

Phát hiện liên cầu B ở phụ nữ mang thai bằng kỹ thuật SYBR Green real-time PCR

Nguyễn Thị Phúc Lộc¹, Nguyễn Hoàng Bách², Lê Văn An², Nguyễn Thị Châu Anh²

(1) Trường Đại học Duy Tân Đà Nẵng

(2) Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: Phát hiện liên cầu nhóm B ở phụ nữ có thai 35-37 tuần bằng kỹ thuật khuếch đại chuỗi gen SYBR real-time PCR và nuôi cấy. **Đối tượng và phương pháp:** Dùng khuếch đại gen real-time PCR với chất màu SYBR Green và nuôi cấy để phát hiện tình trạng mang LCB trên 116 phụ nữ có thai 35-37 tuần. **Kết quả:** Tỷ lệ phát hiện phụ nữ mang LCB là 9,5% (11 thai phụ) trong đó real-time PCR cho kết quả dương tính ở cả 11 thai phụ (9,5%), trong khi nuôi cấy chỉ dương tính với tỷ lệ 6% (ở 7 thai phụ). Khi so sánh 2 kỹ thuật nuôi cấy và real-time PCR, độ tương đồng của cả 2 phương pháp cao với chỉ số Kappa là 0,77. Kiểm tra sản phẩm real-time PCR bằng phân tích nhiệt độ tan chảy và điện di trên agarose để loại trừ phản ứng dương tính giả cho thấy kết quả kỹ thuật real-time PCR khuếch đại đúng vùng DNA đích mong muốn. **Kết luận:** Kỹ thuật real-time PCR với chất màu SYBR Green cho kết quả hữu ích, thực hiện dễ, giá thành thấp, phù hợp sử dụng để phát hiện nhanh LCB ở phụ nữ mang thai các phòng xét nghiệm ở Việt Nam có máy real-time PCR.

Từ khóa: liên cầu nhóm B (*Streptococcus agalactiae* hay LCB), real-time PCR, phụ nữ mang thai

Abstract

Detection of group B Streptococcus (GBS) in pregnant women by SYBR Green real-time PCR

Nguyen Thi Phuc Loc¹, Nguyen Hoang Bach², Le Van An², Nguyen Thi Chau Anh²

(1) Duy Tan University, Da Nang

(2) Microbiology Department, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Objectives: Application of SYBR Green real-time PCR and bacterial isolation methods to detect *Streptococcus agalactiae* (GBS) carriage in women at 35-37 weeks' gestation. **Patients and Method:** Use of SYBR Green real-time PCR and bacterial isolation methods to detect GBS in 116 women at 35 - 37 weeks' gestation. **Results:** The rate of carrier of GBS in women at 35 - 37 weeks gestation was 9.5% (11 pregnant women), in which real-time PCR method was positive in all positive GBS women, while bacterial culture method was positive at 6% (7 pregnant women). These methods (culture and real-time PCR) had substantial agreement with the value of Kappa is 0,77. Checking for the targeted sequence amplification of real-time PCR by the curve of melting temperature and agarose electrophoresis of amplified product, the real-time PCR product was correctly targeted at the expected genetic sequence. **Conclusion:** SYBR Green real-time PCR method for detecting GBS in pregnant women is useful, low-cost and easy for performing. Therefore, it is suitable for detecting GBS in diagnostic laboratories where real-time PCRs are available.

Key words: *Streptococcus agalactiae* (GBS), real-time PCR, pregnant woman.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus agalactiae hoặc liên cầu B (LCB) vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây nhiễm khuẩn ở trẻ sơ sinh [15]. LCB được truyền trực tiếp từ mẹ sang con trong quá trình sinh, các yếu tố làm dễ như ối vỡ sớm, chuyển dạ kéo dài [10]. Trong khi đó, có đến 10-30% phụ nữ mang thai nhiễm liên cầu B ở âm đạo và trực tràng [10].

Từ năm 2002, Trung tâm Kiểm soát và Phòng chống dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC) khuyến nghị việc sàng

lọc liên cầu B ở phụ nữ mang thai từ 35-37 tuần bằng kỹ thuật nuôi cấy như là tiêu chuẩn vàng nhằm giảm thiểu nguy cơ nhiễm trùng sơ sinh [13]. Tuy nhiên, kỹ thuật nuôi cấy lại cho kết quả chậm, độ nhạy thấp do có thể bỏ sót một số trường hợp vi khuẩn LCB bị ức chế sự phát triển ngay cả khi đã sử dụng môi trường chọn lọc. Hiện nay, CDC cũng đã mở rộng khuyến nghị về vấn đề sàng lọc LCB ở phụ nữ mang thai trong khoảng thời gian này bằng cách bổ sung thêm các kỹ thuật khuếch đại gen ngoài phương pháp nuôi

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Thị Châu Anh, email: ntcanh@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 21/1/2019, Ngày đồng ý đăng: 15/7/2019; Ngày xuất bản: 26/8/2019

DOI: 10.34071/jmp.2019.5.10

cấy [10]. PCR là kỹ thuật khuếch đại gen cho kết quả nhanh, độ đặc hiệu cao trong việc sàng lọc LCB đã được áp dụng ở nơi trên thế giới. Tuy nhiên, ở Việt Nam, vấn đề sàng lọc LCB ở phụ nữ mang thai vẫn chưa được quan tâm nhiều. Cả 2 phương pháp nuôi cấy và PCR này vẫn còn chưa được sử dụng như là kỹ thuật thường quy tại các cơ sở y tế tại Việt Nam. Với những lý do nêu trên, chúng tôi thực hiện đề tài “Phát hiện liên cầu b ở phụ nữ mang thai bằng kỹ thuật SYBR Green real-time PCR” nhằm xây dựng quy trình kỹ thuật SYBR Green real-time PCR để áp dụng phát hiện nhanh, chính xác tỷ lệ LCB ở phụ nữ mang thai.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

Đối tượng nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành tại bệnh viện Đại học Y Dược Huế. Trong thời gian từ tháng 3/2017 đến tháng 01/2018 những thai phụ đến khám thai và sinh tại Bệnh viện Đại học Y Dược Huế có hội đủ các tiêu chuẩn (1) tuổi thai từ 35 - 37 tuần, (2) không đặt thuốc âm đạo trong vòng 48 giờ trước khi khám, (3) đồng ý thực hiện đúng quy trình nghiên cứu và (4) đồng ý tham gia nghiên cứu sẽ được chọn vào mẫu nghiên cứu.

Hai trăm ba mươi hai (232) mẫu âm đạo và trực tràng được thu thập (1 mẫu âm đạo và 1 mẫu trực tràng) từ 116 phụ nữ mang thai từ 35 - 37 tuần. Mẫu sau khi thu thập được chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Vi sinh trong vòng 2 giờ.

Vật liệu nghiên cứu:

- Nhóm nghiên cứu sử dụng các gen mồi tự thiết kế dùng trong kỹ thuật khuếch đại một đoạn gen có kích thước 281bp, các gen mồi nằm trong vùng gen *cfb* mã hóa cho yếu tố CAMP là yếu tố đặc hiệu cho liên cầu B [6, 11].

Mồi thuận (FP): 5'-TGGAAGCTCTAGTGGCTGGTG-CAT-3'

Mồi ngược (RP): 5'-TGTCTCAGGGTTGGCACGCA-3'

- Bộ kit chiết DNA, sinh phẩm dùng để thực hiện real-time gồm bộ sinh phẩm iPremiumTM SYBR Green qPCR Master Mix của Công ty Việt Á (Viet A Technology Corporation, Ho Chi Minh City, Viet Nam).

- Môi trường cấy BHI, BHA (Becton Dickinson, USA) để phân lập LCB và bộ kit Strep-B-Latex (SSI

Diagnostica, Denmark) để định danh LCB.

Quy trình thực hiện

Tách DNA từ mẫu nghiệm.

Tách chiết DNA của vi khuẩn từ 200 µl mỗi mẫu bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của Công ty Việt Á. Dung dịch 50 µl TE chứa DNA được bảo quản ở -20°C đến khi thực hiện.

Thực hiện SYBR Green real-time PCR:

Thể tích phản ứng PCR là 25µl, trong đó 12,5 µl SYBR Green qPCR Master Mix, 1 µl mỗi thuận, 1 µl mỗi ngược, 5 µl dịch tách DNA và 4,5 µl nước cất tinh khiết. Quy trình được thực hiện với máy real-time PCR (Mx3000P qPCR system) với chương trình nhiệt: 95°C trong 10 phút; sau đó là 95°C trong 30 giây, 62°C trong 30 giây, và 72°C trong 30 giây, chu kỳ trên được lặp lại 40 lần. Phân tích kết quả với phần mềm Mx Pro (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA), mẫu nghiệm dương khi đường cong tín hiệu chất màu SYBR Green vượt qua đường cơ bản và có chu kỳ ngưỡng < 35 Ct và khi chứng âm luôn âm tính. Sản phẩm 281bp DNA có đường cong Tm tương ứng với Tm của mẫu chứng dương. Chất màu SYBR Green có thể kết hợp với bất kỳ sản phẩm DNA không đặc hiệu tạo thành, do vậy trong quá trình tối ưu với những mẫu dương tính ban đầu được kiểm tra điện di trên gel agarose 2% và nhuộm màu dye. Đọc dưới máy đọc huỳnh quang transilluminator. Kết quả dương tính khi xuất hiện sản phẩm DNA có kích thước 281bp.

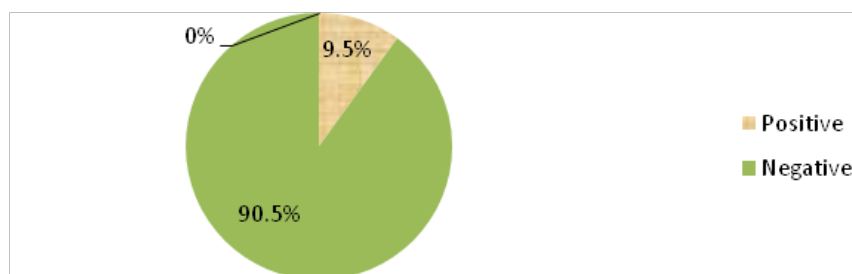
Nuôi cấy liên cầu B

Mỗi mẫu dịch ngoáy âm đạo/trực tràng cũng được nuôi cấy trong ống nghiệm chứa 2ml BHI với chất chọn lọc (colistin sulphate (10 mg/ml) and oxolinic acid (5 mg/ml)). LCB được phân lập trên môi trường thạch BHA có bổ sung 5% máu thỏ và ủ ở 37°C/24 - 48 giờ. LCB được xác định dựa vào tính chất hình thái và bắt màu dưới kính hiển vi, tính chất tan máu của khuẩn lạc, phản ứng catalase âm và phản ứng ngưng kết latex và sự có mặt của gen *cfb* (CAMP) bằng kỹ thuật real-time PCR nêu trên.

Thai phụ được xác định có LCB khi real-time PCR dương tính và/hoặc nuôi cấy LCB dương tính ở mẫu nghiệm ngoáy âm đạo hoặc/và trực tràng.

3. KẾT QUẢ

Nghiên cứu sử dụng 2 kỹ thuật nuôi cấy và SYBR Green real-time PCR để phát hiện LCB ở 232 mẫu nghiệm (âm đạo và trực tràng/1 thai phụ) ở 116 thai phụ. Tỷ lệ phát hiện LCB ở âm đạo (ÂĐ) hoặc/ và trực tràng (TT) của các thai phụ là 9,5% (11/116) (Hình 1). Nghiên cứu cho thấy 2 kỹ thuật nuôi cấy và PCR này có độ tương đồng cao với có chỉ số Kappa là 0,77 (Bảng 1).



Hình 1. Tỷ lệ thai phụ có LCB

Bảng 1. Kết quả kỹ thuật real-time PCR dựa theo nuôi cấy

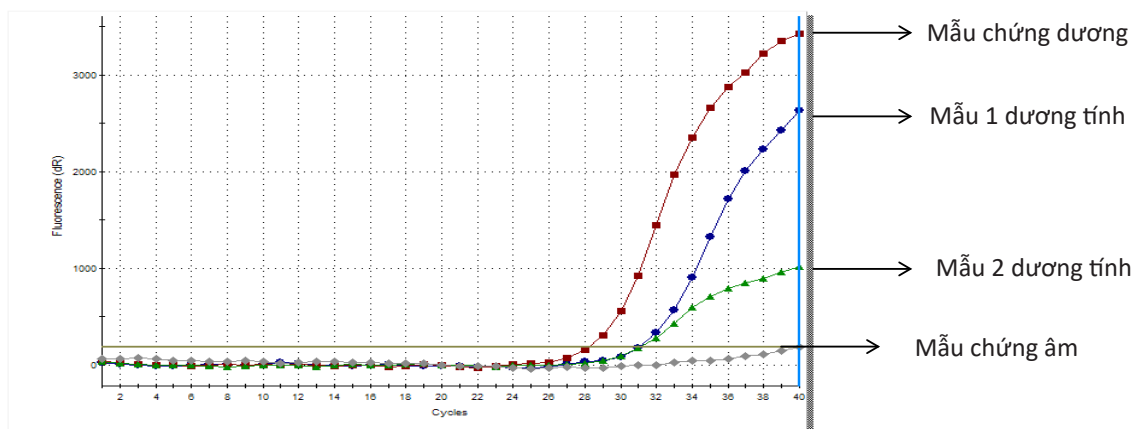
n = 232	Nuôi cấy (+)	Nuôi cấy (-)	Tổng
PCR (+)	7	4	11
PCR (-)	0	221	221
Tổng	7	225	232

Ở 11 phụ nữ có mang LCB đều được xác định bằng real-time PCR ở hoặc mẫu nghiệm ngoáy âm đạo hoặc trực tràng, trong đó có 2 thai phụ (1,7%) cho kết quả dương tính ở cả hai loại mẫu nghiệm âm đạo và trực tràng. Có 07 thai phụ (6%) vừa có nuôi cấy vi khuẩn dương tính và real-time PCR dương tính ở mẫu nghiệm dịch âm đạo hoặc trực tràng. Có 04 trường hợp mang LCB (3,4%) chỉ được xác định bằng real-time PCR, trong đó 01 mẫu nghiệm từ âm đạo và 03 mẫu nghiệm từ trực tràng (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả real-time PCR và phân lập nuôi cấy LCB theo bệnh phẩm

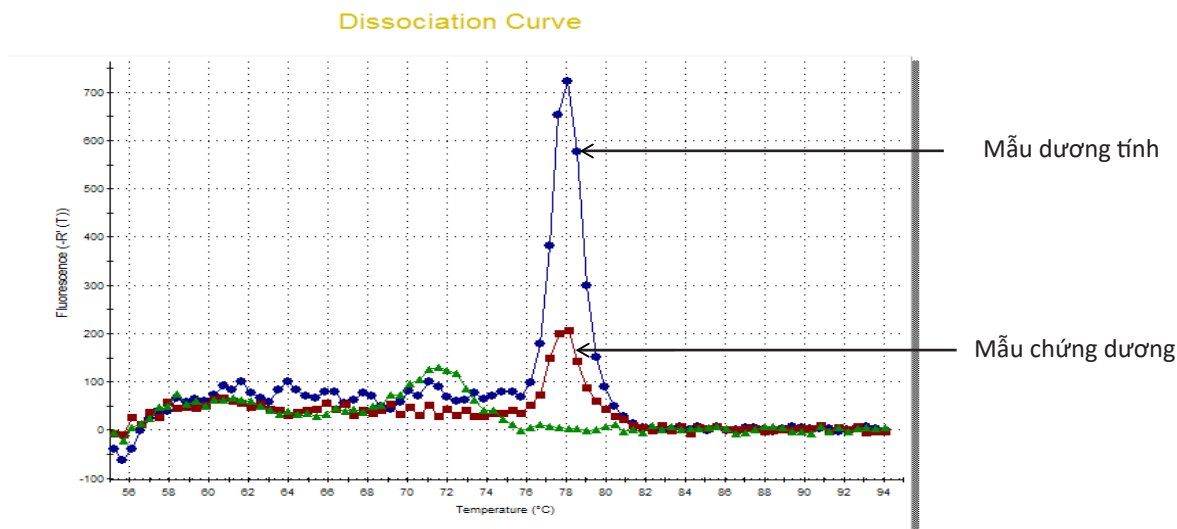
n = 116	real-time PCR (+)			Tổng
	ÂĐ	TT	ÂĐ và TT	
Nuôi cấy (+)	3 (2,6%)	2 (1,7%)	2 (1,7%)	7 (6%)
Nuôi cấy (-)	1(0,01%)	3 (2,6%)	0	4 (3,4%)
Tổng	4 (3,4%)	5 (4,3%)	2 (1,7%)	11 (9,5%)

Amplification Plots

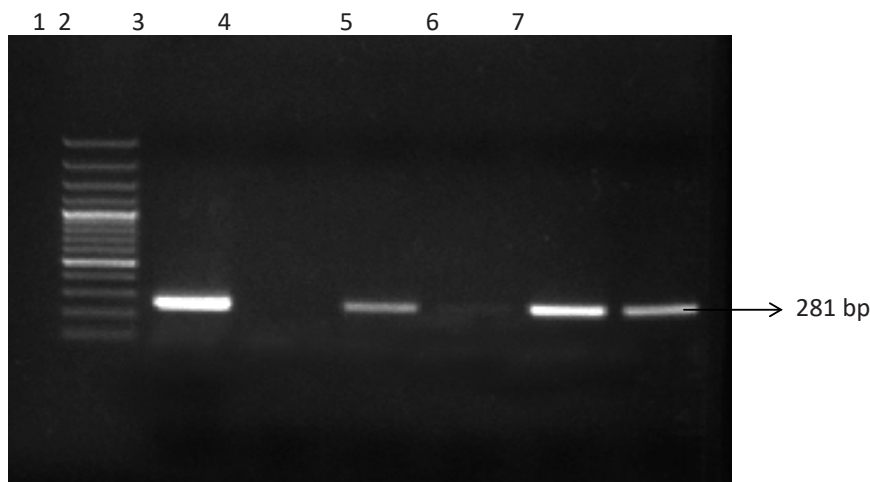


Hình 2. Kết quả của SYBR Green real-time PCR

Tính phù hợp của sản phẩm real-time PCR được kiểm tra bằng phân tích đường cong nhiệt độ tan chảy của sản phẩm và điện di sản phẩm rồi nhuộm màu trên agarose



Hình 3. Mẫu dương tính được phân tích bằng nhiệt độ nóng chảy



Hình 4. Sản phẩm của quá trình khuếch đại gen được điện di và đọc kết quả dưới máy đọc huỳnh quang (1): 100 bp marker, (2): chứng dương, (3): chứng âm, (4, 6, 7): mẫu dương, lane (5): mẫu âm.

4. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật SYBR Green real-time PCR để khuếch đại vùng gen *cfb* mã hóa cho yếu tố CAMP tìm thấy ở các chủng LCB. Các quy trình PCR phát hiện LCB ở phụ nữ mang thai phần lớn hướng đến khuếch đại vùng gen đích này [6],[11],[16]. Các nghiên cứu khác đã chỉ ra kỹ thuật PCR phát hiện LCB với vùng gen *cfb* có độ nhạy 75,3% và độ đặc hiệu 100% [12]; độ nhạy, độ đặc hiệu theo thứ tự là 90,5%, 96,1% [1]; độ nhạy của PCR là 92,8 và độ đặc hiệu là 81,1% [3]GBS. Điều này góp phần cho sự lựa chọn vùng gen *cfb* nhằm phát hiện LCB trong nghiên cứu này là hợp lý.

Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật real-time PCR với chất màu SYBR Green có thể giúp phát hiện sản phẩm khuếch đại ngay trong quá trình khuếch đại không qua giai đoạn điện di và nhuộm sản phẩm như đối với kỹ thuật PCR cổ điển. Do đó, kỹ thuật này có ưu điểm hơn là tránh nguy cơ ngoại nhiễm và cho kết quả nhanh hơn so với kỹ thuật PCR cổ điển. Ngoài ra, kỹ thuật real-time PCR sử dụng SYBR Green mà không sử dụng probe cũng góp phần giảm giá thành rất nhiều, phù hợp với những nước đang phát triển như Việt Nam chúng ta.

Một điểm hạn chế của kỹ thuật real-time PCR khi sử dụng chất màu SYBR Green là chất màu này

có thể kết hợp với các sản phẩm DNA không đặc hiệu khác nếu có và gây nên trường hợp dương tính giả. Tuy nhiên, điều này có thể được khắc phục khi thực hiện kỹ thuật với nhiệt độ cặp đôi gần sát với nhiệt độ tan chảy của cặp mồi trong quy trình. Trong nghiên cứu này, vấn đề này đã được chúng tôi kiểm tra bằng cách điện di và nhuộm màu các sản phẩm DNA tạo thành sau khuếch đại, tất cả kết quả đều cho sản phẩm đích 281bp (Hình 4). Điều này chứng tỏ sự thành công của kỹ thuật SYBR Green real-time PCR trong nghiên cứu này trong việc phát hiện LCB.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cả 2 kỹ thuật nuôi cấy và real-time PCR. Kết quả cho thấy sự tương đồng cao khi so sánh 2 kỹ thuật nuôi cấy và PCR với chỉ số Kappa là 0,77.

Áp dụng kỹ thuật SYBR Green real-time PCR nhằm phát hiện LCB, kết quả chỉ ra tỷ lệ mang LCB trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi là 9,5% (11 thai phụ). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu của Vũ Thị Kim Liên thực hiện ở Hà Nội với tỷ lệ nhiễm là 30%[16], nghiên cứu của

Lưu Thị Thanh Đào thực hiện ở Cần Thơ với tỷ lệ nhiễm là 19,5% [9]. Kết quả của chúng tôi tương đương với tỷ lệ nhiễm ở Đông Nam Á (11,1%) [8] và 1 số nước châu Á như Trung Quốc là 8,2% [5] và Hàn Quốc là 11,6%[7]. Trong khi đó, tỷ lệ mang LCB của phụ nữ mang thai ở nhiều nước cao hơn như Brazil là 25,4% [14], ở Belgium là 22% [4] the CDC recommends isolation of the bacterium from vaginal and anorectal swab samples by growth in a selective enrichment medium, such as Lim broth (Todd-Hewitt broth supplemented with selective antibiotics.

5. KẾT LUẬN

Kỹ thuật SYBR Green real-time PCR được sử dụng để phát hiện liên cầu B ở trực tràng và âm đạo phụ nữ mang thai cho thấy tỷ lệ phát hiện là 9,5% cao hơn tỷ lệ phân lập vi khuẩn chỉ 7%. Kỹ thuật này hữu ích, thực hiện dễ, giá thành thấp, phù hợp để phát hiện nhanh LCB ở phụ nữ mang thai các phòng xét nghiệm ở Việt Nam có máy real-time PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alfa MJ, Sepehri S, De Gagne P et al. (2010). Real-Time PCR Assay Provides Reliable Assessment of Intrapartum Carriage of Group B Streptococcus. *J Clin Microbiol* 48 (9): 3095–3099. doi: 10.1128/JCM.00594-10.
2. Bakhtiari R, Dallal MS, Mehrabadi J et al. (2012). Evaluation of Culture and PCR Methods for Diagnosis of Group B Streptococcus Carriage in Iranian Pregnant Women. 41 6.
3. Bidgani S, Navidifar T, Najafian M, Amin M (2016). Comparison of group B streptococci colonization in vaginal and rectal specimens by culture method and polymerase chain reaction technique. *J Chin Med Assoc.* doi: 10.1016/j.jcma.2015.06.021
4. El Aila NA, Tency I, Claeys G et al. (2010). Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. *BMC Infect Dis* 10 285. doi: 10.1186/1471-2334-10-285.
5. Ji W, Zhang L, Guo Z et al. (2017). Colonization prevalence and antibiotic susceptibility of Group B Streptococcus in pregnant women over a 6-year period in Dongguan, China. *PLoS ONE* 12 (8): 1–10.
6. Ke D, Ménard C, Picard FJ et al. (2000). Development of Conventional and Real-Time PCR Assays for the Rapid Detection of Group B Streptococci. *Clin Chem* 46 (3): 324–

- 331.
7. Kim DH, Min BJ, Jung EJ et al. (2018). Prevalence of group B streptococcus colonization in pregnant women in a tertiary care center in Korea. *Obstet Gynecol Sci* 61 (5): 575–583. doi: 10.5468/ogs.2018.61.5.575.
8. Kwatra G, Cunningham MC, Merrill E et al. (2016). Prevalence of maternal colonisation with group B streptococcus : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 3099 (16): 1–9. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30055-X.
9. Lưu Thị Thanh Đào, Phạm Văn Linh, Cao Văn Nhứt (2016). Nghiên cứu tình hình, các yếu tố liên quan nhiễm liên cầu nhóm B và kết quả điều trị dự phòng nhiễm liên cầu nhóm B lây nhiễm từ mẹ sang con. *Tạp Chí Dược học Cần Thơ* (5): 22–27.
10. McGee L, Schrag S, Verani JR (2010) Prevention of perinatal Group B streptococcal disease; revised guidelines from CDC, 2010.
11. Podbielski A, Blankenstein O, Lütticken R (1994). Molecular characterization of the cfb gene encoding group B streptococcal CAMP-factor. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 183 (5): 239–256. doi: 10.1007/bf00198458.
12. Rallu F, Barriga P, Scrivo C et al. (2006). Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for

screening for group B streptococcus carriage in pregnant women. *J Clin Microbiol* 44 (3): 725–728. doi: 10.1128/JCM.44.3.725-728.2006.

13. Report MW (2002). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC Centers for Disease Control and Prevention TM. 51

14. Rocchetti TT, Marconi C, Rall VLM, Jose VTMB (2011) Group B streptococci colonization in pregnant women : risk factors and evaluation of the vaginal flora.

Arch Gynecol Obstet 283 717–721. doi: 10.1007/s00404-010-1439-8.

15. Schuchat A (1998) Epidemiology of Group B Streptococcal Disease in the United States : *Shifting Paradigms*. 11 (3): 497–513.

16. Vũ Thị Kim Liên và cs (2013). Nghiên cứu xây dựng quy trình PCR chẩn đoán nhanh Streptococcus agalactiae ở phụ nữ mang thai. *Tạp chí học thực hành* 893 (11) :22-25.