

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ ĐỂ XÁC ĐỊNH CÁC KIỂU HUYẾT THANH CỦA LIÊN CẦU TAN HUYẾT NHÓM B PHÂN LẬP TỪ ĐƯỜNG SINH DỤC PHỤ NỮ MANG THAI

Trần Quang Hanh¹, Nguyễn Việt Lượng², Đỗ Ngọc Ánh².

Mục tiêu: ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để giám định và xác định các kiểu huyết thanh của liên cầu tan huyết nhóm B phân lập từ đường sinh dục phụ nữ mang thai 35 - 37 tuần. **Đối tượng và phương pháp:** 69 chủng vi khuẩn liên cầu tan huyết nhóm B được phân lập từ phụ nữ mang thai 35 - 37 tuần tại Bệnh viện Sản - Nhi tỉnh Nghệ An trong thời gian từ tháng 5/2018 đến 7/2019. Các chủng vi khuẩn liên cầu tan huyết nhóm B được giám định loài bằng nhệm Gram, thử nghiệm CAMP và sử dụng cặp mồi đặc hiệu khuếch đại gen *dltS*. Các kiểu huyết thanh được xác định bằng kỹ thuật PCR đa mồi. **Kết quả:** nghiên cứu đã xác định được 7 kiểu huyết thanh Ia, Ib, II, III, V, VI, VII ở phụ nữ mang thai 35 - 37 tuần. Trong đó, kiểu III (n = 27/69; 39,13%) và V (n = 22/69; 31,89%) chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp theo lần lượt là kiểu Ia (n = 8/69; 11,59%), VI (n = 8/69; 11,59%), Ib (n = 2/69; 2,90%), II (n = 1/69; 1,45%) và VII (n = 1/69; 1,45%). Các kiểu huyết thanh IV, VIII và IX không xuất hiện trong nghiên cứu này. **Kết luận:** đây là nghiên cứu đầu tiên xác định các kiểu huyết thanh của liên cầu tan huyết nhóm B phân lập từ người tại Việt Nam. **Khuyến nghị:** cần có thêm các nghiên cứu khác để làm rõ hơn phân bố các kiểu huyết thanh của liên cầu tan huyết nhóm B ở Việt Nam.

Từ khóa: sinh học phân tử, liên cầu tan huyết nhóm B, kiểu huyết thanh.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Liên cầu tan huyết nhóm B (Group B *Streptococcus*, GBS), còn gọi là *Streptococcus agalactiae*, có khả năng gây bệnh ra các bệnh cảnh trầm trọng ở trẻ sơ sinh, người già và người có hệ miễn dịch bị tổn thương với tỷ lệ mắc và tử vong cao^{[1],[2]}. Một phân tích đa trung tâm trên toàn thế giới cho thấy, trung bình có khoảng 49 trong tổng 100.000 trẻ sơ sinh bị nhiễm trùng GBS xâm lấn. Nguyên nhân chủ yếu là do lây truyền từ mẹ trong quá trình chuyển dạ^[3]. Ước tính khoảng 10% đến 30% phụ nữ mang thai nhiễm liên cầu tan huyết nhóm B không có triệu chứng^[2]. Nhiễm GBS ở phụ nữ mang thai liên quan tới 10 - 60% các trường hợp xảy thai và thai chết non^{[2],[3]}. Do vậy, chẩn đoán và

điều trị và dự phòng nhiễm GBS ở phụ nữ mang thai có vai trò rất quan trọng đối với trẻ sinh ra^[4].

Dựa vào cấu kháng nguyên bề mặt, liên cầu tan huyết nhóm B được chia làm 10 kiểu huyết thanh với tên gọi là Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, and IX^[2]. Các nghiên cứu dịch tễ cho thấy, phân bố các kiểu huyết thanh thay đổi theo khu vực địa lý. Tuy nhiên, chiếm ưu thế nhất thường là kiểu huyết thanh III, tiếp theo là các kiểu huyết thanh Ia, Ib, II và V^{[2],[5]}. Do kiểu huyết thanh được xác định là yếu tố độc lực quan trọng nên xác định nhiễm và kiểu huyết thanh của vi khuẩn GBS ở mẹ không chỉ giúp ngăn ngừa nhiễm ở trẻ đẻ ra mà còn góp phần cung cấp dữ liệu dịch tễ, phát triển vắc xin an toàn, phù hợp để phòng chống tác hại GBS^[5].

Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm GBS ở phụ nữ mang thai nhưng chưa có nghiên cứu nào xác định các kiểu huyết thanh của vi khuẩn này. Theo Trung tâm kiểm soát và phòng chống bệnh tật Hoa Kỳ, xác định nhiễm và kiểu huyết thanh của GBS ở phụ nữ

¹Bệnh viện Sản - Nhi tỉnh Nghệ An. ²Học viện Quân y.

Ngày nhận bài: 08/10/2020.

Ngày phân biệt xong: 15/12/2020.

Ngày duyệt đăng: 03/02/2021.

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Trần Quang Hanh, Bệnh viện Sản - Nhi tỉnh Nghệ An.

Điện thoại: 0919753567. E-mail: tranquanghanh@yahoo.com.

mang thai là cần thiết để ngăn ngừa nhiễm căn nguyên này ở trẻ đẻ ra^[5]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu: xác định các kiểu huyết thanh của vi khuẩn liên cầu tan huyết nhóm B phân lập ở phụ nữ mang thai sử dụng kỹ thuật khuếch đại gen đa môi.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên các chủng vi khuẩn GBS phân lập từ phụ nữ mang thai 35 đến 37 tuần tại Bệnh viện Sản nhi tỉnh Nghệ An trong thời gian từ 5/2018 đến 7/2019. Các chủng vi khuẩn này được phân tích xác định kiểu huyết thanh tại Labo công nghệ cao của Học viện Quân y.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử.

Cỡ mẫu nghiên cứu: gồm 69 chủng vi khuẩn GBS được phân lập từ đường sinh dục phụ nữ tuổi sinh đẻ mang thai 35 - 37 tuần.

Phân lập vi khuẩn liên cầu tan huyết nhóm B: 69 chủng GBS được phân lập bằng cách lấy dịch sinh dục cấy trên môi trường thạch máu cừu (5%) và ủ 24 giờ ở 37°C trong tủ vi sinh chứa 5% CO₂. Sau đó, các mẫu dương tính được cấy chuyển sang đĩa thạch máu cừu khác và ủ tiếp 24 giờ ở 37°C trong tủ vi sinh chứa 5% CO₂. Tiếp đó, tiến hành nhuộm gram và thử nghiệm CAMP để xác định vi khuẩn là GBS dựa vào hình thái. Khuẩn lạc của các mẫu có hình thái phù hợp với GBS được lấy ra hòa vào dung dịch NaCl 0,9% để tách chiết ADN sau đó giám định loài bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu và xác định kiểu huyết thanh bằng kỹ thuật khuếch đại gen lồng đa môi (PCR đa môi). Những bệnh nhân dương tính với vi khuẩn GBS được thu thập một số thông tin cá nhân như tuổi, khu vực sinh sống, tuổi thai...

Tách chiết ADN vi khuẩn GBS: ADN tổng số của vi khuẩn GBS được tách chiết bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA Mini Kit (Cat.No51304, QIAGEN, Hilden, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN sau khi tách chiết được đo nồng độ và kiểm tra chất lượng bằng thiết bị NanoDropTM 2000 Spectrophotometer ở bước sóng 260nm (Thermo Fisher Scientific, USA). Các mẫu ADN sau đó được bảo quản ở -20°C cho tới khi chạy PCR để xác định loài và kiểu huyết thanh.

Định danh và xác định kiểu gen vi khuẩn GBS bằng sinh học phân tử

Các chủng vi khuẩn GBS được định danh bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu *dltS-F* và *dltS-R*. Các kiểu huyết thanh của vi khuẩn GBS được xác định bằng kỹ thuật PCR đa môi với các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế trên các gen đích khác nhau dựa theo mô tả của Poyart và CS (2007)^[1].

Giải trình tự gen: sản phẩm PCR với cặp mồi *dltS-F* và *dltS-R* của một số chủng GBS được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm GeneJET PCR purification Kit (#K0701, Thermo Fisher Scientific, USA) rồi gửi tới hãng First BASE Laboratories Sdn Bhd service (Kembangan 43300, Selangor, Malaysia) để giải trình tự cả 2 chiều bằng chính các cặp mồi sử dụng chạy PCR. Các trình tự thu được được phân tích, ghép cặp, chỉnh sửa bằng các phần mềm tin sinh Mega 6.0 và BioEdit.

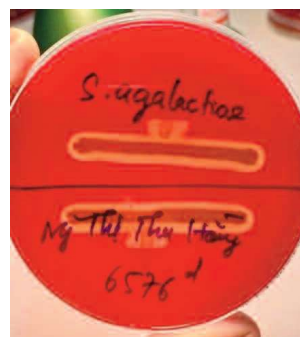
Biến số nghiên cứu: các biến số là các biến định tính, bao gồm: tỷ lệ các kiểu huyết thanh, tần suất các kiểu huyết thanh theo khu vực địa lý, theo nhóm tuổi.

Xử lý và phân tích số liệu: các số liệu nghiên cứu được mã hóa, nhập liệu, xử lý và phân tích bằng phần mềm như SPSS 20.0 for windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Trình tự đoạn gen *dltS* được phân tích bằng cách so sánh với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen sử dụng công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

KẾT QUẢ

Kết quả giám định loài GBS bằng sinh học phân tử

Toàn bộ 69 có kết quả định danh bằng hình thái (nhuộm Gram, CAMP test) phù hợp với GBS cũng cho kết quả PCR với cặp mồi đặc hiệu *dltS-F* và *dltS-R* phù hợp với vi khuẩn GBS (Hình 1). 04 đoạn trình tự gen *dltS* của 04 chủng GBS khác nhau được cấp mã số trên ngân hàng gen (Bảng 2).



Hình 1. Kết quả thử nghiệm CAMP test chủng vi khuẩn GBS thu thập ở bệnh nhân Nguyễn Thị Thu H

Bảng 2. Mã số trên ngân hàng gen của một số chủng GBS

TT	Ký hiệu chủng vi khuẩn	Gene đích	Kích thước đoạn gen đăng ký (bp)	Mã số trên ngân hàng gen
1	GBS21	<i>dltS</i>	952	MN095196
2	GBS26	<i>dltS</i>	952	MN095197
3	GBS31	<i>dltS</i>	952	MN095198
4	GBS32	<i>dltS</i>	952	MN095199

Kết quả xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn GBS

Toàn bộ 69 chủng GBS đều được xác định kiểu huyết thanh bằng các phản ứng PCR đa môi. Trong nghiên cứu này, 3 phản ứng khuếch đại gen đa môi đã được thiết lập để xác định các kiểu huyết thanh của GBS (Bảng 3).

Bảng 3. Các phản ứng khuếch đại gen đa môi sử dụng để xác định các kiểu huyết thanh của vi khuẩn GBS

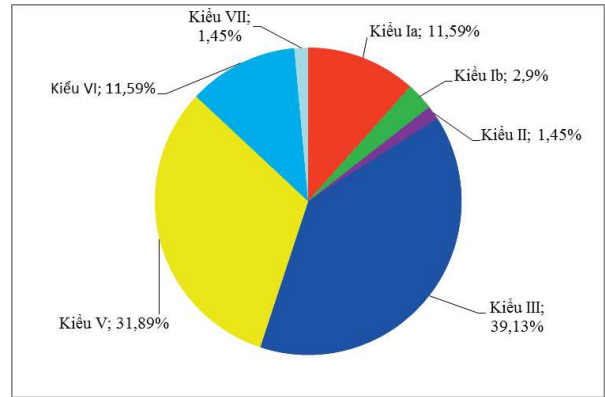
Phản ứng	Kiểu huyết thanh	Chu trình nhiệt
PCR đa môi 1	Ia, Ib, II và III	1 chu kỳ 95°C/5 phút; 35 chu kỳ [94°C/60 giây, 59°C/60 giây và 72°C/60 giây]; 1 chu kỳ 72°C/10 phút
PCR đa môi 2	IV và V	1 chu kỳ 95°C/5 phút; 35 chu kỳ [94°C/60 giây, 58°C/60 giây và 72°C/60 giây]; 1 chu kỳ 72°C/10 phút
PCR đa môi 3	VI, VII và VIII	1 chu kỳ 95°C/5 phút; 35 chu kỳ [94°C/60 giây, 60°C/60 giây và 72°C/60 giây]; 1 chu kỳ 72°C/10 phút

Bằng các phản ứng PCR đa môi, nghiên cứu này đã xác định được 7 kiểu huyết thanh khác nhau của vi khuẩn GBS, gồm: Ia, Ib, II, III, V, VI, VII. Trong đó, các kiểu huyết thanh III và V chiếm tỷ lệ cao nhất, với 39,13% và 31,89%. Chi tiết phân bố các kiểu huyết thanh được trình bày trong Hình 3 và Bảng 4.

Bảng 4. Môi liên quan giữa kiểu huyết thanh của GBS với độ tuổi và khu vực sinh sống của phụ nữ mang thai

		Số lượng kiểu huyết thanh (Tỷ lệ %)							Tổng (tỷ lệ %)	P
		Ia	Ib	II	III	V	VI	VII		
Độ tuổi (năm)	< 30	6 (11.8)	1 (2.0)	1 (2.0)	19 (37.3)	16 (31.4)	7 (13.7)	1 (2.0)	51 (100)	0.894
	≥ 30	2 (11.1)	1 (5.6)	0 (0)	8 (44.4)	6 (33.3)	1 (5.6)	0 (0)	18 (100)	
Nơi sống	Nông thôn	4 (10.8)	1 (2.7)	0 (0)	13 (35.1)	14 (37.8)	4 (10.8)	1 (1.27)	37 (100)	0.767
	Thành thị	4 (12.5)	1 (3.1)	1 (3.1)	14 (43.8)	8 (25.0)	4 (12.5)	0 (0)	32 (100)	

Bảng 4 cho thấy, không có mối liên quan giữa nhóm tuổi (<30 tuổi và ≥30 tuổi), nơi sinh sống với các kiểu huyết thanh của GBS ở phụ nữ mang thai.



Hình 2. Phân bố các kiểu huyết thanh của vi khuẩn GBS



Hình 3. Minh họa sản phẩm các phản ứng PCR đa môi phát hiện các kiểu huyết thanh từ I - III (PCR1) và IV - V (PCR2) của 1 số chủng vi khuẩn GBS

Giếng 1, 2, 4: kiểu huyết thanh III; Giếng 3: không thuộc kiểu huyết thanh I - V; Giếng 5: kiểu huyết thanh Ia; Giếng 6: kiểu huyết thanh V; Giếng 9: kiểu huyết thanh Ib; Giếng 10: kiểu huyết thanh II; Giếng 7: chứng âm

BÀN LUẬN

Vi khuẩn liên cầu tan huyết nhóm B (GBS) là căn nguyên gây nhiễm trùng với tỷ lệ mắc và tỷ vong cao ở trẻ sơ sinh. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn này đang có xu hướng gia tăng ở nhiều quốc gia^[2]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, nhiễm GBS ở bà mẹ mang thai là yếu tố nguy cơ hàng đầu cho nhiễm GBS ở trẻ sơ sinh^[2,3]. Các kiểu huyết thanh III và V được xác định có liên quan tới nhiễm trùng xâm lấn ở trẻ sơ sinh^[3]. Theo Trung tâm kiểm soát và phòng chống bệnh tật Hoa Kỳ, sàng lọc nhiễm GBS ở tất cả phụ nữ mang thai 35 - 37 tuần là cần thiết để ngăn ngừa nhiễm GBS cho trẻ đẻ ra trong quá trình chuyển dạ^[5]. Tuy nhiên, hiện nhiễm vi khuẩn này ít được quan tâm nghiên cứu ở Việt Nam.

Kỹ thuật PCR đa môi được Poyart và CS (2007) phát triển để xác định các kiểu huyết thanh của vi khuẩn GBS bằng 2 tổ hợp phản ứng PCR đa môi, phản ứng thứ nhất phát hiện các kiểu huyết thanh Ia, Ib, II, III và IV, phản ứng thứ hai phát hiện các kiểu huyết thanh V, VI, VII và VIII^[1]. Kỹ thuật này sau đó được nhiều nghiên cứu sử dụng để xác định các kiểu huyết thanh của GBS ở các quốc gia và vùng lãnh thổ khác nhau^[5,6]. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng các cặp môi như mô tả của Poyart và CS (2007) nhưng chia ra làm 3 phản ứng PCR đa môi, phản ứng thứ nhất xác định các kiểu huyết thanh Ia, Ib, II và III; phản ứng thứ 2 xác định các kiểu huyết thanh IV và V; phản ứng thứ 3 phát hiện các kiểu huyết thanh VI, VII và VIII. Lý do chúng tôi thực hiện 3 phản ứng PCR đa môi là: khi ghép cặp các môi thành 2 phản ứng PCR đa môi giống như mô tả của Poyart và CS (2007) thì hình ảnh điện di có nhiều sản phẩm phụ, gây khó khăn cho việc phân tích kết quả.

Bằng kỹ thuật PCR đa môi thiết lập được, kết quả phân tích 69 chủng vi khuẩn GBS đã xác định được 7 kiểu

huyết thanh Ia, Ib, II, III, V, VI, VII và không thấy xuất hiện các kiểu huyết thanh IV, VIII và IX. Kiểu huyết thanh chiếm tỷ lệ cao nhất là III (n = 27; 39.13%), tiếp theo kiểu huyết thanh V (n = 22; 31;89%). Các kiểu huyết thanh Ia, Ib, II, VI và VII chiếm tỷ lệ từ 1,45% tới 11,59%. Theo các nghiên cứu trước, tần suất của các kiểu huyết thanh GBS có sự khác nhau giữa các quốc gia và khu vực địa lý^[2,5]. Ở phụ nữ mang thai tại Malaysia, các kiểu huyết thanh chiếm ưu thế là Ia và VI^[7], ở Trung Quốc là kiểu huyết thanh III^[5], ở Thái Lan là kiểu huyết thanh V^[8], ở châu Âu là các kiểu huyết thanh Ia, Ib, III và V^[6], ở Nam Phi là kiểu huyết thanh II^[2] và ở Ghana là các kiểu huyết thanh VII và IX^[9]. Sự khác biệt này có thể được giải thích là do các nghiên cứu thực hiện ở những thời điểm khác nhau trên những quần thể ở các vùng địa lý khác nhau^[2]. Các nghiên cứu trước còn cho thấy, phân bố các kiểu huyết thanh của GBS không chỉ khác nhau giữa các quốc gia mà còn khác nhau giữa các vùng trong chính quốc gia đó^[10]. Đáng lưu ý, kiểu huyết thanh VI ở nghiên cứu này chiếm tỷ lệ khá cao (11,59%). Kết quả này khác biệt với các thông báo về tần suất của kiểu huyết thanh này ở các quốc gia trên thế giới. Vì vậy, cần thực hiện thêm các nghiên cứu khác để làm rõ hơn phân bố các kiểu huyết thanh của vi khuẩn GBS ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định 7 kiểu huyết thanh Ia, Ib, II, III, V, VI, VII của vi khuẩn liên cầu tan huyết nhóm B phân lập ở phụ nữ mang thai. Trong đó, các kiểu huyết thanh III và V chiếm tỷ lệ cao nhất.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Bệnh viện Sản - Nhi tỉnh Nghệ An và Học viện Quân y đã hỗ trợ thu thập bệnh phẩm, phân tích mẫu phục vụ nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H et al (2007). Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B *Streptococci*. *J Clin Microbiol*, 45(6):1985-1988.
2. Mukesi M, Iweriebor BC, Obi LC et al (2019). Prevalence and capsular type distribution of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Namibia and South Africa. *BMC Infectious Diseases*, 19(1):179.
3. Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M et al (2017). Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 65(suppl 2):S160-S172.
4. Ballard MS, Schonheyder HC, Knudsen JD et al (2016). The changing epidemiology of group B *Streptococcus* bloodstream infection: a multi-national population-based assessment. *Infect Dis (Lond)*, 48(5):386-391.
5. Lu B, Li D, Cui Y et al (2014). Epidemiology of Group B *Streptococcus* isolated from pregnant women in Beijing, China. *Clin Microbiol Infect*, 20(6):370-373.
6. Ippolito DL, James WA, Tinnemore D et al (2010). Group B *Streptococcus* serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. *BMC infectious diseases*, 10:336.
7. Karunakaran R, Raja NS, Hafeez A et al (2009). Group B *Streptococcus* infection: epidemiology, serotypes, and antimicrobial susceptibility of selected isolates in the population beyond infancy (excluding females with genital tract- and pregnancy-related isolates) at the University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur. *Jpn J Infect Dis*, 62(3):192-194.
8. Whitney CG, Daly S, Limpongsanurak S et al (2004). The international infections in pregnancy study: group B streptococcal colonization in pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 15(4):267-274.
9. Slotved H-C, Dayie NTKD, Banini JAN et al (2017). Carriage and serotype distribution of *Streptococcus agalactiae* in third trimester pregnancy in southern Ghana. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 17(1):238.
10. Africa CWJ, Kaambo E (2018). Group B *Streptococcus* Serotypes in Pregnant Women From the Western Cape Region of South Africa. *Front Public Health*, 6(356):1-11.

APPLICATION OF MOLECULAR TOOLS FOR IDENTIFICATION OF GROUP B STREPTOCOCCUS SEROTYPES ISOLATED FROM VAGINA OF PREGNANT WOMEN

Summary

Objectives: The aim of this study is to identify and detect the serotypes of group B *Streptococcus* isolated from the vagina of pregnant women using molecular tools. **Subjects and methods:** Group B *Streptococcus* (GBS) were isolated from pregnant women at 35 - 37 weeks of gestation at the Nghean Obstetrics and Pediatrics Hospital, Vietnam between May 2018 and July 2019. Overall, 69 clinical isolates of GBS from vaginal swabs of pregnant mothers were identified using the Gram staining, CAMP test and specific PCR. In this study, a multiplex PCR method was used to distinguish between the nine known serotypes of GBS by three reactions. **Results:** The results

showed that seven serotypes of GBS were identified, including Ia, Ib, II, III, V, VI, and VII. In that, the most prevalent serotypes were III (n = 27/69; 39.13%) and V (n = 22/69; 31.89%), followed by serotypes Ia (n = 8/69; 11.59%), VI (n = 8/69; 11.59%), Ib (n = 2/69; 2.90%), II (n = 1/69; 1.45%) and VII (n = 1/69; 1.45%), respectively. Serotypes IV, VIII and IX were not found. **Conclusions:** This is the first study of GBS serotypes reported from human in Vietnam. Additional investigations should be made to clarify the serotypes of group B *Streptococcus* in Vietnam.

Key words: Molecular, group B *Streptococcus*, serotypes.