

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG *Burkholderia pseudomallei* KHÔNG ĐIỂN HÌNH BẰNG VITEK 2

ZAKHAROVA I. B. ⁽¹⁾, BÙI THỊ LAN ANH ⁽²⁾, TETERYATNIKOVA N. N. ⁽¹⁾, CHIRSKOV P. R. ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) với bản chất hoại sinh là tác nhân gây bệnh melioidosis, một bệnh truyền nhiễm nặng với tỷ lệ tử vong cao [1]. Theo các số liệu phân tích, dự đoán về sự hiện diện toàn cầu của *B. pseudomallei* trong môi trường, thì điều kiện khí hậu, địa hình của Việt Nam là yếu tố thuận lợi cho sự tồn tại của mầm bệnh trong tự nhiên. Sự có mặt của *B. pseudomallei* trong các hệ sinh thái khác nhau của Việt Nam đã được ghi nhận từ lâu [2, 3].

Việt Nam là một trong những nước đầu tiên mô tả bệnh melioidosis [4]. Hiện nay, trong thực hành phòng thí nghiệm lâm sàng của Việt Nam, phương pháp xác định tác nhân gây bệnh melioidosis dễ thực hiện và không cần thiết bị hiện đại, được sử dụng rộng rãi đó là dựa trên hình thái tế bào vi khuẩn nhuộm gram, hoạt tính oxidase và độ nhạy với kháng sinh polymyxin, gentamicin, và amoxicillin/clavulonate [5]. Kháng polymyxin là đặc điểm chung của *Burkholderia*. Hầu hết các chủng *B. pseudomallei* đều kháng gentamicin và nhạy cảm với amoxicillin/clavulonate. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đưa ra các bằng chứng về việc một số chủng mất khả năng kháng với gentamicin và một số chủng có thể kháng lại amoxicillin/clavulonate [6].

Hiện nay, sử dụng phương pháp phân tích 64 tính chất sinh hóa trên Vitek 2 cho hiệu quả phát hiện các chủng *B. pseudomallei* cao hơn so với phương pháp phân lập thông thường. Tỷ lệ định danh chính xác *B. pseudomallei* chiếm khoảng 86% [7, 8]. Trong trường hợp các chủng *B. pseudomallei* không điển hình, phân lập từ mẫu đất, các chủng nhạy cảm với gentamicin, tỷ lệ xác định chính xác các chủng này chỉ còn khoảng 57% [6]. Các chủng *B. pseudomallei* nhạy cảm với gentamicin cũng như các chủng bị định danh nhầm trên Vitek 2 không được đưa vào thống kê, dẫn đến tỷ lệ các ca nhiễm công bố thấp hơn so với thực tế. Trong khi đó, việc xác định nhanh chóng và chính xác các chủng vi khuẩn là nhiệm vụ cơ bản của chẩn đoán cận lâm sàng trong phòng thí nghiệm, đưa ra nguồn gốc căn nguyên của bệnh truyền nhiễm giúp cho việc chữa bệnh kịp thời, đúng theo phác đồ điều trị. Chính vì vậy, việc xác định một số các tính chất sinh hóa đặc trưng, được coi là tiêu chuẩn chẩn đoán *B. pseudomallei*, đóng vai trò vô cùng quan trọng, giúp tỷ lệ định danh nhầm giảm, đặc biệt phát hiện được các chủng *B. pseudomallei* không điển hình.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

30 chủng nghi ngờ *B. pseudomallei* phân lập từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng bằng phương pháp xác định kiểu hình (nuôi cấy trên môi trường thạch chọn lọc Ash, tính kháng gentamicin); 6 chủng *B. pseudomallei* và 6 chủng *B. thailandensis* phân lập trong đất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các xét nghiệm sinh hóa được thực hiện trên máy phân tích tự động Vitek 2 và thẻ GN (bioMérieux, Pháp). Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên thạch Luria ở 37°C. Pha loãng độ huyền phù vi khuẩn đạt mật độ 0,50-0,63 theo McFarland trong dung dịch NaCl 0,45% vô trùng pH 7,0 trên máy đo mật độ Vitek 2 DensiCHEK™ Plus. Các thẻ GN đã được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tất cả các chủng được xác định khẳng định loài (*B. pseudomallei*, *B. mallei* và *B. thailandensis*) bằng bộ sinh phẩm multiplex PCR “Ampligen Burkholderia phức hợp “*pseudomallei*” βL B/D-EPh” (RU số RZN 2018/7785 ngày 07.11.2018) (Volgograd, Liên bang Nga) và bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu hỗn hợp Việt - Nga (Trung tâm Nhiệt đới Việt- Nga) giai đoạn 2018-2021.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Để nghiên cứu hiệu quả phát hiện các chủng *B. pseudomallei* không điển hình trên Vitek 2, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân tích so sánh kết quả phân tích tính chất sinh hóa của hai nhóm chủng.

Nhóm đầu tiên bao gồm 30 chủng nghi ngờ *B. pseudomallei* phân lập từ mẫu lâm sàng, được định danh bằng phương pháp xác định kiểu hình và/hoặc trên máy phân tích sinh hóa tự động Vitek 2. Nhóm thứ hai bao gồm 12 chủng phân lập từ đất (6 chủng *B. pseudomallei* và 6 chủng *B. thailandensis*).

Hồ sơ tính chất sinh hóa bằng Vitek 2 và thẻ GN (bioMérieux) cho thấy rằng phần lớn các chủng phân lập từ lâm sàng có phổ hoạt động sinh hóa điển hình. Trong đó, 25 chủng (84,4%) đã được định danh là *B. pseudomallei* với độ chính xác từ 95%-99%, 4 chủng (12,5%) đã được định danh với độ chính xác từ 86%-90%. Chỉ có một chủng mã 20QN06 (3,1%) kết quả đưa ra khuyến nghị hoặc *B. cepacia*” hoặc *B. pseudomallei* (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm sinh hóa của 30 chủng phân lập từ các mẫu lâm sàng

Chủng	Định danh loài	Tính chất sinh hóa đặc trưng*																			
		dCEL	GGT	dMAL	dMAN	dMNE	ProA	LIP	TyrA	dSOR	dTAG	CIT	MNT	NAGA	PHOS	GlyA	CMT	BGUR	O129R	IMLTa	ELIM
Chủng lâm sàng <i>B. pseudomallei</i>																					
18NA01	<i>B. pseudomallei</i>)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18NA02	<i>B. pseudomallei</i>)	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA03	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA04	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18NA05	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18NA06	<i>B. pseudomallei</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18NA07	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-

Chủng	Định danh loài	Tính chất sinh hóa đặc trưng*															
		dCEL	GGT	dMAL	dMAN	dMNE	ProA	LIP	TyrA	dSOR	dTAG	CIT	MNT	NAGA	PHOS	GlyA	CMT
18NA09	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
18NA10	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
18NA12	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
18NA13	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
18NA14	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
18NA15	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
18NA16	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18NA17	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
18NA18	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
18NA20	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
18NA21	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
18NA22	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
18NA23	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18PT03	<i>B. pseudomallei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
19VP01	<i>B. pseudomallei</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
19VP02	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
20QN01	<i>B. pseudomallei</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
20QN02	<i>B. pseudomallei</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
20QN03	<i>B. pseudomallei</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
20QN06	<i>B. cepacia / B. pseudomallei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
19YB01	<i>B. pseudomallei</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19YB02	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Chủng lâm sàng <i>B. thailandensis</i>																	
18NA19	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+

* Bảng trên không hiển thị kết quả các tính chất sinh hóa giống nhau trên Vitek 2 gồm: Dương tính với các test: dGLU, BNAG, Balap, SUCT, SAC u ILATk; Âm tính với các test: ILATa, GGAA, BGLU, BGAL, 5KG, PLE, OFF, ODC, LDC, H2S, dTRE, BXYL, AGLU, AGAL, APPA, ADO u PyrA.

Tiến hành phản ứng multiplex PCR và giải trình tự gen với 30 chủng thuộc nhóm lâm sàng trên, phát hiện 01 chủng mã 18NA19 là *B. thailandensis*. Như vậy, hiệu quả chẩn đoán ở nhóm chủng lâm sàng điển hình trên Vitek 2 trong nghiên cứu này là 97%.

Với 6 chủng *B. pseudomallei* phân lập từ đất đã được khẳng định bằng phương pháp PCR và giải trình tự gen, tiến hành kiểm tra trên hệ thống Vitek 2. Kết quả có 4 chủng (chiếm 67%) được định danh là *B. pseudomallei* với độ chính xác 98-99%, một chủng được Vitek 2 xác định là *Providencia stuartii* và một chủng khác là phức hợp “*B. cepacia*” (Bcc) (bảng 2). Kết quả định danh nhằm trên Vitek 2 được ghi nhận trong nghiên cứu của Zong Z. và cộng sự, bệnh nhân bị nhiễm *B. pseudomallei*, nhưng kết quả định danh bằng Vitek 2 là *B. cepacia* [9]. Tương tự trong nghiên cứu của Bin Wu và cộng sự, kết quả xác định 01 bệnh nhân bị mắc *B. pseudomallei* nhưng định danh bằng Vitek 2 cho kết quả là *Aeromonas sobria* [10].

Bảng 2. Đặc điểm tính chất sinh hóa trên Vitek 2 của các chủng phân lập từ đất

Chủng	Định danh loài	Tính chất sinh hóa đặc trưng*																		
		dCEL	GGT	dMAL	dMAN	dMNE	ProA	LIP	TyrA	dSOR	dTAG	CIT	MNT	NAGA	PHOS	GlyA	CMT	BGUR	O129R	IMLTa
Các chủng <i>B. pseudomallei</i> phân lập từ đất																				
128	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1112	<i>Providencia stuartii</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
1181	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
1182	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
1264	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
2750	<i>B. cepacia</i> group (slashline)	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
Các chủng <i>B. thailandensis</i> phân lập từ đất																				
1172	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
1341	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
1260	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
1264P	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
1342	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
1740	<i>B. pseudomallei</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+

* Bảng trên không hiển thị kết quả các tính chất sinh hóa giống nhau trên Vietk 2 gồm: Dương tính với các test: dGLU, BNAG, BAlap, SUCT, SAC u lLATk; Âm tính với các test: lLATa, GGAA, BGLU, BGAL, 5KG, PLE, OFF, ODC, LDC, H2S, dTRE, BXYL, AGLU, AGAL, APPA, ADO u PyrA.

Toàn bộ các chủng *B. thailandensis* phân lập từ đất (6 chủng) cũng như 01 chủng phân lập từ ca bệnh lâm sàng (18NA19) đều được hệ thống Vitek 2 cho kết quả định danh là *B. pseudomallei*. Nhận thấy phản ứng malonat (MNT) của cả 7 chủng *B. thailandensis* đều cho kết quả âm tính (bảng 1, 2), phát hiện này được coi là dấu hiệu quan trọng để phân biệt *B. thailandensis* với *B. pseudomallei*. Bởi lẽ các chủng *B. thailandensis*, một loài mới, được mô tả là một biến thể dương tính với arabinose trong môi trường của *B. pseudomallei*, nhóm này vẫn đang trong quá trình cập nhật vào cơ sở dữ liệu của hệ thống Vitek 2 [11].

Như vậy tổng cộng kết quả xét nghiệm trên hệ thống Vitek 2 của cả hai nhóm chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu lâm sàng và mẫu đất so với kết quả khẳng định bằng PCR và trình tự gen, nhận thấy có 7 kết quả dương tính giả, 3 kết quả âm tính giả, 1 kết quả âm tính đúng và 32 kết quả dương tính đúng thu được ở cả hai nhóm. Trên cơ sở đó tính toán cho thấy hiệu quả chẩn đoán xác định *B. pseudomallei* bằng Vitek 2 là 79%, giá trị dự đoán dương tính là 82% và giá trị dự đoán âm tính là 25%.

4. KẾT LUẬN

Dữ liệu thu được chỉ ra rằng phương pháp định danh trên hệ thống Vitek 2 được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm lâm sàng ở Việt Nam, có hiệu quả chẩn đoán cao, tỷ lệ phát hiện chính xác chiếm 97% (29/30 chủng) đối với nhóm chủng *B. pseudomallei* điển hình phân lập từ mẫu lâm sàng. Tuy nhiên nhóm *B. pseudomallei* được phân lập từ mẫu đất tỷ lệ phát hiện chính xác chỉ khoảng 67% (4/6 chủng). Đặc biệt với các chủng *B. pseudomallei* không điển hình, khả năng phát hiện nhâm lên đến 75% (9/12 chủng). Phản ứng malonat (MNT) trên Vitek 2 được coi là dấu hiệu quan trọng để phân biệt *B. thailandensis* với *B. pseudomallei*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D. A., Jane P. Messina, David M. Pigott, Catherine L. Moyes, Dionne B. Rolim, Eric Bertherat, Nicholas P. Day, Sharon J. Peacock, Simon I. Hay, *Predicted global distribution of Burkholderia pseudomallei and burden of melioidosis*, Nat. Microbiol., 2016, **1**(1):15008.
2. Vaucel M., *Présence probable du bacille de Whitmore dans l'eau de mare au Tonkin*, Bull. Soc. Pathol. Exot., 1937, **30**:10-15.
3. Chambon L., *Isolement du bacille de Whitmore à partir du milieu extérieur*. Ann. Inst. Pasteur, 1955, **89**:229-235.
4. Pons R., Advier M., *Melioidosis in Cochin China*, J. Hyg. (Lond.), 1927, **26**:28-30.
5. Trinh T. T., Hoang T. S., Tran D. A., V. T. Trinh, A. Göhler, T. T. Nguyen, S. N. Hoang, R. Krumkamp, L. T. N. Nguyen, J. May, P. M. Doan, C. D. Do, T. A. Que, I. Steinmetz *A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: a study from north-central Vietnam*, Clin. Microbiol. Infect., 2018, **24**(1):84.e1-84.e4.

6. Podin Y., Sarovich D. S., Price E. P., Mirjam Kaestli, Mark Mayo, King Ching Hii, HieUng Ngian, SeeChang Wong, IngTien Wong, JinShyan Wong, Anand Mohan, MongHow Ooi, TemLom Fam, Jack Wong, Apichai Tuanyok, Paul Keim, Philip M. Giffard, and Bart J. Currie, *Burkholderia pseudomallei* isolates from Sarawak, Malaysian Borneo, are predominantly susceptible to aminoglycosides and macrolides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **58**(1):162-166.
7. Kiratisin P., Santanirand P., Chantratita N., Kaewdaeng S., *Accuracy of commercial systems for identification of Burkholderia pseudomallei versus Burkholderia cepacia*, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, **59**(3):277-281.
8. Zakharova I. B., Lopasteyskaya Y. A., Toporkov A. V., Viktorov D. V., *Influence of biochemical features of Burkholderia pseudomallei strains on identification reliability by Vitek 2 system*, *J. Glob. Infect. Dis.*, 2018, **10**(1):7-10.
9. Zong Z., Wang X., Deng Y., Zhou T., *Misidentification of Burkholderia pseudomallei as Burkholderia cepacia by the VITEK 2 system*, *J. Med. Microbiol.*, 2012, **61**:1483-1484.
10. Bin Wu, Xinxin Tong, Haoyan He, Yinmei Yang, Huling Chen, Xiao Yang, and Bang lao Xu, *Misidentification of Burkholderia pseudomallei*, *China Emerg. Infect. Dis.*, 2021, **27**(3):964-966.
11. Brett, P. J., D. DeShazer, and D. E. Woods, *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, **48**:317-320.

SUMMARY

ASSESSMENT ON THE EFFECTIVENESS OF DETERMINING ATYPICAL *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* STRAINS BY VITEK 2 SYSTEM

The rate of accurate identification of *B. pseudomallei* strains causing melioidosis is about 86% by the Vitek 2 system. For atypical strains, sensitive to gentamicin, this rate is only about 57%. The mistaken identification of the causative agent lead to incorrect treatment regimens, which can lead to die. 30 strains of *B. pseudomallei* isolated from clinical samples, 6 strains of *B. pseudomallei* and 6 strains of *B. thailandensis* isolated from soil samples were identified using Vitek 2 system. The above bacterial strains were confirmed by multiplex PCR method and gene sequencing in previous studies. The results indicated that by Vitek 2 system, *B. pseudomallei* strains isolated from clinical samples had an accuracy rate of 97 %, *B. pseudomallei* strains isolated from soil samples had an accuracy rate of only 67%. Thus, the Vitek 2 identification method gives high diagnostic efficiency on typical

B. pseudomallei strains isolated from clinical samples. However, with the group of bacteria *B. pseudomallei* atypical, isolated from soil, the wrong detection results up to 75%. The malonate reaction (MNT) on Vitek 2 is considered an important marker to distinguish *B. thailandensis* from *B. pseudomallei*.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, identification, Vitek 2.

Nhận bài ngày 15 tháng 8 năm 2022

Phản biện xong ngày 03 tháng 11 năm 2022

Hoàn thiện ngày 19 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ Viện Phòng chống dịch hạch Volgograd, Liên bang Nga

⁽²⁾ Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Liên hệ: **Bùi Thị Lan Anh**

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

Số 63, Nguyễn Văn Huyền - Nghĩa Đô - Cầu Giấy - Hà Nội.

Điện thoại: 0948246464; Email: lananhrus@gmail.com.