằng nuôi cấy vi sinh (Bảng 3.7).

Bảng 3.7. Các ca dương tính với melioidosis tại BV TƯ Huế và BVĐK tỉnh Hà Tĩnh được khẳng định bằng nuôi cấy dương tính với xét nghiệm ELISA

| Bệnh viện | Số ca dương tính melioidosis được phát hiện | | | |
|------------------------------|---|------------|------------|---------------|
| | Nuôi cấy | WC-ELISA | Hcp1-ELISA | WC/Hcp1-ELISA |
| BV TƯ Huế (n=500) | 23 | 21 (91,3%) | 12 (52,2%) | 21 (91,3%) |
| BVĐK tỉnh Hà Tĩnh (n=511) | 14 | 13 (92,8%) | 13 (92,8%) | 14 (100%) |

Bên cạnh đó, nghiên cứu đã theo dõi tình trạng của 38 bệnh nhân âm tính với melioidosis bằng nuôi cấy hoặc không được xét nghiệm nuôi cấy nhưng có huyết thanh dương tính với WC/Hcp1-ELISA sau 9 tháng xét nghiệm huyết thanh. Kết quả là 38 bệnh nhân được chia thành 4 nhóm (i) bệnh nhân được xác nhận lại bằng nuôi cấy nhiễm trùng melioidosis (n = 2; 5,3%), (ii) bệnh nhân tử vong (n = 9; 23,7%), (iii) bệnh nhân không khỏe mạnh (n = 17; 44,7%), và (iv) người khỏe mạnh (n = 10; 26,3%). Giá trị OD trung bình của WC-ELISA và Hcp1-ELISA không cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm này. Đáng chú ý ở nhóm xác nhận lại bằng nuôi cấy nhiễm trùng melioidosis (n=2), 1 bệnh nhân không được chỉ định xét nghiệm nuôi cấy vi sinh

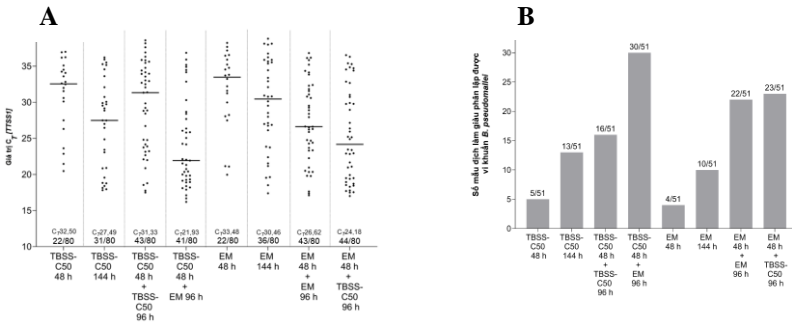
trong thời gian nằm viện và 1 bệnh nhân âm tính với *B. pseudomallei* bằng xét nghiệm nuôi cấy vi sinh.

Như vậy, xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA đã phát hiện ra số lượng nhiều hơn các bệnh nhân dương tính với melioidosis nhập viện sau các hiện tượng thời tiết khắc nghiệt.

3.2. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT PHÁT HIỆN *B. pseudomallei* NGOÀI MÔI TRƯỜNG

3.2.1. Nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi cấy phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường

Với kỹ thuật làm giàu một bước, giá trị C_T trung bình của các dịch làm giàu TBSS-C50 144 giờ (C_T 27,49) và EM 144 giờ (C_T 30,46) thấp hơn đáng kể so với các dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ (C_T 32,55) và EM 48 giờ (C_T 33,48). Bên cạnh đó, tỉ lệ mẫu dương tính với real-time PCR ở dịch làm giàu 144 giờ là nhiều hơn so với dịch làm giàu 48 giờ (Hình 3.6A).



Hình 3.6. Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu vi khuẩn *B. pseudomallei* từ 80 mẫu đất được đánh giá bằng real-time PCR TTSS1 (A) và phân lập (B). Mẫu dương tính với real-time PCR TTSS1 trình bày dưới dạng dấu chấm với giá trị C_T tương ứng trên trục hoành.

Với kỹ thuật làm giàu hai bước, dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ (C_T 21,93) hoặc EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ (C_T 24,18) có tải lượng *B. pseudomallei* cao vượt trội thể hiện qua giá trị C_T trung bình thấp

hơn đáng kể so với dịch làm giàu một bước TBSS-C50 144 giờ (C_T 27,49) và EM 144 giờ (C_T 30,46). Tỷ lệ dương tính ở dịch làm giàu trên 2 loại môi trường kết hợp khác nhau không đáng kể, 51% (41/80) mẫu dương tính ở TBSS-50 48 giờ + EM 96 giờ so với 55% (44/80) mẫu dương tính ở EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ. Đồng thời, tải lượng *B. pseudomallei* trên 2 loại dịch làm giàu này cũng không khác biệt với giá trị C_T trung bình lần lượt là 21,93 và 24,18. Cùng là kỹ thuật làm giàu hai bước, nhưng dịch làm giàu đơn môi trường TBSS-C50 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ (C_T 31,33) cho hiệu quả làm giàu kém hơn so với dịch làm giàu kết hợp TBSS-C50 và EM. Bên cạnh đó, tỷ lệ mẫu dương tính nuôi cấy ở dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ (58%) cao hơn so với các dịch làm giàu còn lại như TBSS-C50 48 giờ (9,8%) và TBSS-C50 144 giờ (25,5%) và TBSS-C50 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ (31,4%).

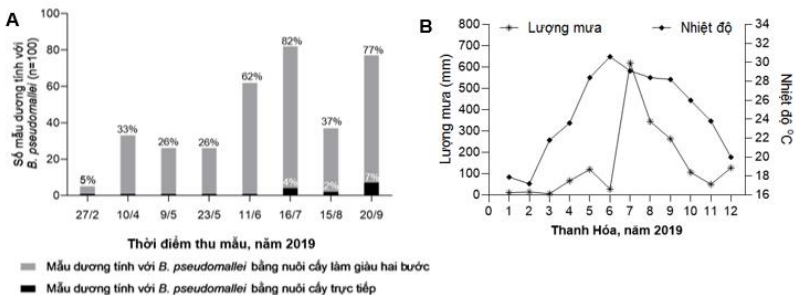
Phân lập vi khuẩn *B. pseudomallei* được thực hiện với 408 dịch làm giàu của 51 mẫu đất dương tính từ xét nghiệm real-time PCR TTSS1 ở trên. Lượng mẫu 100 μ L được cấy trải trên đĩa thạch Ashdown, ủ tại 40°C trong 7 ngày. Kết quả cho thấy tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *B. pseudomallei* từ dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ (30/51; 58%) cao hơn so với các dịch làm giàu còn lại (Hình 3.6B). Kết quả được tóm tắt như sau: (i) nuôi cấy làm giàu trên TBSS-C50 hoặc EM trong 144 giờ làm tăng khả năng sinh trưởng của *B. pseudomallei* và tăng số mẫu dương tính so với nuôi cấy làm giàu trên TBSS-C50 48 giờ theo hướng dẫn chuẩn. (ii) làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) giúp cho *B. pseudomallei* sinh trưởng mạnh mẽ nhất và cho số mẫu dương tính nuôi cấy cao gấp 6 lần so với TBSS-C50 48 giờ.

3.2.2. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước trong điều tra sự có mặt của *B. pseudomallei* ngoài môi trường

3.2.2.1. Điều tra sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa tại huyện Triệu Sơn-tỉnh Thanh Hóa

Điều tra tần xuất bắt gặp vi khuẩn *B. pseudomallei* trong 800 mẫu nước ruộng lúa (100 mẫu/thời điểm) cho thấy có sự biến động lớn giữa các thời điểm thu thập mẫu (Hình 3.8A). Số mẫu dương tính tăng khi nền nhiệt độ tại khu vực lấy mẫu tăng (Hình 3.8B). Tổng số mẫu nước dương tính với *B. pseudomallei* thu từ tháng 6 đến tháng 9 là 258/400 (64,5%), cao gấp gần 3 lần so với tổng số mẫu dương thu từ tháng 2 đến tháng 5 (90/400, 22,5%). Nhiệt độ môi trường trung bình tại tỉnh Thanh Hóa từ tháng 2-5 là 22,75°C thấp hơn đáng kể so với tháng 6-9 (29,1°C). Ghi nhận này cho thấy nhiệt độ môi trường có mối tương quan với tần xuất bắt gặp vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa.

Kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước phát hiện 348/800 (43,5%) mẫu dương tính với *B. pseudomallei*, trong khi đó kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp chỉ phát hiện được 13/800 (1,6%) mẫu dương tính với *B. pseudomallei*. Đáng chú ý, kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp chỉ phát hiện được vi khuẩn *B. pseudomallei* ở các tháng 7, 8 và 9 với số mẫu dương tính lần lượt là 4, 2 và 7/100 và mật độ trung bình lần lượt là 32; 25 và 158 CFU/mL. Kết quả này chứng minh nhiệt độ ảnh hưởng không chỉ đến tần xuất bắt gặp mà còn đến mật độ vi khuẩn.



Hình 3.8. (A) Số mẫu nước dương tính với vi khuẩn *B. pseudomallei* ở 8 thời điểm lấy mẫu bằng 2 kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp và làm giàu hai bước; (B) Nhiệt độ và lượng mưa trung bình tháng tại tỉnh Thanh Hóa năm 2018

20 chủng *B. pseudomallei* gồm 13 chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* được phân lập trực tiếp từ mẫu nước và 6 chủng được phân lập từ dịch nuôi cấy làm giàu, 1 chủng được phân lập từ đất ruộng (năm 2015) được lựa chọn cho phân tích MLST. Kết quả cho thấy các chủng này thuộc 5 ST gồm ST541 (n=1), ST543 (n=2), ST533 (n=3), ST542 (n=5) và ST1994 (là ST mới) (n=9). Tại cùng một thời điểm lấy mẫu, các vị trí mẫu gần nhau có xu hướng xuất hiện các ST giống nhau và các điểm xa nhau có xu hướng gặp các ST khác nhau. Mặc dù mỗi mẫu được phân lập ngẫu nhiên 1 chủng, và chỉ có 20 chủng được lựa chọn cho phân tích MLST, nhưng kết quả đã cho thấy sự đa dạng của các dòng vi khuẩn *B. pseudomallei* lưu hành trong nước ruộng lúa ở một khu vực lấy mẫu hẹp.

3.2.2.2. Điều tra sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường tại huyện Sóc Sơn-Tp. Hà Nội

Tháng 11/2019, Trung tâm Y tế Sóc Sơn báo cáo về 3 trường hợp trẻ em tử vong trong cùng một gia đình tại huyện Sóc Sơn (Tp Hà Nội) do nhiễm khuẩn *B. pseudomallei* trong vòng 8 tháng. Điều tra nguồn lây nhiễm vi khuẩn *B. pseudomallei* cho thấy 2/3 mẫu nước giếng khoan A dương tính với *B. pseudomallei* bằng nuôi cấy làm giàu 2 bước và 1/3 mẫu dương tính bằng nuôi cấy trực tiếp với mật độ 1-3 CFU/mL, trong khi các mẫu nước giếng B, C và mẫu đất đều âm tính. Tất cả các mẫu nước được lấy từ téc nước bơm từ giếng tương ứng.

Sau khi phát hiện *B. pseudomallei* trong nước giếng khoan A, đợt thu mẫu lần thứ 2 đã được tiến hành nhằm mở rộng điều tra nguồn ô nhiễm. Theo thông tin được cung cấp, giếng khoan A được khoan vào năm 2010. Sau 5 năm, gia đình đã cải tạo khu vườn xung quanh giếng khoan A (phía sau nhà) bằng cách phủ lên vườn một lớp đất, dẫn đến làm miệng lỗ khoan nằm dưới bề mặt đất khoảng 80 cm. Cuối năm 2018, bộ phận côn thu trong đường ống hút của máy bơm nước bị hỏng

và được sửa chữa. Nhưng sau đó, miệng lỗ khoan không được bịt kín, việc này có thể đã tạo điều kiện cho nước mưa kéo theo các hạt đất bề mặt bị nhiễm *B. pseudomallei* chảy vào mạch nước ngầm qua miệng lỗ khoan bị hở. Để kiểm tra giả thuyết này, nghiên cứu đã tập trung vào việc thu mẫu nước giếng A và đất vườn xung quanh giếng A. Kết quả cho thấy 26/26 (100%) mẫu nước bơm trực tiếp từ giếng A và 27/46 (58,7%) mẫu đất vườn tại 8/10 (80%) điểm dương tính với *B. pseudomallei*. Trong đó, nuôi cấy trực tiếp chỉ phát hiện 5 mẫu đất vườn tại 2 điểm dương tính với *B. pseudomallei*, trong khi nuôi cấy làm giàu 2 bước phát hiện thêm 26 mẫu nước giếng A, 22 mẫu đất vườn và 5 mẫu đất ruộng. Điều này chứng minh giả thuyết *B. pseudomallei* có thể bị kéo theo cùng với đất bề mặt vào mạch nước ngầm qua miệng giếng khoan không đậy kín trong mùa mưa năm sau, bắt đầu từ tháng 4/2019, trùng thời điểm phát bệnh và tử vong của đứa trẻ đầu tiên. Nuôi cấy định lượng phát hiện 5 mẫu đất vườn tại 2 vị trí thu mẫu có mật độ *B. pseudomallei* trung bình là 406 CFU/g đất (dao động từ 12 đến 746 CFU/g đất) (Bảng 3.21).

Bảng 3.21. Kết quả nuôi cấy xác định sự có mặt của *B. pseudomallei* trong đất và nước thu thập tại gia đình nạn nhân và khu vực xung quanh tại thôn Đô Lương, xã Bắc Sơn, huyện Sóc Sơn, Hà Nội

| Loại mẫu | Số mẫu | Số điểm | Số mẫu dương tính bằng làm giàu 2 bước / tổng số mẫu (%) | Số mẫu dương tính bằng nuôi cấy trực tiếp / tổng số mẫu (%) (Mật độ CFU/g; CFU/mL, khoảng) |
|---|--------|---------|--|--|
| Thu mẫu lần 1 (17/11/2019) | | | | |
| Đất vườn trước | 7 | 7 | 0/7 (0) | 0/7 (0) |
| Nước giếng A | 3 | 1 | 3/3 (100) | 3/3 (100) (1-3) |
| Nước giếng B | 3 | 1 | 0/3 (0) | 0/3 (0) |
| Nước giếng C | 3 | 1 | 0/3 (0) | 0/3 (0) |
| Nước uống | 1 | 1 | 0/1 (0) | 0/1 (0) |
| Thu mẫu lần 2 (23/11/2019) | | | | |
| Đất vườn sau, cạnh giếng A | 46 | 10 | 27/46 (58,7) | 5/46 (10,8) (12-746) |
| Đất ruộng lúa | 40 | 8 | 5/40 (12,5) | 0/40 |
| Nước giếng A | 26 | 1 | 26/26 (100) | 0/26 |
| Nước giếng B | 3 | 1 | 0/3 (0) | 0/3 |
| Nước giếng C | 3 | 1 | 0/3 (0) | 0/3 |
| Nước giếng hàng xóm | 33 | 11 | 0/33 (0) | 0/33 |
| Nước ao | 30 | 10 | 0/30 (0) | 0/30 |
| Tỉ lệ mẫu dương tính/tổng số mẫu | | | 61/198 (30,96%) | 8/198 (4,06%) (1-746 CFU/g/mL) |

Mối quan hệ di truyền của các chủng *B. pseudomallei* từ ngoài môi trường và trong lâm sàng được phân tích, kết quả cho thấy cả 20 chủng đều thuộc ST 541, các chủng được phân lập từ giếng A (n=7), đất vườn quanh giếng A (n=6), đất ruộng (n=5) và bệnh nhân (n=2).

KẾT LUẬN

1. Phát triển và ứng dụng kỹ thuật miễn dịch xét nghiệm nhanh melioidosis từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng

Phát triển thành công kỹ thuật WC/Hcp1-ELISA sử dụng kháng nguyên từ chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 thuộc ST46 phổ biến ở Việt Nam để xét nghiệm melioidosis ở người Việt có độ nhạy và độ đặc hiệu cao tương ứng là 98,4% và 95,1%. WC/Hcp1-ELISA phát hiện 52/511 (10,2%) và 41/500 (8,2%) mẫu huyết thanh dương tính với melioidosis tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh và BV TƯ Huế. Trong đó, có 14/14 (100%) và 21/23 (91,3%) bệnh nhân dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy tại 2 bệnh viện trên được phát hiện bằng WC/Hcp1-ELISA.

2. Phát triển và ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy có độ nhạy cao để điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường.

Phát triển thành công kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) điều tra *B. pseudomallei* trong đất với tỷ lệ phát hiện cao hơn gần 2 lần so với hướng dẫn chuẩn (TBSS-C50 48 giờ) khi đánh giá bằng real-time PCR TTSS1; cao hơn 6 lần khi đánh giá bằng phân lập trên đĩa thạch Ashdown. Kỹ thuật làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) phát hiện 348/800 (43,5%) số mẫu nước ruộng lúa tại Triệu Sơn-Thanh Hóa; 100% mẫu nước giếng tắm và 57,8% mẫu đất vườn tại Sóc Sơn-Hà Nội dương tính với *B. pseudomallei*.

KIẾN NGHỊ

1. Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu chính xác của kỹ thuật xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA trên bệnh nhân nghi ngờ melioidosis tại ba thời điểm là: nhập viện, điều trị và tái khám sau xuất viện 2 tuần; so sánh chúng với phương pháp nuôi cấy và real-time PCR.
2. Đánh giá độ nhạy của kỹ thuật làm giàu hai bước TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ trên các loại mẫu đất và nước.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Tran Q.T.L.**, Phan P.H., Bui L.N.H., Bui H.T.V., Hoang N.T.B., Tran D.M., Trinh T.T. (2022), “Child Melioidosis Deaths Caused by *Burkholderia pseudomallei*-Contaminated Borehole Water, Vietnam, 2019”, *Emerg Infect Dis.* Vol. 28(8), pp.1689-1693.
2. **Tran Q.T.L.**, Nguyen H.V., Pham H.T., Mai T.V., Nguyen Q.H.M., Le D.V., Bui L.N.H., Hoang L.T.H., Hoang T.Q., Trinh T.T. (2022), “Clinical Utility of Combined Whole-cell Antigen and Recombinant Hemolysis Co-regulated Protein 1-Enzyme-linked Immunosorbent Assays Reveals Underdiagnosed Cases of Melioidosis in Vietnam”, *Am J Trop Med Hyg.* Vol. 107(3), pp. 585-91.
3. **Trần Thị Lệ Quyên**, Nguyễn Thị Tình, Bùi Nguyễn Hải Linh, Đỗ Quốc Tuấn, Trần Anh Đào, Phạm Thị Huyền, Trịnh Hồ Tình, Quế Anh Trâm, Hoàng Quang Trung, Trịnh Thành Trung (2020), “Đánh giá kháng nguyên tái tổ hợp hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) trong chẩn đoán nhanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore) bằng kỹ thuật ELISA”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, Tập 62 (9) 9, tr. 26-31.