

**TỐI ƯU HÓA PHẢN ỨNG REAL-TIME PCR PHÁT HIỆN
VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
GÂY VIÊM PHỔI CỘNG ĐỒNG Ở NGƯỜI LỚN**

**Nguyễn Huỳnh Kim Ngân^{1,2*}, Dương Thị Loan¹, Hoàng Thúy Oanh²,
Nguyễn Thị Mỹ Nga², Nguyễn Ngọc Quỳnh Nhi²**

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Trường Đại học Nam Cần Thơ

*Email: nhk.ngan99@gmail.com

Ngày nhận bài: 05/6/2025

Ngày phản biện: 05/7/2025

Ngày duyệt đăng: 25/7/2025

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: *Streptococcus pneumoniae* là tác nhân hàng đầu gây viêm phổi cộng đồng ở người lớn. Trong xét nghiệm vi sinh, phương pháp nuôi cấy đang là “Tiêu chuẩn vàng” tuy nhiên phương pháp này tốn nhiều thời gian trả kết quả. Nghiên cứu tiến hành xây dựng quy trình tối ưu hóa phản ứng real-time PCR với cặp mồi và mẫu dò đặc hiệu cho gen *cpsA* phát hiện vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* gây viêm phổi cộng đồng ở người lớn. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng quy trình real-time PCR phát hiện vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* gây viêm phổi cộng đồng ở người lớn. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thử nghiệm trên chủng vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305. Tiến hành thiết kế cặp mồi và mẫu dò, sau đó tối ưu nhiệt độ bắt cặp, nồng độ mồi, mẫu dò, khảo sát độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng. **Kết quả:** Tối ưu hóa chọn cặp mồi và đoạn dò của gen *cpsA* để sử dụng cho quy trình phát hiện vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*. Nghiên cứu tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp ở mức 57,1°C, nồng độ mẫu dò 0,25µM và nồng độ mồi 0,3 µM. Độ đặc hiệu của phản ứng là 100%, độ nhạy đạt $6,4 \times 10^2$ bản sao với độ chính xác 98,22% và hiệu suất phản ứng là 97,1%. **Kết luận:** Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình real-time PCR phát hiện vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* gây bệnh viêm phổi cộng đồng.

Từ khóa: Real-time PCR, *cpsA*, *Streptococcus pneumoniae*, viêm phổi cộng đồng.

ABSTRACT

**OPTIMIZE REAL-TIME PCR REACTION TO DETECT
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
CAUSING COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIAE IN ADULTS**

**Nguyen Huynh Kim Ngan^{1,2*}, Duong Thi Loan¹, Hoang Thuy Oanh²,
Nguyen Thi My Nga², Nguyen Ngoc Quynh Nhi²**

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Nam Can Tho University

Background: *Streptococcus pneumoniae* is the major contagious cause of community-acquired pneumoniae in adults. In microbiological testing, the culture method is considered the "gold standard"; however, this method requires time-intensive for results. This study to optimize a real-time PCR reaction using specific primers and probes targeting the *cpsA* gene to detect *Streptococcus pneumoniae*, the causative agent of community-acquired pneumonia in adults. **Objectives:** To develop a real-time PCR process to detect *Streptococcus pneumoniae* causing community-acquired pneumoniae in adults. **Materials and methods:** The study was conducted using the *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 strain. Proceed to design specific primers and probes,

then evaluate the annealing temperature, primer and probe concentrations, specificity and sensitivity of the reaction. **Results:** Optimization of primer pair and probe selection for the *cpsA* gene for use in the detection of *Streptococcus pneumoniae*. The annealing temperature was optimized at 57.1°C, with a probe concentration of 0.25 µM and primer concentration of 0.3 µM. The study demonstrated 100% specificity, a sensitivity limit of 6.4×10^2 copies, an accuracy of 98.22%, and an amplification efficiency of 97.1%. **Conclusions:** The study successfully optimized a real-time PCR assay targeting the *cpsA* gene for the rapid and specific detection of *Streptococcus pneumoniae* in cases of community-acquired pneumonia in adults.

Keywords: real-time PCR, *cpsA*, *Streptococcus pneumoniae*, community-acquired pneumonia.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm phổi cộng đồng (VPCĐ) là tình trạng nhiễm khuẩn của nhu mô phổi xảy ra ở ngoài bệnh viện, bao gồm viêm phế nang, ống và túi phế nang, tiểu phế quản tận cùng hoặc viêm tổ chức kẽ ở phổi. Tác nhân gây viêm phổi có thể là vi khuẩn, virus, nấm, ký sinh trùng, nhưng không phải do trực khuẩn lao [1], [2]. Cho đến nay, dù đã có nhiều tiến bộ trong chẩn đoán và điều trị nhưng VPCĐ vẫn là một trong những nguyên nhân chính gây 4 triệu ca tử vong hàng năm. Tỷ lệ mắc VPCĐ ở các nước đang phát triển cao gấp 5 lần so với các nước phát triển [3].

Vi khuẩn Gram dương *Streptococcus pneumoniae*, hay còn được gọi là phế cầu khuẩn là tác nhân quan trọng gây viêm phổi cộng đồng phổ biến nhất [4], [5]. Tỷ lệ nhiễm *Streptococcus pneumoniae* chiếm từ 33–50%. Bệnh viêm phổi do *Streptococcus pneumoniae* thường gặp ở người cao tuổi, người có bệnh mãn tính như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, đái tháo đường, bệnh tim mạch và những người có hệ miễn dịch suy giảm [6], [7]

Trong xét nghiệm, tác nhân *Streptococcus pneumoniae* gây viêm phổi cộng đồng ở người lớn được xác định bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống, phương pháp này là “Tiêu chuẩn vàng” để xác định tác nhân [8]. Tuy nhiên phương pháp nuôi cấy tốn nhiều thời gian trả kết quả do trong quá trình nuôi cấy, thời gian vi khuẩn phát triển chậm. Vì vậy, để đáp ứng nhu cầu phát hiện, chẩn đoán và điều trị bệnh, phương pháp real-time PCR phát hiện tác nhân *Streptococcus pneumoniae* ra đời rút ngắn thời gian xét nghiệm bệnh do chỉ thực hiện một phản ứng. Phương pháp này chủ yếu dựa vào việc phát hiện DNA đặc hiệu của *Streptococcus pneumoniae* [3], [9], [7], [1].

Gen *cpsA* là gen quan trọng thuộc cụm gen tổng hợp polysaccharide vỏ (*cps*-capsular polysaccharide synthesis) của *Streptococcus pneumoniae*. Cụm gen *cps* chịu trách nhiệm mã hóa các enzyme và protein liên quan đến quá trình sinh tổng hợp vỏ polysaccharide, là yếu tố độc lực chính giúp vi khuẩn tránh được hệ miễn dịch của vật chủ bằng cách ngăn thực bào [8]. Ngoài ra, *Streptococcus pneumoniae* có gen *lytA* còn được gọi là autolysin hay cụ thể hơn là N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. Đây là một enzyme thuộc nhóm autolysin có vai trò quan trọng trong quá trình tự phân giải của vi khuẩn. *LytA* chịu trách nhiệm trong việc phân cắt liên kết peptidoglycan trong thành tế bào dẫn đến phá vỡ thành tế bào [10].

Mặc dù real-time PCR đã được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán *Streptococcus pneumoniae*, nhưng hiện nay ở Việt Nam phần lớn các nghiên cứu hiện tại chỉ tập trung vào việc ứng dụng real-time PCR để phát hiện và xác định *Streptococcus pneumoniae* trong các mẫu bệnh phẩm. Vẫn còn rất ít các nghiên cứu chuyên sâu tập trung vào việc tối ưu hóa quy trình này. Vì vậy, nghiên cứu tiến hành với mục tiêu: Xây dựng quy trình phát hiện *Streptococcus pneumoniae* bằng kỹ thuật real-time PCR nhắm gen đặc hiệu *cpsA* hoặc *lytA* của *Streptococcus pneumoniae*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 được cung cấp bởi hãng Oxoid (Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu thử nghiệm.

- **Nội dung nghiên cứu:** Thiết kế môi và mẫu dò dựa vào 2 gen *cpsA* và *lytA*, thiết kế dựa vào phần mềm Primer3, kiểm tra các thông số môi bằng công cụ OligoAnalyzer, độ đặc hiệu của môi và mẫu dò được kiểm tra bằng công cụ BLAST của NCBI. Sử dụng phương pháp PCR, tiến hành chọn cặp môi và mẫu dò tối ưu nhất với vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*. Tối ưu nhiệt độ bắt cặp theo gradient từ 50°C-65°C (50°C; 51,4°C; 52,9°C; 54,3°C; 55,7°C; 57,1°C; 58,6°C; 60°C). Tối ưu nồng độ môi và mẫu dò theo bảng 1 để khuếch đại chính xác DNA đích mà không tạo ra sản phẩm không đặc hiệu hoặc primer dimer. Khảo sát độ đặc hiệu trên các mẫu DNA của các chủng vi khuẩn *Streptococcus mitis*; *Haemophilus influenzae*; *Staphylococcus aureus*. Khảo sát độ nhạy của phản ứng sử dụng nồng độ vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* ở 10^7 copies/μl làm chứng dương, mẫu pha loãng mẫu bậc 10 theo thứ tự: 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10 copies/μl.

Bảng 1. Ma trận nồng độ môi và nồng độ mẫu dò

Mẫu dò \ Môi	0,1 μM	0,3 μM	0,5 μM	0,7 μM	0,9 μM
0,1 μM	0,1–0,1	0,1–0,3	0,1–0,5	0,1–0,7	0,1–0,9
0,15 μM	0,15–0,1	0,15–0,3	0,15–0,5	0,15–0,7	0,15–0,9
0,2 μM	0,2–0,1	0,2–0,3	0,2–0,5	0,2–0,7	0,2–0,9
0,25 μM	0,25–0,1	0,25–0,3	0,25–0,5	0,25–0,7	0,25–0,9

- **Phương pháp xử lý và phân tích số liệu:** Sử dụng phần mềm Excel 2019 trong quản lý, thống kê và phân tích số liệu.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

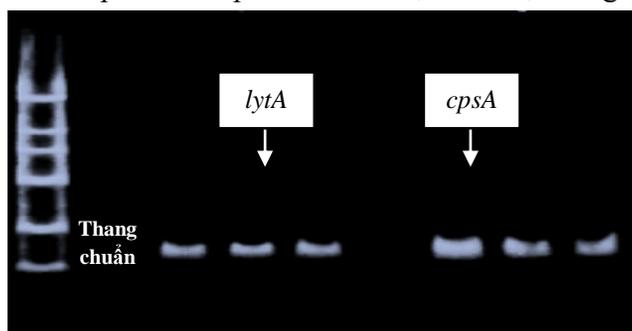
Thiết kế môi và mẫu dò

Bảng 2. Trình tự môi và mẫu dò thiết kế

Tên		Trình tự
<i>cpsA</i>	Môi xuôi	TTAAAAGGTACAGGTCGGACGG
	Môi ngược	TCTACCCTCCATCACATCCTGT
	Đoạn dò	FAM-TGCAATGCCAGACAGTAACCTCT
<i>lytA</i>	Môi xuôi	AGCGGTTGAACTGATTGAAAGC
	Môi ngược	ATGGTCTGAGTGGTTGTTTGGT
	Đoạn dò	FAM-TGCCGAAAACGCTTGATACAGGG

Nhận xét: Cặp môi và mẫu dò được thiết kế để khuếch đại gen *cpsA* và *lytA* của *Streptococcus pneumoniae* có trình tự được thể hiện ở Bảng 2. Kiểm tra trình tự môi của 2 gen bằng công cụ OligoAnalyzer cho thấy các thông số như chiều dài môi/mẫu dò, thành phần GC, nhiệt độ nóng chảy, các cấu trúc hairpin, self-dimer ($\Delta G > -9$ kcal/mol) đều đáp ứng những yêu cầu trong thiết kế môi. Tính đặc hiệu của đoạn môi và mẫu dò được kiểm tra bằng phần mềm BLAST (NCBI) cho thấy không có sự bắt lên các trình tự của sinh vật khác, và kết

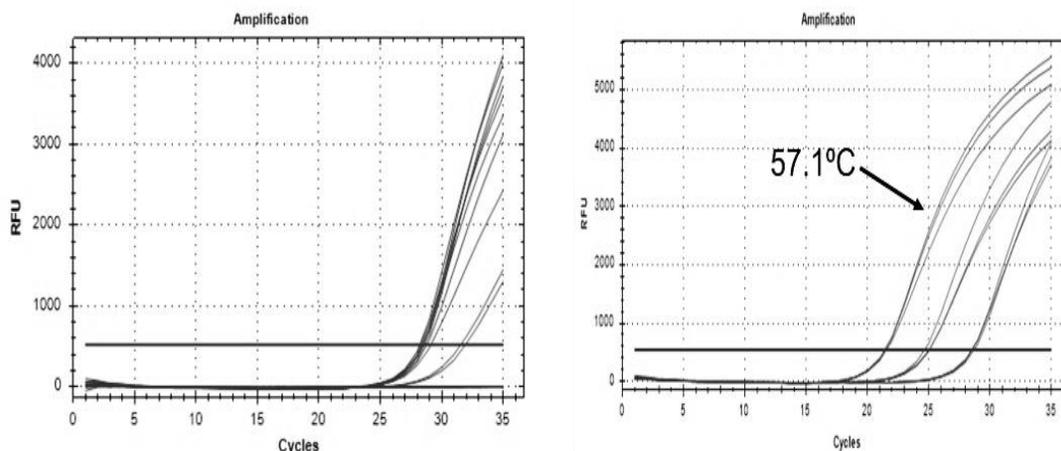
quả cũng cho thấy rằng khả năng bắt cặp đặc hiệu của đoạn môi và mẫu dò trên gen *cpsA* và *lytA* của chủng vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* đạt mức độ tương đồng là 100%.



Hình 1. Kết quả điện di trên gel cặp môi của 2 gen *lytA* và *cpsA*

Nhận xét: Sau khi thiết kế môi và mẫu dò, tiếp tục tiến hành kiểm tra môi của 2 gen *cpsA* và *lytA* bằng phương pháp PCR và điện di trên gel. Kết quả điện di gel ở hình 1 cho thấy cặp môi và mẫu dò của gen *cpsA* là tối ưu nhất. Nên chúng tôi chọn cặp môi và mẫu dò của gen *cpsA* để tối ưu hóa phản ứng phát hiện vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*. Sau khi có kết quả gen tối ưu nhất, kiểm tra môi và mẫu dò gen *cpsA* cho thấy cả 3 lần lặp lại của thí nghiệm đều có tín hiệu khuếch đại, Ct cả 3 lần lặp lại cho giá trị Ct trung bình 24.0, và mẫu chứng âm không cho giá trị Ct.

Tối ưu nhiệt độ bắt cặp



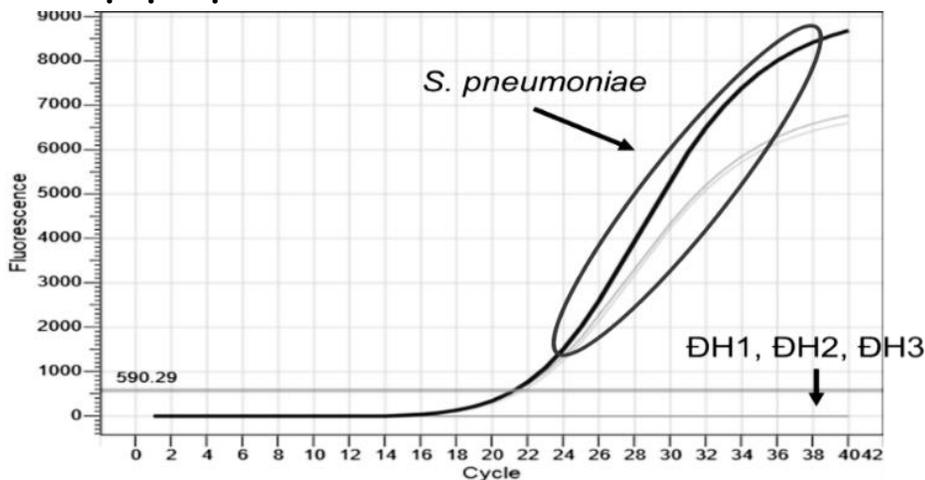
Hình 2. Kết quả real-time PCR tối ưu nhiệt độ bắt cặp

Nhận xét: Kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp môi, mẫu dò khuếch đại gen *cpsA* cho thấy tất cả các mức nhiệt độ đều có tín hiệu khuếch đại. Ở mức nhiệt độ 57,1°C cho Ct sớm nhất (21.4) và tín hiệu khuếch đại cao nhất. Vì vậy, nhiệt độ bắt cặp thích hợp cho cặp môi và mẫu dò được chọn là 57,1°C.

Tối ưu nồng độ môi và mẫu dò

Kết quả tối ưu nồng độ môi và mẫu dò dựa vào ma trận tại bảng 1 cho thấy trong các nồng độ khảo sát thì nồng độ môi ở mức 0,3 μM và nồng độ mẫu dò ở mức 0,25 μM cho tín hiệu khuếch đại cao nhất và cho giá trị Ct = 25,01 sớm so với những nồng độ khác. Vì vậy, nồng độ môi và mẫu dò được chọn lần lượt là 0,3 μM và 0,25 μM cho các thí nghiệm tiếp theo.

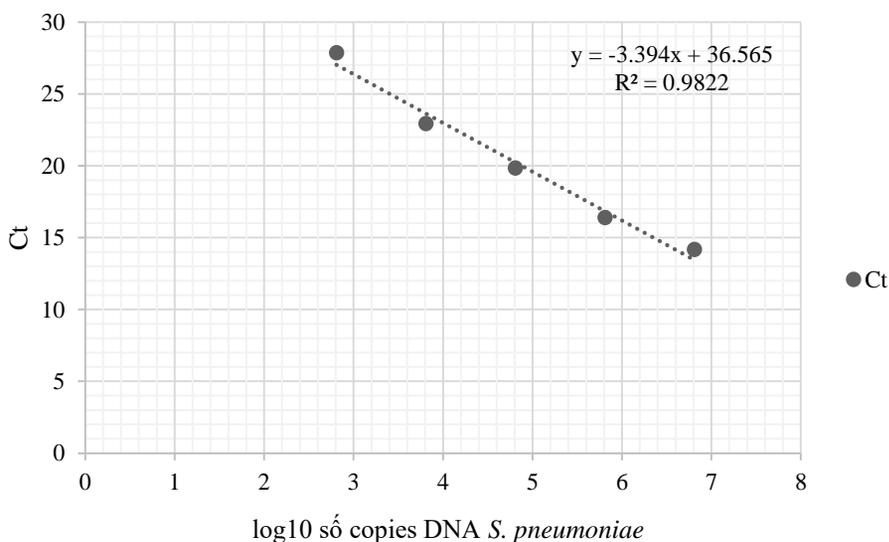
Khảo sát độ đặc hiệu



Hình 3. Kết quả real-time PCR khảo sát độ đặc hiệu

Nhận xét: Kết quả khảo sát độ đặc hiệu gồm các mẫu *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, ĐH1 - *Streptococcus aureus*, ĐH2 - *Streptococcus mitis*, ĐH3 - *Escherichia coli*. Phản ứng chỉ dương tính với mẫu có DNA của *Streptococcus pneumoniae*. Tín hiệu huỳnh quang không xuất hiện, vì vậy không xảy ra phản ứng với các chủng khác. Độ đặc hiệu của phản ứng đạt 100%.

Khảo sát độ nhạy



Biểu đồ 1. Đường chuẩn độ nhạy của cặp mồi và mẫu dò

Nhận xét: Kết quả khảo sát độ nhạy cặp mồi và mẫu dò khuếch đại gen *cpsA* cho thấy, các phản ứng từ $6,4 \times 10^6$ copies đến $6,4 \times 10^2$ copies đều cho tín hiệu huỳnh quang, tín hiệu huỳnh quang thấp nhất tương ứng số bản sao là $6,4 \times 10^2$ copies với Ct là 27,87 chu kỳ. Biểu đồ 1 biểu diễn mối quan hệ tuyến tính giữa số bản sao có trong mẫu chuẩn và giá trị Ct, với $R^2=0,9822$. Vậy số bản sao của gen *cpsA* thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện là $6,4 \times 10^2$ copies/phản ứng. Độ chính xác là 98,22% và hiệu suất phản ứng là 97,1%.

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng phản ứng real-time PCR phát hiện *Streptococcus pneumoniae* dựa vào gen *cpsA*, với độ đặc hiệu 100%, độ nhạy $6,4 \times 10^2$ copies và hiệu suất phản ứng đạt 97,1%. Điều này khẳng định phương pháp thiết kế môi và mẫu dò *cpsA* trong nghiên cứu phù hợp để phát hiện *Streptococcus pneumoniae*.

Sử dụng gen *cpsA* được đánh giá cao về độ đặc hiệu, gen này mã hóa cho một thành phần trong quá trình tổng hợp vỏ polysaccharide là một đặc điểm đặc trưng và quan trọng trong việc xác định *Streptococcus pneumoniae*. So với các gen mục tiêu khác như *ply*, được sử dụng phổ biến trong một số bộ kit thương mại nhưng lại có nguy cơ bắt chéo với các loài cùng nhóm như *Streptococcus mitis* và *Streptococcus pseudopneumoniae*, thì *cpsA* được ghi nhận có độ đặc hiệu cao. Mặc dù gen *cpsA* thể hiện độ đặc hiệu cao, nhưng theo nghiên cứu của Kukla, trong một số trường hợp có một tỉ lệ nhỏ chủng *Streptococcus pneumoniae* không vỏ có thể không mang gen *cpsA* dẫn đến phản ứng âm tính giả [8].

Về phản ứng real-time PCR, các thông số tối ưu trong nghiên cứu với nhiệt độ bắt cặp $57,1^\circ\text{C}$, nồng độ môi $0,3 \mu\text{M}$ và nồng độ mẫu dò $0,25 \mu\text{M}$. Đây đều là những thông số phù hợp với điều kiện phản ứng theo khuyến cáo trong các tài liệu kỹ thuật hiện hành cũng như trong các nghiên cứu tương đồng như của Boix-Palop, trong đó phạm vi nhiệt độ bắt cặp hiệu quả thường dao động từ 55°C đến 60°C [9]. Điều này cho thấy quy trình được xây dựng trong nghiên cứu hoàn toàn khả thi để triển khai trong xét nghiệm lâm sàng thường quy, đặc biệt khi cần rút ngắn thời gian chẩn đoán mà vẫn đảm bảo độ chính xác và độ tin cậy.

Nghiên cứu đã xây dựng quy trình real-time PCR có tính ứng dụng cao, góp phần cải thiện công cụ chẩn đoán vi sinh cho bệnh viêm phổi cộng đồng do *Streptococcus pneumoniae*, đồng thời mở ra hướng tiếp cận mới trong việc phát hiện vi khuẩn trong các tình huống lâm sàng như mật độ vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm thấp hoặc bệnh nhân đã dùng kháng sinh trước đó.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng quy trình quy trình real-time PCR với cặp môi đặc hiệu và mẫu dò để khuếch đại gen *cpsA* của vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*. Tối ưu hóa thành công phản ứng real-time PCR phát hiện vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* có độ đặc hiệu và độ nhạy cao. Độ đặc hiệu của phản ứng 100%, phản ứng có khả năng phát hiện chính xác mẫu mục tiêu ở mức thấp nhất là $6,4 \times 10^2$ copies/phản ứng. Cần triển khai thử nghiệm quy trình trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng thực tế để đánh giá tính hiệu quả và khả năng ứng dụng trong chẩn đoán.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Văn Lực, Nguyễn Bá Vinh, Ngô Bình Minh, Nguyễn Xuân Hùng. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị viêm phổi mắc phải cộng đồng, tại bệnh viện quân y 110. *Tạp chí Y học Quân sự*. 2023. 5(5), 77-81, doi: 10.59459/1859-1655/JMM.315.
2. Eshwara V. K., Mukhopadhyay C., Rello J. Community-acquired bacterial pneumonia in adults: An update. *Indian J Med Res*. 2020. 151(4), 287-302, doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1678_19.
3. Bộ Y Tế. Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị viêm phổi mắc phải cộng đồng ở người lớn. 2020. <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/The-thao-Y-te/Quyết-dinh-4815-QĐ-BYT-2020-tai-lieuHuong-dan-chan-doan-viem-phoi-mac-phai-o-nguoi-lon-457957.aspx>.
4. Shoar Saeed, Musher Daniel M. Etiology of community-acquired pneumonia in adults: a systematic review. *Pneumonia*. 2020. 12, 1-10, doi: 10.1186/s41479-020-00074-3.

5. Subathra Marimuthu, Rocio B. Damiano, Leslie A. Wolf. Performance Characteristics of a Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Clinical Specimens. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2024. 26(7), 552-562, doi: 10.1016/j.jmoldx.2024.03.009.
 6. Seok Hwee Koo, Boran Jiang, Pei Qi Lim, My-Van La and Thean Yen Tan. Development of a rapid multiplex PCR assay for the detection of common pathogens associated with community-acquired pneumonia. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. 2021. 115(12), 1450-1455, doi: 10.1093/trstmh/tra079.
 7. Mark Woodhead. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *European Respiratory Journal*. 2020. 20, 20s-27s, doi: 10.1183/09031936.02.00702002.
 8. Park Hee Kuk, Lee Hee Jung, Kim Wonyong. Real-time PCR assays for the detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS microbiology letters*. 2010. 310(1), 48-53, doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02044.x.
 9. Lucía Boix-Palop, Meritxell Obradors, Mariona Xercavins, Ester Picó-Plana, Lydia Canales, et al. Improvement of pneumococcal pneumonia diagnosis using quantitative real-time PCR targeting *lytA* in adult patients: a prospective cohort study. *Clinical Microbiology Infection*. 2022. 28(1), 138.e1-138.e7, doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.049.
 10. Sónia T Almeida, Tânia Pedro, A Cristina Paulo, Hermínia de Lencastre and Raquel Sá-Leão. Re-evaluation of *Streptococcus pneumoniae* carriage in Portuguese elderly by qPCR increases carriage estimates and unveils an expanded pool of serotypes. *Scientific Reports*. 2020. 10(1), 1-10, doi: 10.1038/s41598-020-65399-x.
-