

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*

NGÔ KHÁNH PHƯƠNG

**XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY NÃO ÚNG THỦY VÀ
NHIỄM TRÙNG SƠ SINH BẰNG PHƯƠNG PHÁP
GIẢI TRÌNH TỰ RNA VÀ 16S rRNA
TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*

NGÔ KHÁNH PHƯƠNG

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN

**GÂY NÃO ÚNG THỦY VÀ NHIỄM TRÙNG SƠ SINH
BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ RNA VÀ 16S rRNA
TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG**

CHUYÊN NGÀNH: VI SINH VẬT HỌC

MÃ SỐ: 9420107

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học :

- 1. GS.TS. ĐẶNG ĐỨC ANH**
- 2. PGS.TS. HOÀNG THỊ THU HÀ**

HÀ NỘI - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi với sự hợp tác của đồng nghiệp và đã được sự đồng ý cho công bố luận án này.

Kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực và chưa từng công bố trong bất kỳ một công trình nào khác.

Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm về những lời cam đoan này.

Ngày tháng năm

Tác giả luận án

Ngô Khánh Phương

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới: GS.TS. Đặng Đức Anh, Nguyên Viện trưởng Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và PGS.TS. Hoàng Thị Thu Hà, Trưởng khoa Vi khuẩn - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, là những người thầy đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, động viên, khuyến khích tôi trong suốt quá trình xây dựng đề cương, thu thập số liệu, viết báo cáo và hoàn thiện luận án.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương; Khoa Vi khuẩn; Phòng Hợp tác quốc tế; Phòng thí nghiệm Personalized Medicine - Đại học Bang Pennsylvania - Mỹ; GS. TS. Steven Schiff và TS. Joshep Paulson - Đại học Yale; PGS. TS. Phạm Quang Thái - Phó trưởng khoa Dịch tễ; các thầy cô trong chương trình đào tạo Nghiên cứu sinh đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thiện luận án.

Tôi xin được bày tỏ lòng kính trọng và cảm ơn sâu sắc đến các thầy cô đã tham dự hội đồng đánh giá luận án;

Tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc Ban lãnh đạo Trung tâm Đào tạo và quản lý khoa học; Tập thể cán bộ Trung tâm Đào tạo và quản lý khoa học đã hỗ trợ, giúp đỡ tôi trong quá trình thu thập số liệu, luôn tạo điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình nghiên cứu, hoàn thiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban lãnh đạo và các anh/chị bác sĩ cũng như chuyên viên Bệnh viện Nhi Trung ương đã hỗ trợ tôi trong quá trình nghiên cứu, thu thập số liệu cho luận án.

Tôi xin được cảm ơn những người bạn của tôi TS. Christine Hehnly – Đại học Harvard, TS. Mercedeh Movassagh - Đại học Yale, ThS. Trịnh Sơn Tùng - Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford đã hỗ trợ tôi rất nhiều trong quá trình phân tích và hoàn thiện số liệu cho luận án.

Tôi xin được cảm tạ những tình cảm vô bờ của bố mẹ, người thân trong gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ và động viên tôi trong những ngày tháng học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm
Ngô Khánh Phương

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương I. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Não úng thủy	3
1.1.1. Định nghĩa não úng thủy	3
1.1.2. Phân loại não úng thủy	3
1.1.3. Dịch tễ học bệnh não úng thủy ở trẻ em.....	5
1.1.4. Chẩn đoán và điều trị não úng thủy ở trẻ nhỏ	7
1.2. Nhiễm trùng sơ sinh	10
1.2.1. Định nghĩa nhiễm trùng sơ sinh	10
1.2.2. Dịch tễ học nhiễm trùng sơ sinh.....	12
1.3. Tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh	21
1.4. Các phương pháp sinh học phân tử chẩn đoán não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh.....	27
1.4.1 PCR trong chẩn đoán vi sinh vật gây bệnh nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy.....	28
1.4.2. Phương pháp Metagenomics và giải trình tự gene thế hệ mới (NGS – whole genome sequencing)	38
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	44
2.1. Thiết kế nghiên cứu	44
2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu	44
2.3. Đối tượng nghiên cứu	45
2.3.1. Bệnh nhân não úng thủy	45
2.3.2. Bệnh nhân mắc nhiễm trùng sơ sinh	46
2.4. Cỡ mẫu và lựa chọn đối tượng nghiên cứu.....	47
2.4.1. Cỡ mẫu	47
2.4.2. Lựa chọn đối tượng nghiên cứu.....	48

2.4.3. Cách lấy mẫu	50
2.5. Thu thập thông tin	53
2.6. Kỹ thuật xét nghiệm	53
2.6.1. Tại Bệnh viện Nhi Trung ương	54
2.6.2. Tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.....	55
2.6.3. Tại trường đại học bang Pennsylvania	55
2.7. Quản lý và phân tích số liệu	60
2.7.1. Nhập và quản lý số liệu bằng REDCap:	60
2.7.2. Phân tích thành phần phân loài các mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật metagenomics (qiime2, dada2, picrust, v.v.)	61
2.7.3 Xử lý và phân tích số liệu.....	62
2.8. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	63
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	64
3.1. Mô tả một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhi não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh tại bệnh viện Nhi trung ương, 2019-2020.....	64
3.1.1. Một số đặc điểm nhân khẩu học của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh	64
3.1.2. Các tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh ở trẻ sơ sinh tại Bệnh viện nhi Trung ương, 2019-2020	75
3.2. Giải trình tự gene thể hệ mới xác định tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh	80
3.2.1. Ứng dụng giải trình tự gene 16S rRNA trong phát hiện tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh.....	80
3.2.2. Ứng dụng giải trình tự RNA sequencing trong phát hiện tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh.....	88
Chương 4. BÀN LUẬN	99
4.1. Đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân và một số tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh	99

4.1.1. Một số đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh	99
4.1.2. Một số căn nguyên gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh thông qua nuôi cấy và PCR đa môi	102
4.2. Xác định tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh bằng 16S rRNA và RNA-seq	106
4.3. So sánh sự tương đồng trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh của các phương pháp	109
4.4. Hạn chế của đề tài.....	117
KẾT LUẬN	118
KIẾN NGHỊ	120
TÀI LIỆU THAM KHẢO	122

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ gốc tiếng anh	Giải nghĩa
BDL	Bacteria DNA load	Tải lượng DNA vi khuẩn
CMV	Cytomegalovirus	Vì rút Cytomegalo
CSF	Cerebrospinal Fluid	Dịch não tủy
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Axit Deoxyribonucleic
dNTPs	Deoxyribose nucleoside triphosphats	Phân tử Deoxyribose nucleosid triphotphat
EBV	Epstain Barr Virus	Vì rút Epstain Barr
EOS	Eary Onset Sepsis	Nhiễm trùng khởi phát sớm
GBS	Group B Streptococcus	Liên cầu khuẩn nhóm B
HEV	Herpatitis E Virus	Vì rút viêm gan E
HIV 1	Human immunodeficiency virus 1	Vì rút gây suy giảm miễn dịch ở người 1
HSV	Herpes Simplex Virus	Vì rút Herpes
LOS	Late Onset Sepsis	Nhiễm trùng khởi phát muộn
	Measles Virus	Vì rút gây bệnh Sởi
	Mumps Virus	Vì rút gây bệnh quai bị
NGS	Next Genaration Sequencing	Giải trình tự gene thế hệ mới
NICHD	National Institute of Child Health and Human Development	Viện Sức khỏe Trẻ em và Phát triển con người Quốc gia
NIPH	Non-Postinfectious Hydrocephalus	Não úng thủy không do nhiễm trùng

Từ viết tắt	Từ gốc tiếng anh	Giải nghĩa
NTSS	Neonatal sepsis	Nhiễm trùng sơ sinh
NUT	Hydrocephalus	Não úng thủy
OTU	Operational Taxonomic Unit	Đơn vị phân loài
PCA	Principal Component Analysis	Phân tích thành phần chính
PCoA	Principal Coordinate Analysis	Phân tích tọa độ chính
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
PIH	Post-Infectious Hydrocephalus	Não úng thủy sau nhiễm trùng
PSBI	Possible Serious Bacterial Infection	Nhiễm trùng nghiêm trọng có thể xảy ra
RNA	Ribonucleic Acid	Axit Ribonucleic
RNA-seq	RNA sequencing	Giải trình tự RNA
RSV	Respiratory Syncytial Virus	Virus rút hợp bào hô hấp
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome	Hội chứng đáp ứng viêm toàn thân
UN IGME	United Nations Inter-Agency Group for Child Mortality Estimation	Nhóm liên ngành của Liên hợp quốc về Đánh giá Tỷ lệ Tử vong ở Trẻ em
VZV	Varicella Zoster Virus	Virus gây bệnh thủy đậu
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các tác nhân chính gây nhiễm trùng sơ sinh trên thế giới	23
Bảng 1.2. Tác nhân vi rút và vi sinh vật khác gây não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh.....	26
Bảng 1.2. Các cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR 16S rRNA	36
Bảng 2.1: Thẻ tích mẫu máu và dịch não tủy cần lấy, so sánh với lượng máu và dịch não tủy trong cơ thể trẻ.....	52
Bảng 3.1. Một số đặc điểm nhân khẩu học của nhóm bệnh nhân não úng thủy (n = 41)	64
Bảng 3.2. Đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân não úng thủy	66
Bảng 3.3. Kết quả chẩn đoán bệnh nhân trước và sau khi ra viện.....	66
Bảng 3.4. Đặc điểm của bệnh nhi não úng thủy tử vong.....	67
Bảng 3.5. Một số đặc điểm nhân khẩu của nhóm bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh (n = 142)	68
Bảng 3.6. Đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh (n = 142) ..	70
Bảng 3.7. Chẩn đoán bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh khi ra viện (n=142)	70
Bảng 3.8. Đặc điểm của bệnh nhi mắc nhiễm trùng sơ sinh tử vong	73
Bảng 3.9. Kết quả xét nghiệm miễn dịch tự động và test nhanh của bệnh nhân não úng thủy	74
Bảng 3.10. Kết quả xét nghiệm miễn dịch tự động và test nhanh của bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh (n=142)	74
Bảng 3.11. Kết quả nuôi cấy phát hiện tác nhân gây bệnh của nhiễm trùng sơ sinh	77
Bảng 3.12. Thành phần vi rút, vi khuẩn trong mẫu máu (nhóm nhiễm trùng sơ sinh) sau phân tích giải trình tự RNA-seq	88
Bảng 3.13. Thành phần vi rút, vi khuẩn trong mẫu dịch não tủy sau phân tích RNAseq	91

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Tỷ lệ mắc não úng thủy phân theo khu vực của Tổ chức y tế thế giới	6
Hình 1.2. Chẩn đoán hình ảnh nhiễm khuẩn thần kinh, tổn thương (trái) bình thường (phải)	8
Hình 1.3. Các phương pháp phân tích chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh.....	27
Hình 1.4. Cấu trúc hệ gene ribosome của vi khuẩn và vị trí của 16S rRNA..	35
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	44
Hình 2.2. Số lượng mẫu.....	47
Hình 2.3. Quy trình thu tuyển bệnh nhân	49
Hình 2.4. Phương pháp phân tích mẫu lâm sàng bằng giải trình tự và phân tích metagenomics	57
Hình 2.5. Quy trình giải trình tự RNA theo Lexogen.....	59
Hình 3.1. Phân bố của bệnh nhân Não úng thủy theo khu vực địa lý	65
Hình 3.2. Phân bố bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh theo khu vực địa lý	69
Hình 3.3. Kết quả PCR mẫu dịch não tủy của bệnh nhân não úng thủy	76
Hình 3.4. Tỷ lệ nuôi cấy máu (n = 142)	77
Hình 3.5. Kết quả PCR đa mồi cho mẫu NTSS (n = 142).....	79
Hình 3.6. Chỉ số kiểm soát chất lượng của giải trình tự (Phred score) của mẫu máu – nhóm nhiễm trùng sơ sinh	80
Hình 3.7. Chỉ số đa dạng sinh học loài H (Shanon index)	81
Hình 3.8. Kết quả phân tích tọa độ chính (PcoA) ở hai mẫu máu và dịch não tủy.....	82
Hình 3.9. Tính đa dạng trong thành phần loài khi phân tích 16S rRNA ở mẫu máu của nhóm NTSS.....	84
Hình 3.10. Tính đa dạng trong thành phần loài khi phân tích 16S rRNA ở mẫu dịch não tủy của nhóm NTSS.....	85

Hình 3.11. Phân bố tác nhân vi khuẩn nghi ngờ gây bệnh trong mẫu dịch não tuỷ.....	86
Hình 3.12. So sánh thành phần loài giữa mẫu máu và dịch não tuỷ.....	87
Hình 3.13. Phân bố thành phần vi sinh vật trong mẫu máu (a) và mẫu dịch não tuỷ (b) sau phân tích giải trình tự RNA.....	96
Hình 3.14. So sánh thành phần tác nhân gây bệnh ở mẫu máu và mẫu dịch não tuỷ.....	97
Hình 4.1. So sánh kết quả chẩn đoán tác nhân gây bệnh giữa nuôi cấy và PCR	110
Hình 4.2. So sánh kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh bằng PCR, nuôi cấy và giải trình tự 16S rRNA	111
Hình 4.3. So sánh thành phần vi khuẩn được phát hiện bằng RNA-seq và nuôi cấy	112
Hình 4.4. So sánh kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh giữa các phương pháp	114

ĐẶT VẤN ĐỀ

Não úng thủy là bệnh lý về thần kinh thường gặp ở trẻ sơ sinh và đến nay vẫn là một thách thức đối với nền y học thế giới. Hàng năm có khoảng 400.000 trường hợp mắc bệnh não úng thủy ở trẻ em trên thế giới, hầu hết ca bệnh xuất hiện ở các nước đang phát triển và nguyên nhân chính là do nhiễm trùng [50]. Các nhiễm trùng này thường bắt nguồn từ nhiễm trùng sơ sinh, não úng thủy sau nhiễm trùng có thể xuất hiện ở trẻ nhỏ sau khi mắc nhiễm trùng sơ sinh. Nhiễm trùng sơ sinh (NTSS) rất hay gặp và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở trẻ sơ sinh, đặc biệt là ở trẻ sơ sinh non tháng. Tỷ lệ trẻ mắc não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh ở các nước thu nhập thấp và trung bình là cao hơn nhiều lần so với các nước phát triển, đặc biệt là khu vực châu Phi và Đông nam á trong đó có Việt Nam [139]. Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng các vi khuẩn gây nên não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh bao gồm nhóm vi khuẩn gram âm *Proteobacteria*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, *Paenibacillus*, *Streptococcus B* (GBS), *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* và *Proteus*...

Hiện nay, các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, real-time PCR, giải trình tự gene đã và đang được áp dụng tại các phòng xét nghiệm tuyến tỉnh/thành phố tại Việt Nam. Với nguyên lý xác định trình tự nucleotide của một gene cụ thể hoặc cả hệ gene, kỹ thuật giải trình tự gene là sự lựa chọn đầu tiên cho việc xác định các tác nhân mới nổi, phân loại các chủng vi sinh vật, phân tích về dịch tễ học phân tử, phát hiện các đột biến, dấu ấn gây ung thư..., đặc biệt tại các phòng thí nghiệm phòng chống các bệnh nhiễm trùng bệnh viện, chẩn đoán trước sinh, và các phòng xét nghiệm tham chiếu. Tuy nhiên, việc áp dụng kỹ thuật giải trình tự gene cho chẩn đoán tác nhân gây nhiễm trùng trên trẻ em còn chưa khả thi để thực hiện tại các bệnh viện, đặc biệt đối

với bệnh não úng thủy. Phương pháp giải trình tự 16S rRNA được phát triển trong các nghiên cứu cơ bản trong 5 năm trở lại đây và hỗ trợ việc phát hiện vi khuẩn gây bệnh trong quần thể vi sinh vật mà không cần phải sử dụng cặp môi đặc hiệu. Hiện nay, phương pháp đang được phát triển là giải trình tự RNA – transcriptomics để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh bao gồm cả vi rút, vi khuẩn, nấm...Do vậy vấn đề được đặt ra về sự phân bố của vi khuẩn gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh ở Việt Nam là như thế nào? Phương pháp nuôi cấy truyền thống và sinh học phân tử hiện nay ở bệnh viện có thể phát hiện được các tác nhân tiềm ẩn khác không? Khả năng phát hiện các tác nhân gây bệnh của giải trình tự 16S rRNA và RNA là như thế nào?

Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài ***“Xác định tác nhân gây não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh bằng phương pháp giải trình tự RNA và 16S rRNA tại Bệnh viện Nhi Trung ương”*** nhằm cung cấp cơ sở dữ liệu khoa học cho các câu hỏi trên và thực hiện các mục tiêu sau:

1. Mô tả một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhi não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương, 2019-2020.
2. Xác định một số tác nhân gây não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh bằng phương pháp giải trình tự RNA và 16S rRNA.

Chương I. TỔNG QUAN

1.1. Não úng thủy

1.1.1. Định nghĩa não úng thủy

Não úng thủy là thuật ngữ để chỉ một tình trạng bệnh lý của hệ thần kinh, mô tả tình trạng quá nhiều dịch não tủy trong các não thất và khoang dưới nhện [201]. Nói cách khác đó là tình trạng tích tụ quá nhiều dịch não tủy trong não thất do rối loạn các quá trình sản xuất, lưu thông và hấp thụ dẫn đến tình trạng giãn các não thất và tăng áp lực hộp sọ.

1.1.2. Phân loại não úng thủy

1.1.2.1. Phân loại theo căn nguyên

Căn nguyên gây bệnh não úng thủy rất đa dạng, thường xếp thành hai nhóm căn nguyên chính là: bẩm sinh hoặc mắc phải.

a. Não úng thủy bẩm sinh: là tình trạng em bé sinh ra đã mắc não úng thủy. Nguyên nhân có thể do tật nứt đốt sống thần kinh bẩm sinh hoặc do nhiễm trùng trong giai đoạn thai kỳ của người mẹ hoặc ở tháng đầu tiên của trẻ. Các căn nguyên bao gồm: hẹp cống não, thoát vị màng não-tủy, dị tật Arnold-Chiari loại II, hội chứng Dandy-Walker, nang dịch bẩm sinh, hội chứng Bicker-Adams, chảy máu não thất ở trẻ sinh non, nhiễm trùng bẩm sinh, nhiễm Toxoplasma bẩm sinh, nhiễm virus đại cự bào bẩm sinh (Cytomegalovirus-CMV)...

b. Não úng thủy mắc phải: là tình trạng trẻ sinh ra khỏe mạnh nhưng sau đó lại mắc não úng thủy. Não úng thủy mắc phải có thể xuất hiện ở cả người lớn lẫn trẻ em. Thông thường là xuất hiện sau khi nhiễm trùng thần kinh, viêm màng não, u não hoặc tai nạn chấn thương vùng đầu.

Cụ thể các trường hợp này được mô tả như sau:

- Nhiễm trùng hệ thần kinh [127]: tình trạng này gây bít tắc các nút mạch làm giảm khả năng hấp thu dịch não tủy hay viêm tại các đám rối mạch mạc gây tăng tiết dịch não tủy.

Quá trình viêm: các hiện tượng xơ hoá và dính tắc các nút mạch do viêm thường gây nên não úng thủy. Trong trường hợp viêm màng não mủ, dịch não-tủy có độ quánh lớn gây trở ngại đối với lưu thông dịch não-tủy, đến khi các dịch đó tạo mô xơ và dính, dịch não-tủy sẽ không lọt qua được các lỗ trong hệ thống não thất.

Nguyên nhân gây nhiễm trùng có thể do vi khuẩn, vi rút, hoặc ký sinh trùng gây nên. Với trường hợp viêm não thì các tác nhân thường gặp như vi rút Herpes simplex, Cytomegalovirus, vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus* spp. nhóm B, *Listeria monocytogenes*, và *Haemophilus influenzae*.

- Chấn thương ở vùng đầu: có thể gây chảy máu trong não thất, phù nề nhu mô não gây chèn ép hệ thống não thất.

Các dị tật trong màng nhện như: viêm màng nhện xơ hoá, các u nang dạng biểu bì cũng có thể gây hậu quả não úng thủy.

- Một số thuốc dùng trong điều trị như chất cản quang (Thorotrast): có thể gây nên não úng thủy với một tỷ lệ nhất định.

1.1.2.2. Phân loại theo cơ chế bệnh sinh

Não úng thủy được phân làm 2 loại theo chức năng:

- Não úng thủy thể không thông - còn gọi là não úng thủy tắc nghẽn (Obstructive hydrocephalus) [76]: Xảy ra khi dòng chảy của dịch não tủy bị chặn dọc theo một hoặc nhiều đoạn hẹp nối giữa hệ thống não thất. Tắc nghẽn đường lưu thông bình thường của dịch não tủy gây giãn hệ thống não thất phía trên chỗ tắc, tại cống Sylvius hoặc lỗ đáy (Magendie và Luschka).

- Não úng thủy thể thông (Communicating hydrocephalus) [155]: Xảy ra khi dòng chảy của dịch não tủy bị chặn sau khi ra khỏi não thất nhưng dịch não tủy vẫn lưu thông trong não thất. Tình trạng này phát sinh do sự hấp thụ không đầy đủ hoặc do số lượng dịch não tủy được sản xuất tăng bất thường.

Ngoài ra còn có não úng thủy áp bình thường: Là một hình thức đặc biệt của não úng thủy thể không tắc nghẽn, thường gặp ở người lớn đặc trưng bởi hệ thống não thất giãn rộng, có sự liên tục tăng, giảm áp lực dịch não tủy.

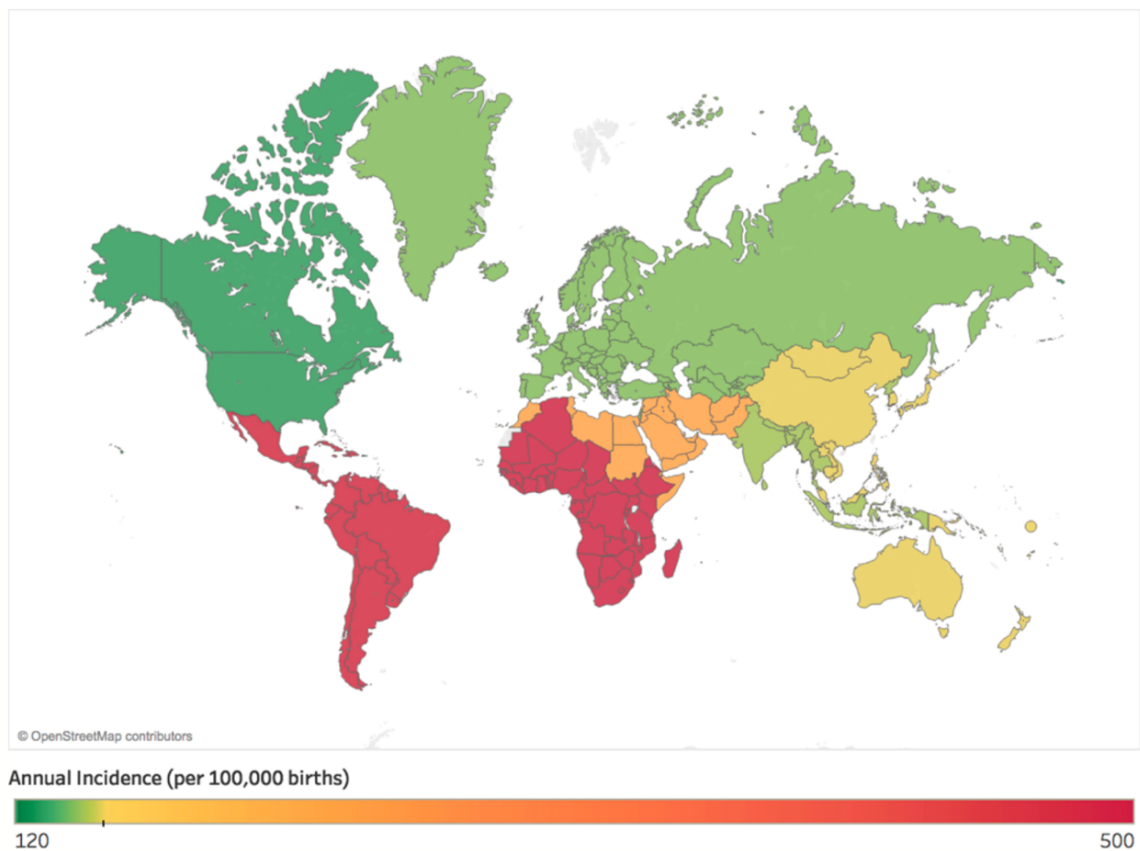
1.1.3. Dịch tễ học bệnh não úng thủy ở trẻ em

1.1.3.1. Tình hình não úng thủy ở trẻ em trên thế giới

Bệnh não úng thủy xuất hiện ở cả trẻ em và người già nhưng phổ biến hơn cả là ở trẻ sơ sinh. Hiện nay, dự đoán trên thế giới khoảng 400,000 trường hợp trẻ mắc mới não úng thủy mỗi năm [50] và tỷ lệ mắc bệnh ở trẻ em là 85/100,000 trẻ [61]. Các thống kê về tình hình mắc bệnh não úng thủy ở trẻ em trên thế giới mang tính rải rác theo từng khu vực và giai đoạn.

Tại Thụy Điển, Fernell và cộng sự đã nghiên cứu trong giai đoạn 1967-1970 và giai đoạn 1979-1982 có tỷ lệ xuất hiện não úng thủy lần lượt là 0,53/1000 và 0.63/1000 [136, 137]. Trong đó, tỷ lệ xuất hiện trước sinh là 70%, trong thời kỳ chu sinh là 25% và sau sinh là 5%. Garne và cộng sự tổng hợp từ bốn nghiên cứu ở châu Âu giai đoạn từ 1996 đến 2003 tỷ lệ mắc não úng thủy bẩm sinh là 4,65/10.000 [142] rút ra kết luận tần suất mắc bệnh không phụ thuộc vào chủng tộc, địa dư... Tuy nhiên bệnh có xu hướng gia tăng hiện nay khoảng 0,5-0,8/1000. Bên cạnh đó, tỷ lệ mắc não úng thủy sơ sinh ở các nước châu Âu là 110/100,000 trẻ [183] được thống kê trong nghiên cứu của Munch và cộng sự năm 2012. Năm 2008, Simon và cộng sự đã nghiên cứu tại Hoa Kỳ và công bố tỷ lệ trẻ sơ sinh mắc não úng thủy là 1/1000 trẻ sinh ra với chi phí cho chữa trị và nằm viện khoảng 2 triệu đô mỗi năm [218]. Tại Châu Phi, khu vực cận Sahara, các trường hợp trẻ sơ sinh mắc não úng thủy có thể lên đến

200 ngàn trẻ trong một năm, phần lớn do nhiễm trùng sơ sinh [232]. Báo cáo năm 2018 đã tính toán tỷ lệ mắc não úng thủy của trẻ em dựa trên thống kê các bài báo nghiên cứu trên toàn thế giới và chỉ ra tỷ lệ mắc não úng thủy của trẻ sơ sinh ở các nước có thu nhập thấp và trung bình cao hơn ở các nước phát triển [131]. Cụ thể tỷ lệ mắc ở khu vực châu Phi và Mỹ La tinh là 145 và 316/100,000 trẻ, trong khi đó tỷ lệ này thấp nhất ở Mỹ và Canada [131]. Tuy nhiên, theo tác giả, các thống kê này còn chưa đầy đủ do các nghiên cứu chủ yếu dựa trên kết quả báo cáo từ bệnh viện, và dự báo tỷ lệ mắc não úng thủy trên thực tế có thể cao hơn.



Hình 1.1. Tỷ lệ mắc não úng thủy phân theo khu vực của Tổ chức Y tế thế giới [131]

1.1.3.2. Tình hình bệnh não úng thủy ở trẻ em Việt Nam

Tại Việt Nam, não úng thủy xuất hiện khá sớm nhưng chưa có thống kê đầy đủ về tình hình mắc bệnh. Theo nghiên cứu của tác giả Nguyễn Quang Bài,

tỷ lệ mắc bệnh não úng thủy ở Việt Nam tương đương với các nước trong khu vực và có tỷ lệ mắc ở bé trai và gái là sấp xỉ [15]. Theo nghiên cứu ở 128 trẻ tại khoa Phẫu thuật thần kinh, Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2017-2018 của tác giả Trần Văn Sĩ, tỷ lệ mắc bệnh ở nam cao hơn nữ, cụ thể tỷ lệ này là nam/nữ = 1,8/1, tỷ lệ mắc ở trẻ dưới 6 tháng tuổi là cao nhất (38,3%) và có 3 trường hợp tử vong [27]. Bên cạnh đó, chẩn đoán nguyên nhân não úng thủy do nhiễm trùng là 38 trẻ và chưa rõ nguyên nhân là 28 trẻ [27].

Các thống kê dịch tễ về não úng thủy ở Việt Nam còn ít và chưa có tính hệ thống. Thông tin chủ yếu nhỏ lẻ trong các bệnh viện và chưa có báo cáo về con số thực tế trên cả nước.

1.1.4. Chẩn đoán và điều trị não úng thủy ở trẻ nhỏ

1.1.4.1 Chẩn đoán

a. Triệu chứng lâm sàng

*** Sơ sinh [234]**

Ở trẻ nhỏ do các khớp sọ chưa đóng kín, triệu chứng rõ ràng nhất là kích thước của đầu tăng lên nhanh bất thường do bị giãn ra để đáp ứng với việc chứa dịch não tủy dư thừa. Ngoài ra, da đầu trẻ mỏng và bóng, thóp trước giãn rộng và căng, đường khớp giãn có thể ở thấy thóp trước liền với thóp sau. Các mạch máu dưới da giãn to, nhìn rõ sự bất thường. Mất dấu hiệu mạch đập, trán trẻ rất rộng. Mắt thường ở tư thế nhìn xuống tạo nên dấu hiệu mặt trời lặn.

*** Trẻ lớn [160]**

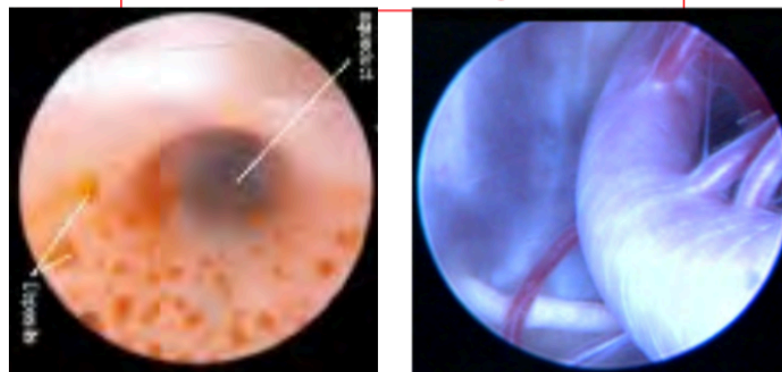
Ở trẻ lớn hơn, khi các khớp sọ đã đóng kín một phần, dấu hiệu đầu to khó nhận biết hơn. Tuy nhiên ở những trẻ đến khám muộn thường có đầu to bất thường. Các triệu chứng thường gặp như sau:

- Dễ kích thích, khó chịu, mệt mỏi, chán ăn, nôn mửa nhiều vào buổi sáng. Dấu hiệu nhưc đầu là dấu hiệu nổi bật trẻ thường đau đầu nhiều vào buổi sáng kèm nôn.

- Mờ mắt có thể có hội chứng não giữa (Parinaud syndrome), phù gai thị có thể teo gai thị, nhìn đôi do liệt dây thần kinh số VI (do tăng áp lực nội sọ nghiêm trọng).
- Vòng đầu tăng trên 2 độ lệch chuẩn có thể thấy dấu hiệu vỏ bình vờ (Macewen sign).
- Thay đổi đáng đi, rối loạn điều phối.
- Thoái lui hoặc chậm phát triển tâm lý-vận động. Tăng phản xạ gân xương, tăng trương lực cơ do ảnh hưởng của hệ tháp.
- Rối loạn phát triển thể chất: béo phì, dậy thì sớm hoặc chậm dậy thì.

b. Cận lâm sàng

* Chẩn đoán hình ảnh:



Hình 1.2: Chẩn đoán hình ảnh nhiễm khuẩn thần kinh, tổn thương (trái) bình thường (phải) [83, 173].

Chụp CLVT/MRI: Tiêu chuẩn chính để chẩn đoán bệnh não úng thủy là trên phim chụp cắt lớp vi tính (CT) hoặc chụp cộng hưởng từ (MRI) sọ não, đánh giá kích thước não thất và các hình thái tổn thương cấu trúc não khác [206].

* Xét nghiệm:

Bệnh nhân nhiễm trùng có thể tiến triển thành não úng thủy. Thông thường, các bác sĩ sẽ dựa trên bệnh sử của người bệnh để xem xét não úng thủy thuộc thể nào (NUT sau nhiễm trùng, NUT không nhiễm trùng). Các xét

nghiệm dịch não thủy ở bệnh nhân não úng thủy cũng được tiến hành để xác định các dấu hiệu cũng như các yếu tố gây viêm nhiễm.

1.1.4.2. Điều trị

a. Các kỹ thuật phẫu thuật [1,3,9]

- * Dẫn lưu não thất bên trong sọ
- * Dẫn lưu não thất ra ngoài sọ

Van Spitz-Holter ra đời vào năm 1952 do Nulsen và Spitz dùng van chảy một chiều bằng cách dẫn lưu não thất vào tâm nhĩ [135]. Từ 1970 đến nay đa số phẫu thuật viên thường dẫn lưu não thất vào ổ bụng. Ở Việt Nam, phương pháp mổ dẫn lưu não thất vào ổ bụng đã được áp dụng từ 1978 đến nay [9]. Dẫn lưu dịch não tủy hay còn gọi là đặt ống Shunt.

Điều trị bằng phương pháp đặt Shunt có thể tránh một số biến chứng của bệnh dẫn đến khuyết tật nhưng nếu không được dùng đúng nhóm đối tượng và đúng cách cũng có thể gây ra biến chứng. Vì thế, cần lựa chọn đúng trẻ cần phải đặt Shunt và phải đảm bảo các điều kiện đặt Shunt đều đạt tiêu chuẩn trước khi sử dụng phương pháp này [69].

b. Các biến chứng gần sau phẫu thuật [1,3,11-13]

Hệ thống dẫn lưu bị tắc

Nếu hệ thống dẫn lưu bị tắc, người bệnh sẽ biểu hiện các triệu chứng của tăng áp lực sọ và còn nặng hơn khi chưa thực hiện dẫn lưu não thất.

Nhiễm trùng

Sau khi đặt dẫn lưu hay gặp là nhiễm trùng vết mổ, nhiễm trùng não thất hay viêm màng não, nhiễm trùng hệ thống van.

Máu tụ trong sọ

Khi đặt dòng rẽ tắt (bắc cầu mạch máu não), não sẽ xẹp xuống và không còn chiếm nhiều dung tích trong hộp sọ như trước, vì vậy nếu tĩnh mạch ở vỏ não bị thương tổn dù rất nhỏ cũng sẽ hình thành khối máu tụ dưới màng cứng.

Do vậy, phẫu thuật viên phải chú ý đặt vị trí trẻ sơ sinh ở tư thế nằm ngửa trong 3-4 ngày để não có đủ thời gian chiếm lại dung tích hộp sọ và ngăn ngừa máu tụ màng cứng.

c. Biến chứng xa sau phẫu thuật can thiệp

Tắc hệ thống dẫn lưu

Nhiễm trùng hệ thống dẫn lưu.

Động kinh: Tỷ lệ xuất hiện động kinh sau điều trị can thiệp là 54% theo tác giả Kokkonen (1994) và tỷ lệ này ở Đức là 20% [14,15].

d. Phát triển tâm-vận động trẻ não úng thủy sau can thiệp

Có can thiệp phẫu thuật: Mặc dù chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá và theo dõi sự phát triển tâm thần - vận động của trẻ sau phẫu thuật, nhưng có thể kể tới nghiên cứu của Hoppe Hirsch (Pháp, 1998) đã báo cáo sau phẫu thuật về sự thiếu hụt vận động là 60%; Ảnh hưởng thị giác là 25%; Chỉ số IQ: trên 90 là 32%, từ 70-90 là 28%, từ 50-70 là 19% và dưới 50 là 21%; Chỉ khoảng 60% số trẻ có thể theo học trong hệ thống giáo dục [16].

Không can thiệp phẫu thuật: Nghiên cứu ở Anh theo dõi 182 trường hợp NUT không được điều trị phẫu thuật và nhận thấy: 49% đã tử vong trong khi theo dõi trong đó 23 trẻ chết trước 18 tháng, 35 trường hợp chết trước 5 tuổi. 45% số trẻ vẫn sống và được đánh giá là não úng thủy ngừng tiến triển; 5% số trẻ bệnh phát triển ngày càng nặng hơn; 1% không theo dõi được. Trong số 40% trẻ còn sống, chỉ số trí tuệ (IQ) được xác định như sau: 27% đạt chỉ số IQ dưới 50; 32% đạt chỉ số IQ từ 50-84 và 41% đạt chỉ số IQ trên 84 [17].

1.2. Nhiễm trùng sơ sinh

1.2.1. Định nghĩa nhiễm trùng sơ sinh

Nhiễm trùng sơ sinh (neonatal sepsis) là một hội chứng lâm sàng ở trẻ ≤ 28 ngày tuổi; bao gồm các triệu chứng nhiễm trùng hệ thống và/hoặc nhiễm trùng khu trú; do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn hiện diện trong máu [119].

Thuật ngữ nhiễm trùng sơ sinh được sử dụng để chỉ định một tình trạng toàn thân có nguồn gốc từ vi khuẩn, vi-rút hoặc nấm (nấm men) có liên quan đến thay đổi trong máu và các biểu hiện lâm sàng khác, dẫn đến tỷ lệ mắc bệnh và tử vong đáng kể [189]. Mặc dù có nhiều năm kinh nghiệm lâm sàng trong việc chăm sóc trẻ sơ sinh được xác nhận hoặc nghi ngờ nhiễm trùng sơ sinh, những thách thức vẫn còn bao gồm việc không có định nghĩa đồng thuận về nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh. Theo truyền thống, định nghĩa về nhiễm trùng bao gồm phân lập mầm bệnh từ dịch cơ thể vô trùng thông thường như máu hoặc dịch não tủy (CSF) [189]. Tuy nhiên, vì các đặc điểm lâm sàng của nhiễm trùng có thể được gây ra bởi các cytokine tiền viêm mạnh, thuật ngữ hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS) cũng đã được sử dụng khi mô tả nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh [175]. Nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh đã được phân loại là khởi phát sớm hoặc khởi phát muộn tùy thuộc vào độ tuổi khởi phát và thời điểm khởi phát. Các biểu hiện lâm sàng của nhiễm trùng khởi phát sớm thường xuất hiện trong vòng 72 giờ đầu đời; một số bác sĩ lâm sàng xác định nhiễm trùng khởi phát sớm, đặc biệt là do *Streptococcus* nhóm B (GBS), vì nhiễm trùng xảy ra dưới 7 ngày tuổi [213]. Nhiễm trùng khởi phát sớm mắc phải trước hoặc trong khi sinh và thường biểu hiện lây truyền dọc từ mẹ sang con. Nhiễm trùng khởi phát muộn xuất hiện sau khi sinh, hoặc trên 3 đến 7 ngày tuổi, và được cho là do các sinh vật mắc phải từ tương tác với môi trường bệnh viện hoặc cộng đồng [107]. Trong một số trường hợp, các vi khuẩn được cho là do nhiễm trùng khởi phát muộn có thể mắc phải khi sinh, nhưng có biểu hiện lâm sàng là nhiễm trùng sau 72 giờ sống. Ở tuổi thai nhỏ và trẻ nữ nhi đủ tháng có nguy cơ cao, nhiều trẻ nằm viện kéo dài, việc chỉ định nhiễm trùng khởi phát muộn có thể áp dụng cho bất kỳ đợt nhiễm trùng nào từ khi sinh ra đến khi xuất viện bất kể tuổi tác tại thời điểm xảy ra đợt bệnh [23]. Đối với nhiễm trùng liên cầu khuẩn nhóm B (GBS), khởi phát muộn thường đề cập đến bệnh xảy ra từ 1 tuần đến 3 tháng

tuổi, với các bệnh nhiễm trùng phát triển sau 3 tháng tuổi được chỉ định là nhiễm trùng khởi phát rất muộn [190].

1.2.2. Dịch tễ học nhiễm trùng sơ sinh

1.2.2.1. Gánh nặng nhiễm trùng sơ sinh

Khoảng 80% ca tử vong sơ sinh là do ba nguyên nhân chính bao gồm sinh non và nhẹ cân, biến chứng và ngạt khi sinh, và nhiễm trùng sơ sinh [91]. Ước tính có khoảng 1,3 đến 3,9 triệu trường hợp nhiễm trùng sơ sinh hàng năm và 400.000 đến 700.000 ca tử vong hàng năm trên toàn thế giới, tùy thuộc vào nghiên cứu [62, 92]. Trong số trẻ sơ sinh sinh ra bệnh viện, nhiễm trùng mắc phải tại bệnh viện chiếm khoảng 4% đến 56% tổng số ca tử vong trong giai đoạn sơ sinh, tùy thuộc vào nghiên cứu và khu vực địa lý [140]. Ước tính 84% số ca tử vong sơ sinh do nhiễm trùng có thể được ngăn ngừa thông qua các biện pháp như chẩn đoán sớm và quản lý lâm sàng kịp thời, phù hợp [107]. Tỷ lệ mắc mới nhiễm trùng sơ sinh cao nhất là ở các nước thu nhập thấp và trung bình (LMICs), đặc biệt là ở khu vực châu Phi [107]. Nhiễm liên cầu khuẩn nhóm B và *Escherichia coli* chiếm 70% nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm [109]. Giai đoạn sơ sinh (28 ngày đầu đời) là thời gian dễ bị tổn thương nhất đối với sự sống còn của trẻ. Mỗi năm, ước tính có khoảng 2,5 triệu trẻ sơ sinh tử vong trong tháng đầu đời, chiếm gần một nửa số ca tử vong ở trẻ em dưới 5 tuổi, theo ước tính của Nhóm liên ngành của Liên hợp quốc về Đánh giá Tỷ lệ Tử vong ở Trẻ em (UN IGME) [94].

Khoảng 375.000 ca tử vong sơ sinh do nhiễm trùng sơ sinh xảy ra trên toàn cầu vào năm 2018, chiếm 15% tổng số ca tử vong sơ sinh, theo dữ liệu từ IGME của Liên Hợp Quốc và được mô hình hóa bởi WHO và Nhóm ước tính dịch tễ học bà mẹ và trẻ em (MCEE) [94]. Tiên lượng của nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh phụ thuộc vào việc nhận biết sớm và điều trị thích hợp, mặc dù các dấu hiệu và triệu chứng thường không đặc hiệu và có thể trùng lặp với các tình

trạng nghiêm trọng khác, chẳng hạn như viêm màng não và viêm phổi. Những dấu hiệu lâm sàng này bao gồm suy hô hấp và tím tái, ngưng thở, khó ăn, thờ ơ hoặc cấu kỉnh và kém lưu thông máu. Để giúp hướng dẫn quản lý lâm sàng các bệnh nhiễm trùng nghiêm trọng (chủ yếu là viêm phổi, nhiễm trùng huyết và viêm màng não) ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, WHO đã đề xuất phân loại lâm sàng về 'nhiễm trùng nghiêm trọng có thể xảy ra' (PSBI) cho trẻ sơ sinh từ 0 đến 59 ngày tuổi, giúp thu thập dữ liệu về các bệnh nhiễm trùng nghiêm trọng, bao gồm nhiễm trùng huyết, từ các cơ sở có khả năng chẩn đoán hạn chế [140, 213]. Ước tính có khoảng 6,9 triệu trường hợp PSBI xảy ra vào năm 2012 ở trẻ sơ sinh với nguy cơ tử vong là 9,8% [81]. Nhiễm trùng huyết ở trẻ sơ sinh chiếm khoảng 25% (khoảng tin cậy 95%, 16-34) các trường hợp PSBI.

Thêm vào đó, ước tính chính xác gánh nặng nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh khác nhau tùy theo thiết lập, với các ước tính khác nhau về gánh nặng giữa các quốc gia có mức thu nhập khác nhau. Xác định tỷ lệ nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh là rất quan trọng và đã trở nên phức tạp do sự thay đổi trong mẫu số được sử dụng. Khi so sánh tỷ lệ nhiễm trùng sơ sinh, điều quan trọng cần lưu ý là mẫu số bao gồm tổng số ca sinh sống hay một biện pháp khác, chẳng hạn như số lần nhập viện. Như đã lưu ý, điều quan trọng là phải xem xét nếu tỷ lệ nhiễm trùng sơ sinh dựa trên dân số hoặc tại bệnh viện được báo cáo. Trong những năm gần đây, tỉ lệ nhiễm trùng sơ sinh giảm nhiều nhờ việc điều trị kháng sinh trong và sau đẻ [140].

1.2.2.2. Tình hình bệnh nhiễm trùng sơ sinh trên thế giới và tại Việt Nam

a. Tình hình bệnh nhiễm trùng sơ sinh trên thế giới

Theo thống kê về tình trạng nhiễm trùng sơ sinh trên thế giới, tỷ lệ trẻ sơ sinh mắc bệnh là 2824 trên 100,000 trẻ sinh sống (95% CI 1892 to 4194) với tỷ lệ tử vong là từ 17,6% [139]. Tỷ lệ trẻ sơ sinh mắc nhiễm trùng sơ sinh ở các nước nghèo và đang phát triển cao gấp 10 lần so với các nước phát triển [141].

Tại Hoa Kỳ, tỷ lệ nhiễm trùng do vi khuẩn sơ sinh thay đổi từ một đến bốn ca nhiễm trùng trên 1000 ca sinh sống, với vị trí địa lý và thay đổi thời gian [140]. Trẻ sơ sinh nam đủ tháng có tỷ lệ nhiễm trùng cao hơn trẻ sơ sinh nữ đủ tháng, mặc dù mối liên quan này chưa thấy ở trẻ sinh non. Tỷ lệ chung của nhiễm trùng khởi phát sớm (được định nghĩa là nuôi cấy máu hoặc vi khuẩn dịch não tủy dương tính dưới 72 giờ tuổi) là 0,77-1 ca nhiễm trùng trên 1000 ca sinh sống [105]. Tỷ lệ mắc và tử vong cao hơn khi trẻ sinh ra nhẹ cân, cụ thể tỷ lệ này là 26/1000 ca sinh sống và 8/1000 sinh sống với cân nặng từ 1000-1500g [96].

Tỉ lệ nhiễm trùng thay đổi tùy theo tuổi thai và cân nặng khi sinh [102]. Ở trẻ sinh non, tỉ lệ này cao hơn nhiều, đặc biệt ở nhóm trẻ cân nặng rất thấp. May và cộng sự nghiên cứu tại Australia và New Zealand thấy tỉ lệ viêm màng não mủ sơ sinh là 9,2% [107]. Theo một số tác giả khác tỉ lệ viêm màng não mủ sơ sinh dao động từ 1,6 đến 4,5% tùy theo năm.

Barton và cộng sự nghiên cứu tại miền tây Ấn Độ thấy tỉ lệ nhiễm trùng tiết niệu ở trẻ sơ sinh là 3,8%. Ghaemi và cộng sự nghiên cứu tại Bệnh viện đa khoa khu Nemazee - Iran thấy tỉ lệ nhiễm trùng tiết niệu ở trẻ sơ sinh là 5,8%, Nhóm các nhà khoa học của Xinias nghiên cứu tại Bệnh viện Thessaloniki - Hy Lạp thấy tỉ lệ nhiễm trùng tiết niệu ở trẻ sơ sinh là 6,5% [107, 213].

Nghiên cứu của Bryce và cộng sự cho thấy trên thế giới 73% trong số 16,6 triệu trẻ em dưới 5 tuổi tử vong hàng năm do 6 nguyên nhân chính: viêm phổi 19%, tiêu chảy 18%, sốt rét 8%, viêm phổi sơ sinh 10%, đẻ non 10% và ngạt lúc đẻ 8% [190, 200]. Cũng theo nhóm nghiên cứu khoảng 40% các trường hợp tử vong ở trẻ sơ sinh là do đẻ non, viêm phổi, ngạt lúc sinh.

Theo Sazawal và cộng sự viêm phổi hiện nay vẫn còn là nguyên nhân làm cho 2 triệu trẻ em tử vong trên thế giới, chiếm 20% các trường hợp tử vong ở trẻ [190]. Khi phân tích Meta phát hiện ra rằng dựa vào cộng đồng can thiệp để xác định và điều trị viêm phổi cũng làm giảm tổng số tử vong ở trẻ sơ sinh

là 27%, ở trẻ nhỏ là 20% và 24% ở trẻ từ 0 đến 4 tuổi [213]. Tỷ lệ tử vong do nhiễm trùng sơ sinh còn rất cao từ 10 đến 20% đối với nhiễm trùng sơ sinh muộn, lên tới trên 50% đối với các nhiễm trùng nặng trước và trong khi đẻ, đặc biệt là ở trẻ sơ sinh non yếu [225]. Theo Tổ chức Y tế thế giới, một số nước đang phát triển ở châu Á, châu Phi và châu Mỹ La tinh, tỉ lệ tử vong do nhiễm trùng sơ sinh chiếm từ 9 đến 84% tử vong sơ sinh, trong đó tỉ lệ tử vong do nhiễm trùng huyết chiếm tới 27 - 69% [107]. Tỷ lệ tử vong do nhiễm trùng mẹ - con dao động từ 4% đến 20% và lên tới 25 - 30% ở trẻ sơ sinh non tháng bị bệnh. Trong những năm gần đây, nhờ các tiến bộ trong chăm sóc sản khoa và nâng cao chất lượng hồi sức sơ sinh, phát hiện và điều trị sớm nhiễm trùng đã làm giảm tỉ lệ mắc nhiễm trùng, giảm tỉ lệ tử vong sơ sinh do nhiễm trùng. Cách đây 20 năm, tỉ lệ tử vong do nhiễm trùng chiếm 50% tử vong sơ sinh, đến năm 1999 giảm còn 10 - 15% [228].

1.2.2.3. Tình hình nhiễm trùng sơ sinh tại Việt Nam

Tại khoa Sơ sinh Bệnh viện Nhi Trung ương trong hai năm 2000 - 2001 có 88 trẻ nhiễm trùng huyết trong số 4147 bệnh nhân điều trị tại khoa, chiếm 2,1% (trong đó tử vong 61 trường hợp chiếm 69,3%) [14]. Cũng tại khoa Sơ sinh Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 7/2019 đến tháng 6/2020 trong số 133 trẻ sơ sinh vào điều trị, có 32 trẻ sơ sinh được chẩn đoán viêm màng não nhiễm trùng, chiếm tỷ lệ 24% [18]. Nghiên cứu của Phạm Thanh Mai và cộng sự tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương (2003) có 132 trường hợp nhiễm trùng sơ sinh sớm, trong đó có 9 trường hợp tử vong chiếm 6,8% [21, 25]. Nghiên cứu nhiễm trùng sơ sinh sớm ở trẻ sinh mổ tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương đã ghi nhận trẻ đủ tháng sinh thường, có tỷ lệ trẻ mắc cao hơn trẻ sinh mổ và tỷ lệ nhiễm trùng sơ sinh sớm là cao nhất ở tuổi thai $\geq 37 - 38$ tuần (50%) [26]. Tại Bệnh viện đa khoa Trung ương Thái Nguyên trong 5 năm từ 2001 đến 2005 có 2131 trẻ sơ sinh vào điều trị, trong đó có 928 trường hợp được chẩn đoán là nhiễm

trùng, tỉ lệ nhiễm trùng sơ sin[134]h dao động từ 20 - 22% tùy theo năm. Tỉ lệ tử vong sơ sinh là 17,5% (trong đó tỉ lệ tử vong sơ sinh non tháng 76%) [14]. Cũng tại Bệnh viện đa khoa Trung ương Thái Nguyên, Đinh Thị Thuý Hà và CS (2006) thấy tỉ lệ viêm phổi ở trẻ 0 - 3 ngày chiếm 60%, tỉ lệ tử vong do viêm phổi sơ sinh là 13,3%. Kết quả nghiên cứu của Tạ Văn Trầm (2005) tại Bệnh viện đa khoa trung tâm Tiền Giang, thấy có 643 trẻ sơ sinh nhập viện trong tổng số 2.777 trẻ dưới 1 tuổi vào viện, chiếm 23,2% (trong đó viêm phổi sơ sinh 8,2%, viêm rốn 1,7%, nhiễm trùng huyết 0,5%) [25]. Theo Lý Thái Minh, trong nghiên cứu tại các bệnh viện tuyến tỉnh Đồng Tháp, tỷ lệ tử vong sơ sinh theo phân loại ICD 10 của nhiễm trùng huyết và viêm phổi lần lượt là 64,1% (trong số 59 trẻ), 54,3% (trong số 50 trẻ) [11]. Theo nghiên cứu tại khoa Nhi của bệnh viện An Giang, tỷ lệ tử vong sơ sinh do nhiễm trùng huyết là 32,9% và do viêm phổi là 23,5% [10]. Nghiên cứu Dương Quỳnh Anh từ tháng 7/2020 đến tháng 12/2020 thấy tỉ lệ tử vong ở nhóm trẻ sinh non do nhiễm trùng huyết sơ sinh là 18 %, xuất huyết – viêm màng não là 18,8% [8].

1.2.2.4. Sinh lý bệnh và phân loại nhiễm trùng sơ sinh

a. Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm

Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm (early onset sepsis – EOS) được định nghĩa là khi các triệu chứng nhiễm trùng khởi phát trong vòng những ngày đầu sau khi sinh tuy nhiên vẫn có nhiều ý kiến khác nhau về độ tuổi khởi phát [222]. Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm là triệu chứng nhiễm trùng xuất hiện dưới 72 giờ sau sinh. Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm (EOS) được xác định khác nhau dựa trên độ tuổi khởi phát, như nhiễm trùng huyết hoặc viêm màng não do vi khuẩn ở thời điểm 72 giờ với trẻ ở phòng chăm sóc đặc biệt dành cho sơ sinh (NICU) [80]. Ở trẻ sinh non, nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm được các chuyên gia thống nhất xác định là các nhiễm trùng xảy ra trong 3 ngày đầu đời và tác nhân là vi khuẩn lây truyền từ mẹ sang con trước hoặc sau khi sinh [101].

Bên cạnh đó, nhiều ý kiến khác định nghĩa nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm là nhiễm trùng có các triệu chứng < 7 ngày tuổi [80, 117].

Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm xảy ra trong tử cung từ nhau thai hoặc phổ biến hơn là vi khuẩn tăng dần xâm nhập vào tử cung từ môi trường âm đạo sau khi vỡ màng [96]. Ngoài ra, trẻ sơ sinh có thể bị nhiễm bệnh khi tiếp xúc với vi khuẩn, vi rút hoặc nấm có khả năng gây bệnh trong quá trình sinh [117].

Sinh non dưới 37 tuần, vỡ ối sớm và thời gian kéo dài trên 18 tiếng, nhiễm trùng trong khi sinh từ mẹ và tình trạng kinh tế xã hội khó khăn có liên quan chặt chẽ với nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm [96]. Nghiên cứu của nhóm tác giả Chan và cộng sự năm 2013 đã phân biệt các loại yếu tố nguy cơ thành các nhóm sau: Nhiễm trùng từ mẹ bị nhiễm trùng, nhiễm trùng xâm lấn từ mẹ, và các yếu tố nguy cơ nhiễm trùng từ mẹ [118]. Nhiễm trùng từ mẹ bị nhiễm trùng được xác định dựa trên các tiêu chí như nhiễm trùng do vi khuẩn phát hiện qua nuôi cấy, xét nghiệm sinh học phân tử như nhiễm trùng huyết, viêm ối, nhiễm trùng đường tiết niệu hoặc viêm màng ối, hoặc qua các dấu hiệu lâm sàng như sốt khi chuyển dạ ở mẹ, đau tử cung, dịch tiết âm đạo có mùi [179]. Viêm màng ối là một trong những nguyên nhân gây nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm [149]. Viêm màng ối, thường được gọi là nhiễm trùng trong ối, là tình trạng viêm cấp tính của màng thai nhi, do nhiễm trùng. Hội chứng lâm sàng của viêm màng ối có thể bao gồm các dấu hiệu và triệu chứng của mẹ (sốt, tăng bạch cầu, tiết dịch đục hoặc có mùi, và đau bụng dưới) và các dấu hiệu của thai nhi (nhịp tim nhanh là phổ biến nhất) [67, 97]. Nhiễm trùng xâm lấn từ mẹ được xác định nếu vi khuẩn gây nhiễm trùng ở người mẹ xuất hiện ở trẻ sơ sinh ngay cả khi có hoặc không có dấu hiệu hoặc triệu chứng nhiễm trùng (thông qua nuôi cấy, xét nghiệm dương tính), một số nghiên cứu đã xác nhận vai trò của nhiễm trùng xâm lấn từ mẹ đối với sự phát triển tiếp theo của nhiễm trùng huyết ở trẻ sơ sinh (đặc biệt đối với *Streptococcus* nhóm B) [30]. Các yếu

tổ nguy cơ nhiễm trùng từ mẹ bao gồm vỡ ối trước khi chuyển dạ (vỡ ối trước khi chuyển dạ ở tuần thai ≥ 37), vỡ ối trước khi chuyển dạ (vỡ ối trước khi chuyển dạ ở < 37 tuần tuổi thai) và vỡ ối kéo dài của màng (thời gian vỡ màng $> 8-24$ giờ hoặc không xác định) [118].

b. Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn hoặc mắc phải

Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn (late onset sepsis) một số chuyên gia định nghĩa nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn là nhiễm trùng khởi phát ở thời điểm > 72 giờ tuổi [213]. Trong khi đó, nhiều ý kiến khác định nghĩa nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn là nhiễm trùng có các triệu chứng khởi phát ≥ 7 ngày tuổi và kéo dài đến 3 tháng tuổi. Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn thường liên quan đến lây nhiễm qua can thiệp thủ thuật xâm nhập hoặc nhiễm trùng bệnh viện. Trong 3 tháng đầu đời, hệ thống miễn dịch bẩm sinh, bao gồm thực bào, tế bào tiêu diệt tự nhiên, tế bào trình diện kháng nguyên và hệ thống bổ thể, cung cấp khả năng bảo vệ chống lại mầm bệnh [35]. Giảm chức năng bạch cầu trung tính và nồng độ globulin miễn dịch thấp làm tăng tính nhạy cảm của trẻ sinh non đối với nhiễm trùng [114]. Trẻ sơ sinh có hệ thống miễn dịch chưa trưởng thành có thể lây nhiễm vi sinh vật từ môi trường bên ngoài. Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn có nhiều khả năng là do vi khuẩn Gram dương, bao gồm tụ cầu khuẩn coagulase âm tính và liên cầu khuẩn [214]. Hầu hết các trường hợp viêm màng não là nhiễm trùng khởi phát muộn do lây lan qua đám rối màng đệm vào thần kinh trung ương [188]. Viêm màng não khởi phát muộn là kết quả của nhiễm trùng các khuyết tật ống thần kinh mở, đường xoang bẩm sinh, xâm nhập vết thương từ da đầu thai nhi; Hình thành áp-xe, viêm não thất, nhiễm trùng máu, não úng thủy và tràn dịch dưới màng cứng là các biến chứng của viêm màng não xảy ra ở trẻ sơ sinh [13].

Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát rất muộn (late, late onset sepsis) là nhiễm trùng có các triệu chứng khởi phát > 3 tháng tuổi, hay gặp ở trẻ sinh non và rất khó phát hiện cũng như theo dõi [52].

Nhiễm trùng sơ sinh bệnh viện (neonatal nosocomial infections): Theo Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật Mỹ (CDC), nhiễm trùng bệnh viện sơ sinh được định nghĩa là bất cứ tình trạng nhiễm trùng nào không hiện diện hoặc ủ bệnh ở thời điểm trẻ sơ sinh nhập viện, mà mắc phải trong quá trình nằm viện hoặc đến 48 giờ sau khi xuất viện [143]; và ngoại trừ những trường hợp nhiễm trùng bào thai do TORCH (TO: Toxoplasma gondii, R: Rubella, C: Cytomegalovirus, H: Herpes simplex virus; những tác nhân khác như giang mai, HBV) [185].

1.2.2.5. Triệu chứng và điều trị

a. Triệu chứng

Khi xâm nhập vào cơ thể, vi sinh vật gây ra một loạt các phản ứng của hệ miễn dịch thể hiện nhiễm khuẩn hệ thống, biểu hiện trên lâm sàng bằng các dấu hiệu rối loạn chức năng nhiều cơ quan.

Các triệu chứng lâm sàng của nhiễm trùng sơ sinh đa dạng, không đặc hiệu, nhất là ở trẻ đẻ non [204]. Mặc dù các biểu hiện lâm sàng của nhiễm trùng sơ sinh không đặc hiệu, việc khám lâm sàng cẩn thận vẫn là cách tốt nhất để phát hiện trẻ có khả năng nhiễm trùng.

- Nhiễm trùng hô hấp [180]:

+ Trường hợp viêm nhẹ có các triệu chứng: trẻ có thể chảy mũi hoặc không, có thể ho và bú ít hơn bình thường.

+ Trường hợp nặng có các triệu chứng: Đùn bọt cưa, tím tái, sốt cao hoặc hạ nhiệt độ, thở nhanh trên 60 lần/phút, bú kém. Nghe phổi có thể thấy ran ẩm nhỏ hạt hoặc không.

+ Trường hợp rất nặng: Trẻ ngủ lịm hoặc kích thích quấy khóc, có thể sốt cao hoặc hạ nhiệt độ, rối loạn nhịp thở hoặc có cơn ngừng thở, thở rên hoặc ngủ lịm, tím tái đầu chi và toàn thân. Trẻ có biểu hiện tút lõm lồng ngực mạnh,

bỏ bú, chướng bụng, nghe phổi có thể thấy có thấy ran ẩm nhỏ hạt hoặc không (trẻ đẻ non).

- Tổn thương trên da: tổn thương nông hoặc sâu, chứa nước trong hoặc mụn đục có mũ. Vị trí thường gặp ở trán, gáy, lưng, cổ, nách, bẹn, có thể ở toàn thân.

- Tại rốn: viêm da và tổ chức da quanh rốn, rốn thường rụng muộn, rốn ướt.

- Triệu chứng lâm sàng của nhiễm khuẩn tiết niệu sơ sinh thường ít đặc hiệu, có thể có nhiều triệu chứng, có thể không có triệu chứng. Các triệu chứng thường gặp: sốt hoặc hạ nhiệt độ, bú kém - bỏ bú, vàng da, sụt cân, biểu hiện nhiễm trùng huyết [172].

- Triệu chứng thường gặp trong viêm màng não mủ sơ sinh [168]: sốt 38 - 39⁰C; Ỉa chảy là triệu chứng thường gặp; Chướng bụng, nôn vọt (xảy ra muộn); Thóp phồng (thường xảy ra muộn), li bì hoặc kích thích, rối loạn trương lực cơ, co giật, có thể không có thóp phồng nếu có ỉa chảy nặng.

- Triệu chứng chung của nhiễm trùng huyết [157]: li bì, hạ nhiệt độ (thường gặp ở thể nặng và đẻ non), vàng da, tím tái hoặc da xám, suy hô hấp (thở rên hoặc thở nhanh, thở chậm), tuần hoàn ngoại vi giảm, tim đập yếu, rối loạn tiêu hoá (ỉa chảy, chướng bụng, nôn), gan - lách to, trong trường hợp nặng có thể có suy thận cấp, đái ít, có thể gặp phù cứng bì, nổi ban, xuất huyết dưới da.

b. Điều trị

Đối với nhiễm trùng sơ sinh, kháng sinh được sử dụng trong điều trị dựa trên kết quả khám lâm sàng, kết quả xét nghiệm và đánh giá yếu tố nguy cơ.

Theo nghiên cứu của Lê Đức Quang và Nguyễn Thị Quỳnh Nga tại Bệnh viện Nhi Trung ương, trẻ sơ sinh mắc nhiễm trùng huyết do *Staphylococcus aureus* được điều trị chủ yếu bằng vancomycin, một số bệnh nhân không đáp ứng thì được thay thế bằng linezolid [19].

Đinh Thị Thuý Hà và cộng sự khi nghiên cứu viêm phổi sơ sinh cho thấy ampiciline được dùng nhiều ở nhóm trẻ đẻ non chiếm 40,6% [3]. Tỷ lệ sử dụng kết hợp giữa cefotaxim với gentamycin ở nhóm trẻ đẻ non cao nhất chiếm 53,1%, ampiciline kết hợp với gentamycin được dùng nhiều ở nhóm trẻ đủ tháng chiếm 39,3%. Sử dụng 3 loại kháng sinh trong điều trị gấp ở nhóm đủ tháng chiếm 3,6%. Sử dụng một loại kháng sinh đơn thuần được dùng nhiều hơn ở nhóm trẻ đẻ non, chiếm tỷ lệ 56,3%. Phối hợp từ hai loại kháng sinh trở lên ở nhóm đủ tháng là 82,1% và nhóm đẻ non là 81,3%.

Nguyễn Thị Thanh khi nghiên cứu đặc điểm lâm sàng viêm màng não mủ sơ sinh, thấy mức độ nhạy cảm của một số chủng vi khuẩn thường gặp trong viêm màng não mủ sơ sinh như sau [16]:

- + *Klebsiella pneumoniae* chỉ còn nhạy cảm với ofloxacin và tienam, kháng lại hầu hết các kháng sinh còn lại thuộc nhóm betalactamin thế hệ ba và amikacin.

- + Tụ cầu vàng chỉ còn nhạy cảm với vancomycin và tienam, ngay với ofloxacin đã kháng tới 50%.

- + Liên cầu khuẩn nhóm B còn nhạy cảm với penicillin 83%, ceftazidim 83%, ceftriaxon 83%, cefotaxim 83%, vancomycin 83% và tienam 100%.

1.3. Tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

Khi phân loại não úng thủy, các nhà khoa học chia thành hai nhóm theo nguyên nhân gây bệnh là não úng thủy sau nhiễm trùng và não úng thủy không do nhiễm trùng [239]. Não úng thủy có thể xảy ra sau nhiễm trùng, gây nên các tích tụ dịch ở khoang sọ não [46]. Não úng thủy sau nhiễm trùng (PIH) thường do tác nhân vi sinh vật gây nên các nhiễm trùng như liên cầu khuẩn nhóm B (GBS), *Escherichia coli* và *Haemophilus influenzae*. Các vi khuẩn này gây nên viêm màng não và lao màng não. Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của nhóm nhà khoa học thuộc đại học Bang Pennsylvania thực hiện tại Uganda, vi khuẩn gram

âm thuộc nhóm Gamma-proteobacteria (bao gồm *Pseudomonas*, *Escherichia*, và *Acinetobacter*) và Betaproteobacteria (*Burkholderia*) là căn nguyên gây bệnh nhân não úng thủy ở trẻ sơ sinh [71]. Ở nghiên cứu tiếp theo tại Uganda, các nhà khoa học đã tìm ra vi khuẩn *Paenibacillus thiaminolyticus* gây nên não úng thủy sau nhiễm trùng ở trẻ em [83]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về căn nguyên gây bệnh não úng thủy chưa có báo cáo cụ thể và thường mô tả rất ít trong các báo cáo số liệu lâm sàng. Theo báo cáo của tác giả Đường Hồng Hưng thực hiện tại Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2015, căn nguyên của não úng thủy gồm rất nhiều yếu tố trong đó có viêm màng não và nhiễm trùng do Cytomegalovirus (CMV) [6]. Nghiên cứu này không đưa ra căn nguyên vi sinh vật cụ thể của viêm màng não gây não úng thủy nhưng có đề cập đến các nhiễm trùng sau đặt ống dẫn lưu dịch não tủy do các vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* và *Klebsiella pneumoniae* [6]. Não úng thủy sau nhiễm trùng có thể tiến triển từ nhiễm trùng sơ sinh như viêm màng não, viêm não hay nhiễm CMV bẩm sinh.

Giống như ở não úng thủy, liên cầu khuẩn nhóm B (GBS) và *Escherichia coli* là hai nguyên nhân phổ biến nhất gây ra nhiễm trùng sơ sinh [165, 222]. Trong một nghiên cứu về EOS được thực hiện bởi Viện Sức khỏe Trẻ em và Phát triển Con người Quốc gia (NICHD), tỷ lệ mắc EOS do *Escherichia coli* và GBS gây ra ở trẻ sơ sinh có cân nặng sơ sinh rất thấp lần lượt là 5,1 và 2,1 trên 1.000 ca sinh sống, đối với trẻ sơ sinh có cân nặng sơ sinh từ 1.500 g đến 2.500 g, tỷ lệ mắc lần lượt là 0,5 và 0,4 trên 1.000 ca sinh sống [224]. Tác nhân gây bệnh phổ biến nhất của LOS là CoNS (Coagulase-negative staphylococcus), đặc biệt là ở trẻ sinh non. Trong nghiên cứu về LOS do NICHD thực hiện, gần một nửa số LOS ở trẻ sơ sinh nhẹ cân là do CoNS (48%), tiếp theo là 22% vi khuẩn Gram dương khác bao gồm *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, GBS; và 18% vi khuẩn gram âm bao gồm *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia* và nấm (12%) [223]. Đặc

biệt, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* và *Pseudomonas aeruginosa* có liên quan đáng kể đến LOS ở trẻ sơ sinh được đưa vào khoa Săn sóc tích cực sơ sinh (NICU) [92]. Theo nghiên cứu tại Bệnh viện Nhi Trung ương, căn nguyên gây nhiễm trùng sơ sinh bao gồm các vi khuẩn *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Serratia marcescens* trong đó *Streptococcus* spp. là căn nguyên thường gặp nhất gây nhiễm trùng huyết sơ sinh sớm và *Klebsiella pneumoniae* chiếm tỉ lệ cao nhất ở nhóm nhiễm trùng sơ sinh muộn [5].

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã thực hiện và đưa ra các tác nhân vi sinh vật phổ biến gây nên nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm và nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn, các tác nhân được liệt kê trong Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Các tác nhân chính gây nhiễm trùng sơ sinh trên thế giới

Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm	Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn
Vi khuẩn Gram dương	Vi khuẩn Gram dương
Liên cầu khuẩn nhóm B (GBS)	CoSN (Coagulase negative staphylococci)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>
Nhóm <i>Streptococci</i> : <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus viridans</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>	

Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm	Nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn
Vi khuẩn Gram âm	Vi khuẩn Gram âm
• <i>Escherichia coli</i> • <i>Haemophilus influenzae</i>	• <i>Escherichia coli</i> • <i>Klebsiella</i> spp. • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Enterobacter</i> spp. • <i>Citrobacter</i> spp. • <i>Serratia</i> spp. • <i>Candida</i> spp.

Khi xác định các tác nhân gây nhiễm trùng sơ sinh, có thể phân chia theo vị trí nhiễm trùng như nhiễm trùng da, niêm mạc, nhiễm trùng hô hấp, viêm phổi, nhiễm trùng tiết niệu, viêm màng não và nhiễm trùng huyết. Các nhiễm trùng này có thể do một hoặc nhiều tác nhân gây nên và một tác nhân cũng có thể gây nhiễm trùng ở nhiều vị trí.

Theo nghiên cứu tại bệnh viện sản nhi Nghệ An, căn nguyên viêm phổi ở trẻ sơ sinh là vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* chiếm 42,9%, căn nguyên gây viêm da là tụ cầu vàng chiếm 100%, căn nguyên gây nhiễm trùng huyết là *Klebsiella pneumoniae* chiếm 30,6% và vi khuẩn *Staphylococcus aureus* chiếm 18,5% [13].

Nhiễm trùng da: vi khuẩn gây bệnh thường gặp nhất là liên cầu nhóm A gây nên các nhiễm khuẩn nông ở da như viêm quầng và các mụn phỏng ngoài da [221]. Các nhiễm khuẩn sâu hơn như nhọt và cụm nhọt thường do tụ cầu vàng. Nhiễm khuẩn da sau chấn thương, giai đoạn đầu thường do tụ cầu vàng, giai đoạn muộn thường do trực khuẩn mủ xanh (*P. aeruginosa*) [156].

Nhiễm trùng niêm mạc trẻ sơ sinh: nhiễm khuẩn kết mạc thường gặp do *Chlamydia trachomatis* và lậu cầu (*Neisseria gonorrhoeae*) [198]. Nhiễm khuẩn niêm mạc miệng thường gặp do nấm *Candida* [226].

Nhiễm trùng hô hấp: vi khuẩn gây bệnh hay gặp nhất là các vi khuẩn gram âm, *Haemophilus influenzae* [124].

Nghiên cứu tại bệnh viện Trẻ em Hải Phòng, tác nhân gây bệnh viêm phổi cộng đồng ở trẻ sơ sinh bao gồm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (60,4%), *Haemophilus influenzae* (12,3%), *Moraxella catarrhalis* (7,7%) và *Streptococcus pneumoniae* (6,5%) [2].

Nhiễm trùng tiết niệu: vi khuẩn gây bệnh phổ biến là *E. coli*, tiếp theo là *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*. Ngoài ra có thể do *Mycoplasma*, nấm.

Viêm màng não mủ ở trẻ sơ sinh xuất hiện ở trẻ có nhiễm trùng, thường gặp ở trẻ đẻ non hoặc ở những trường hợp mẹ có nhiễm khuẩn khi mang thai hoặc nhiễm khuẩn khi đẻ [40]. Nguyên nhân gây bệnh do vi khuẩn gram âm đường ruột *E. coli* và liên cầu tan huyết nhóm B (*Streptococcus* nhóm B) [153].

Nhiễm trùng huyết [151]: hiện nay còn gặp khá nhiều, có thể xảy ra tiên phát hoặc thứ phát sau các nhiễm khuẩn cục bộ như nhiễm khuẩn da, rốn, màng não... nó liên quan tới nhiễm khuẩn quanh đẻ từ mẹ, nước ối, thai bị nhiễm khuẩn trước đẻ. Nguyên nhân gây bệnh do vi khuẩn gram âm, thường gặp như *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* và do vi khuẩn gram dương như liên cầu β tan huyết nhóm B (*Streptococcus* nhóm B), *Listeria monocytogenes*, tụ cầu, phế cầu. Phạm Thị Xuân Tú khi nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, sinh học của nhiễm trùng huyết sơ sinh cho thấy vi khuẩn gây nhiễm trùng huyết sơ sinh chủ yếu là vi khuẩn gram âm, đứng đầu là *Klebsiella* chiếm 58,0% [23].

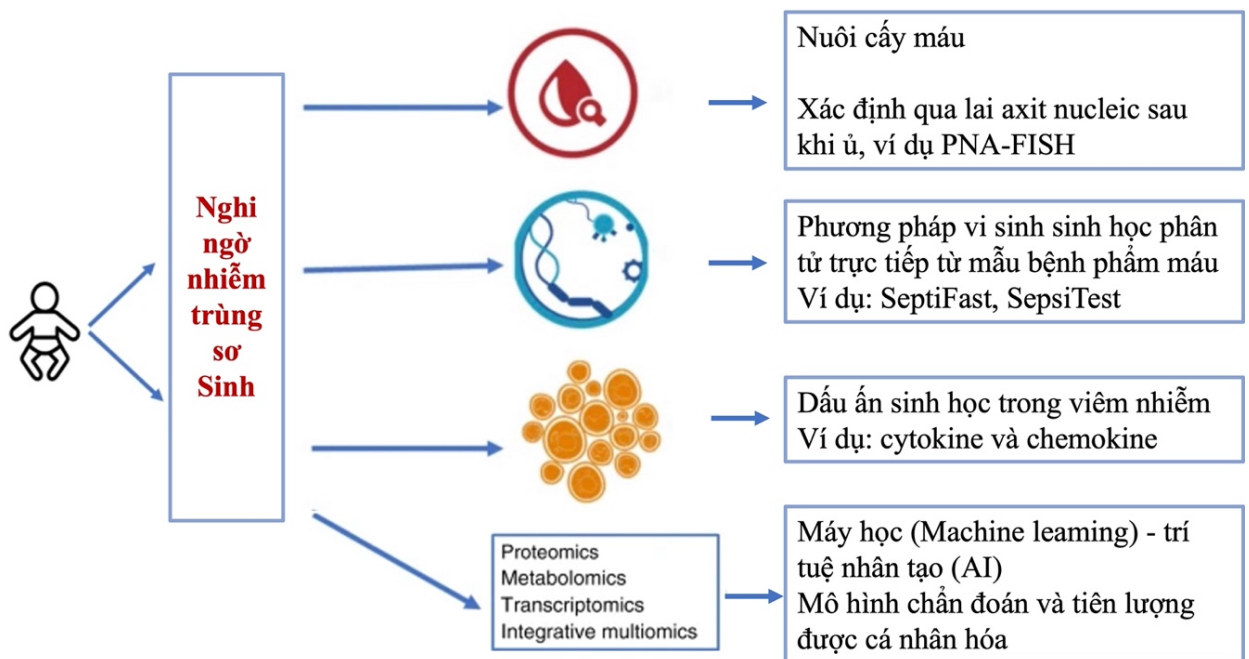
Bảng 1.2. Tác nhân vi rút và vi sinh vật khác gây não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

Vi rút	Khác
Adenovirus	<i>Mycoplasma hominis</i>
CMV	<i>Toxoplasma</i> spp.
Enterovirus	<i>Candida</i> spp.
Herpes simplex virus	
HIV	
Hepatitis B virus	
Rubella virus	
Rotavirus	

Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vi rút đại thực bào (Cytomegalovirus – CMV) là một trong những tác nhân gây nên não úng thủy [196]. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cũng cho thấy Herpes simplex virus là nguyên nhân gây nên nhiễm trùng sơ sinh và có thể phát triển thành não úng thủy [150]. Theo nghiên cứu của trường đại học Utrecht, Adenovirus, CMV, Enterovirus, HSV, Rubella, Rotavirus, Parvovirus, Zika và *Toxoplasma* spp. là các tác nhân gây nên nhiễm trùng sơ sinh, cụ thể là tác động lên hệ thần kinh của trẻ sơ sinh gây viêm não, viêm màng não [128]. Các vi rút này được phân nhóm vào nhiễm trùng TORCH hay nhiễm trùng lây từ mẹ sang con. Nhiễm trùng TORCH bao gồm các tác nhân gây nên như *Toxoplasma*, Rubella, Cytomegalovirus (CMV), Herpes simplex virus (HSV) và một số loại tác nhân khác. Tác giả Cao Thị Mai Lê đã có nghiên cứu điều tra tại Bệnh viện Nhi Trung ương về nhóm nhiễm trùng TORCH cho thấy sự lưu hành của các vi rút thuộc nhóm này ở trẻ sơ sinh [1]. Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Quỳnh Nga và cộng sự trên 68 trẻ sơ sinh từ năm 2018 đến 2021 tại Bệnh viện Nhi Trung ương, tỷ lệ trẻ mắc CMV là 58,8%, Rubella là 4,4% và *Toxoplasma* là 4,4%, còn lại là các tác nhân khác [186].

1.4. Các phương pháp sinh học phân tử chẩn đoán não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

Chẩn đoán sớm nhiễm khuẩn sơ sinh, não úng thủy do nhiễm trùng và điều trị kịp thời sẽ giảm tỉ lệ bệnh nặng và hạ thấp tỉ lệ tử vong, đặc biệt với đối tượng là trẻ sơ sinh. Chẩn đoán không đúng nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy ở trẻ sơ sinh có thể dẫn đến việc sử dụng kháng sinh không phù hợp có thể thúc đẩy tình trạng kháng kháng sinh. Nuôi cấy vi sinh vật trong máu hoặc các chất dịch cơ thể vô trùng khác là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh. Cấy máu thường được cho là có độ nhạy thấp ở trẻ sơ sinh vì những lý do sau: mức độ nhiễm trùng và não úng thủy sơ sinh thấp; khối lượng tiêm nhỏ trong chai nuôi cấy; và sử dụng kháng sinh trong khi sinh [93]. Ngoài ra, kết quả nuôi cấy vi sinh vật không có sẵn trong ít nhất 24 đến 72 giờ. Khả năng chẩn đoán của các hệ thống nuôi cấy máu đã được cải thiện trong thập kỷ qua với sự ra đời của các hệ thống tự động để theo dõi nuôi cấy máu liên tục.



Hình 1.3. Các phương pháp phân tích chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh [42]

Mặc dù các hệ thống tự động có thể tiết kiệm thời gian, nhưng vẫn phải thực hiện các thử nghiệm đặc trưng (ví dụ: sinh hóa) để xác định mầm bệnh. Một xét nghiệm chẩn đoán lý tưởng cho nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy ở trẻ sơ sinh phải nhanh, nhạy và đặc hiệu; phát hiện tất cả các vi khuẩn liên quan ở trẻ sơ sinh; và không bị ảnh hưởng bởi kháng sinh của mẹ. Xét nghiệm âm tính cần phải chính xác và đáng tin cậy để không có trẻ sơ sinh bị nhiễm trùng nào không được điều trị.

Những tiến bộ trong sinh học phân tử đã được áp dụng vào các kỹ thuật xét nghiệm mới có thể chẩn đoán nhiễm trùng huyết và não úng thủy nhanh hơn so với nuôi cấy vi sinh vật. Các xét nghiệm phân tử có thể được hoàn thành trong 12 giờ và có thể có độ nhạy tốt hơn so với nuôi cấy vi sinh vật. PCR phạm vi rộng nhắm vào gene 16S rRNA, một gene phổ biến được bảo tồn trong tất cả các vi khuẩn và bao gồm cả tái bảo tồn và biến đổi [159]. Các vùng bảo tồn được tách ra bởi các môi chung hay môi phổ rộng (universal primers) để xác định vi khuẩn gây bệnh và các vùng biến đổi để xác định chi hoặc loài bằng xét nghiệm đặc trưng. Với nguyên lý xác định trình tự nucleotide của một gene cụ thể hoặc cả hệ gene, kỹ thuật giải trình tự gene là sự lựa chọn ưu tiên cho việc xác định các tác nhân mới nổi, phân loại các chủng vi sinh vật, phân tích về dịch tễ học phân tử, phát hiện các đột biến, dấu ấn gây ung thư..., đặc biệt tại các phòng thí nghiệm phòng chống các bệnh nhiễm trùng bệnh viện, chẩn đoán trước sinh, và các phòng xét nghiệm tham chiếu. Gần đây, kỹ thuật giải trình tự gene thế hệ mới (next generation sequencing) với hiệu năng cao đã làm giảm giá thành của kỹ thuật giải trình tự gene và cho phép đọc trình tự với độ dài có thể bằng cả hệ gene (hàng tỉ cặp base) vì vậy kỹ thuật này không chỉ áp dụng giới hạn trong các nghiên cứu cơ bản mà có thể dùng trong chẩn đoán lâm sàng.

1.4.1 PCR trong chẩn đoán vi sinh vật gây bệnh nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy

1.4.1.1. Phương pháp PCR

Phương pháp phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Phương pháp này được khai thác bởi Chamberlain et al. vào năm 1988, và nó đã được áp dụng như một công cụ chẩn đoán nhiễm trùng từ những năm 1990. PCR (viết tắt của Polymerase Chain Reaction - chuỗi phản ứng của polymerase hay phản ứng khuếch đại gene) là phát minh của nhà khoa học người Mỹ Kary Mullis và đã đạt giải Nobel (1993) [86]. Phương pháp này dựa vào các chu kỳ nhiệt để “khuếch đại” tạo ra một số lượng lớn các bản sao của DNA.

Lợi ích của phương pháp PCR giúp dễ dàng phát hiện nhiều bệnh lý cùng một lúc từ một lượng mẫu nhỏ; Kết quả có thể được phân tích dễ dàng và phương pháp tiết kiệm thời gian và chi phí [192].

Kỹ thuật PCR ngày càng được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học và cả y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau, như phát hiện các bệnh di truyền, nhận dạng vân tay DNA, phát hiện vi khuẩn hay vi rút ở nồng độ thấp trong các mẫu môi trường và bệnh phẩm, tách dòng gene, và xác định huyết thống [75, 86]. Nghiên cứu tại Ấn Độ tiến hành so sánh ba phương pháp chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh bao gồm sàng lọc nhiễm trùng sơ sinh, nuôi cấy và PCR [236]. Kết quả cho thấy sàng lọc nhiễm trùng sơ sinh dương tính ở 24 (24%) ca bệnh trong nhóm nghiên cứu với độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 100% và 83,5% [236]. Trong khi đó nuôi cấy máu dương tính ở 09 (9%) với độ nhạy 69,2% và độ đặc hiệu 100%; PCR dương tính ở 13 (13%) ca bệnh (9% là cả nuôi cấy máu và sàng lọc nhiễm trùng huyết dương tính và 4% dương tính bằng sàng lọc nhiễm trùng huyết); độ nhạy của PCR là 100% và độ đặc hiệu là 95,6% [236]. Tác giả cũng nhấn mạnh việc sử dụng kháng sinh ở các bà mẹ trong giai đoạn tiền sản cũng làm giảm độ nhạy của xét nghiệm [236]. Cây máu là phương pháp đáng tin cậy nhất để chẩn đoán nhiễm trùng huyết ở trẻ sơ sinh.

Phản ứng chuỗi polymerase rất hữu ích và vượt trội so với nuôi cấy máu để chẩn đoán sớm nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh.

Trong phân loại phân tử, có thể nghiên cứu cả DNA và RNA, các kỹ thuật chính đã được sử dụng trong hệ thống bao gồm xây dựng bản đồ giới hạn và phân tích RAPD, RFLP, lai DNA-DNA, lai DNA-RNA và giải trình tự bộ gene. Kỹ thuật RFLP được coi là phương pháp nhạy cảm nhất để xác định chủng và một số sinh vật đã được nghiên cứu rộng rãi bằng cách sử dụng kỹ thuật này [36]. Nghiên cứu sử dụng RFLP để ứng dụng phát hiện sớm nhiễm trùng sơ sinh đã được phát triển. Các tác nhân vi khuẩn xác định được bao gồm *Streptococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. và *Pseudomonas* spp. Khi so sánh kết quả RFLP-PCR với nuôi cấy có độ nhạy 82,35% [90]. Độ đặc hiệu của PCR là 57,1% với giá trị dự đoán dương tính (PPV) là 50,9% và giá trị dự đoán âm tính (NPV) là 85,71% [90]. Điểm đáng lưu ý là các mẫu nuôi cấy âm tính trong nuôi cấy có kết quả dương tính với PCR do các mẫu này của người bệnh đã điều trị kháng sinh.

Hiện nay, các kỹ thuật mới dựa trên nguyên lý PCR cơ bản được phát triển mạnh trong việc chẩn đoán bệnh nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy, trong đó có phương pháp PCR đa môi (multiplex PCR). Multiplex PCR là một phương pháp sinh học phân tử phổ biến nhằm khuếch đại nhiều trình tự DNA chỉ trong một phản ứng PCR. Như một phương pháp cải tiến của phản ứng PCR thông thường, phương pháp này giúp rút ngắn thời gian thực hiện mà lại không ảnh hưởng tới kết quả thí nghiệm.

Phương pháp PCR đa môi được sử dụng rộng rãi tại nhiều nơi trên thế giới để xác định nhiễm trùng giai đoạn sớm (EOS). Trong nghiên cứu tại Nhật Bản, nhóm nghiên cứu so sánh phương pháp PCR đa môi và nuôi cấy truyền thống trong việc phát hiện 8 vi sinh vật gây bệnh phổ biến ở trẻ sơ sinh Group B *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Ureaplasma urealyticum*, herpes simplex

virus, Cytomegalovirus, and *Candida albicans*. Kết quả cho thấy 8 tác nhân có thể phát hiện nhanh bằng phương pháp PCR đa môi sau 3,5 - 4,5 giờ [54]. Điều này giúp cho các bác sĩ có phác đồ điều trị chính xác cho người bệnh. Điểm hạn chế trong phương pháp này khi so sánh với phương pháp nuôi cấy là độ nhạy thấp hơn, nguyên nhân có thể nồng độ vi sinh vật thấp hoặc do lỗi trong quá trình tách chiết vật liệu di truyền từ mẫu máu. Để cải thiện tính nhạy trong chẩn đoán phân tử, hiện nay các nhà khoa học đã sử dụng real-time PCR trong nghiên cứu, với độ nhạy gần tương đương với phương pháp nuôi cấy [78].

Ngoài ra, phương pháp qPCR (quantitative PCR) hay PCR định lượng cũng được ứng dụng rất nhiều trong nghiên cứu chẩn đoán bệnh và được kết hợp cùng các phương pháp giải trình tự thế hệ mới để xác định chính xác vi sinh vật gây bệnh nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy [83].

1.4.1.2. Phương pháp real-time PCR

Được phát triển và cải tiến dựa trên phương pháp PCR, kỹ thuật real-time PCR là kỹ thuật mà kết quả khuếch đại DNA đích sẽ được hiển thị sau mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR. Kết quả khuếch đại sẽ thu nhận thông qua các tín hiệu huỳnh quang được giải phóng sau mỗi chu kỳ nhiệt mà máy thu nhận được. Và các tín hiệu được phát hiện và ghi nhận lại dưới dạng đồ thị, thông qua đồ thị tín hiệu mà có thể đánh giá cung như tính toán được sản phẩm khuếch đại DNA đích có mặt ở mỗi chu kỳ [29].

Để khắc phục nhược điểm của phương pháp cấy máu thông thường đồng thời đáp ứng nhu cầu điều trị của bệnh nhân, các nhà khoa học trên thế giới đã nghiên cứu ứng dụng phương pháp real-time PCR đa môi (SeptiFast) để chẩn đoán nhiễm các tác nhân gây nhiễm trùng huyết [70]. Kỹ thuật real-time PCR có độ nhạy cao hơn và thời gian cho kết quả ngắn hơn, đồng thời nó còn có khả năng phát hiện được cùng một lúc nhiều loại tác nhân gây bệnh so với phương pháp cấy máu thông thường. Sử dụng kỹ thuật real-time PCR được xem là phương pháp ưu việt vì có thể chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh mà phương pháp

cấy máu cho kết quả âm tính do người bệnh đã sử dụng kháng sinh trước khi cấy máu.

Phương pháp real-time PCR đã được ứng dụng trong rất nhiều nghiên cứu về bệnh truyền nhiễm ở trẻ sơ sinh. Đặc biệt phương pháp SeptiFast được đưa vào trong các xét nghiệm chẩn đoán bệnh tại các bệnh viện và các trung tâm cấp cứu sơ sinh với mục tiêu xác định căn nguyên nhiễm trùng ở trẻ. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Shy-Shin Chang và cộng sự, SeptiFast có độ đặc hiệu cao với độ nhạy thấp và thay đổi [45]. Khi có kết quả SeptiFast dương tính ở bệnh nhân nghi ngờ nhiễm trùng do vi khuẩn hoặc nấm, bác sĩ lâm sàng có thể chẩn đoán nhiễm trùng hoặc nấm và bắt đầu điều trị kháng sinh thích hợp, đồng thời bỏ qua xét nghiệm chẩn đoán bổ sung không cần thiết. Tuy nhiên, kết quả SeptiFast âm tính có khả năng âm tính giả và cần được xác nhận bằng các xét nghiệm chẩn đoán lâm sàng hoặc xét nghiệm khác nếu kết quả có khả năng ảnh hưởng đến việc điều trị bệnh nhân [45]. Trong một nghiên cứu khác về ứng dụng của real-time PCR đa môi cho thấy độ nhạy của kỹ thuật này 77%, độ đặc hiệu 81%, giá trị dự đoán dương tính là 87% và giá trị dự đoán âm tính là 68% so với nuôi cấy máu [227].

Tại Việt Nam, qua nghiên cứu về ứng dụng phương pháp real-time PCR đa môi trong chẩn đoán các căn nguyên gây nhiễm trùng sơ sinh ở trẻ em cho thấy tỷ lệ phát hiện là 43,3% trong khi phát hiện bằng phương pháp cấy máu truyền thống chỉ đạt được 3,3% [24]. Điều này có thể do ảnh hưởng của việc sử dụng kháng sinh đại trà trước khi người bệnh được đến bệnh viện điều trị. Việc sử dụng kháng sinh trước khi vào viện sẽ ảnh hưởng rất nhiều tới kết quả nuôi cấy gây ức chế chính vì vậy hầu hết các kết quả cấy máu đều cho kết quả âm tính và không phát hiện được căn nguyên gây nhiễm trùng huyết. Việc ứng dụng phương pháp real-time PCR đa môi lần đầu tiên được sử dụng tại Việt Nam nhằm xác định các căn nguyên gây nhiễm trùng huyết đem lại hiệu quả điều trị cho người bệnh. Sự so sánh và đánh giá ban đầu về độ nhạy và khả năng chẩn đoán cũng như thời gian cho kết quả của kỹ thuật real-time PCR so

với phương pháp cấy máu đã được công bố trong nhiều nghiên cứu gần đây. Theo một nghiên cứu của Lehmann năm 2009, tỷ lệ về độ đặc hiệu của kỹ thuật real-time PCR so sánh với phương pháp cấy máu thông thường trên 18 bệnh nhân nghi ngờ nhiễm trùng cho thấy tỷ lệ dương tính của PCR là 0,81 và của cấy máu là 0,64 [169]. Ngoài ra PCR còn phát hiện được 24 trường hợp dương tính mà cấy máu đã cho kết quả âm tính, nhờ đó nghiên cứu này đã kết luận real-time PCR có tiềm năng để thay thế cho phương pháp cấy máu thông thường [98].

Trong thập kỷ qua, các nhà nghiên cứu trong một số nghiên cứu đã báo cáo việc sử dụng real-time PCR để chẩn đoán nhiễm trùng huyết sơ sinh và phân tích tổng hợp gần đây chỉ ra rằng PCR có thể là một công cụ có giá trị trong “kho vũ khí” chẩn đoán [44, 64, 79, 82, 106]. Nhóm nghiên cứu Jordan và cộng sự đã tiến hành một số nghiên cứu sử dụng PCR gene RNA ribosome 16S phạm vi rộng để chẩn đoán nhanh nhiễm trùng sơ sinh có nguy cơ thấp [63, 65]. Trong một nghiên cứu khác đã sử dụng thành công PCR gram đặc hiệu để phân biệt giữa nhiễm trùng huyết gram dương và gram âm để dự đoán quá trình nhiễm trùng huyết gram âm nghiêm trọng hơn [44]. Mặc dù các kết quả xét nghiệm PCR này rất hứa hẹn, việc áp dụng rộng rãi vẫn chưa được tiến hành, bởi vì các xét nghiệm này đòi hỏi các bước bổ sung để xác định mầm bệnh ở cấp độ loài, tốn kém, tốn nhiều công sức và kéo dài. Multiplex real-time PCR có thể khắc phục vấn đề này, nhưng chỉ được sử dụng trong chẩn đoán nhiễm trùng khởi phát muộn với các nghiên cứu nhỏ lẻ [66]. Một ưu điểm khác của real-time PCR là cho phép đo định lượng vì vậy có thể xác định tải lượng DNA của vi khuẩn (bacteria DNA load - BDL) [100]. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy mối quan hệ giữa BDL được đo trong quá trình nhiễm trùng và mức độ nghiêm trọng của bệnh [72]. Điều này cho thấy, tiềm năng của việc sử dụng real-time PCR trong chẩn đoán trẻ sơ sinh nhiễm trùng và não úng thủy là rất lớn, cần được phát triển song song cùng các kỹ thuật sinh học phân tử khác.

1.4.1.3. Phương pháp PCR 16S rRNA của vi khuẩn

Phương pháp PCR sử dụng cho khuếch đại vùng gene 16S rRNA của vi khuẩn được áp dụng rất nhiều trong nghiên cứu về sự biến đổi trong hệ gene của vi khuẩn. 16S rRNA là gene mã hoá vùng gene của Ribosome trong đó Ribosome được cấu thành từ hai tiểu đơn vị: Đơn vị nhỏ hơn là 30S và đơn vị lớn là 50S [202]. Mỗi tiểu đơn vị có một hoặc nhiều hơn một phân tử RNA ribosome (rRNA) và protein ribosome. Gene 16S rRNA mã hoá cho tiểu đơn vị 30S [202].

Các đặc tính của 16S rRNA: 16S RNA là một RNA ribosome cần thiết cho quá trình tổng hợp tất cả các protein nhân sơ và có các đặc điểm sau:

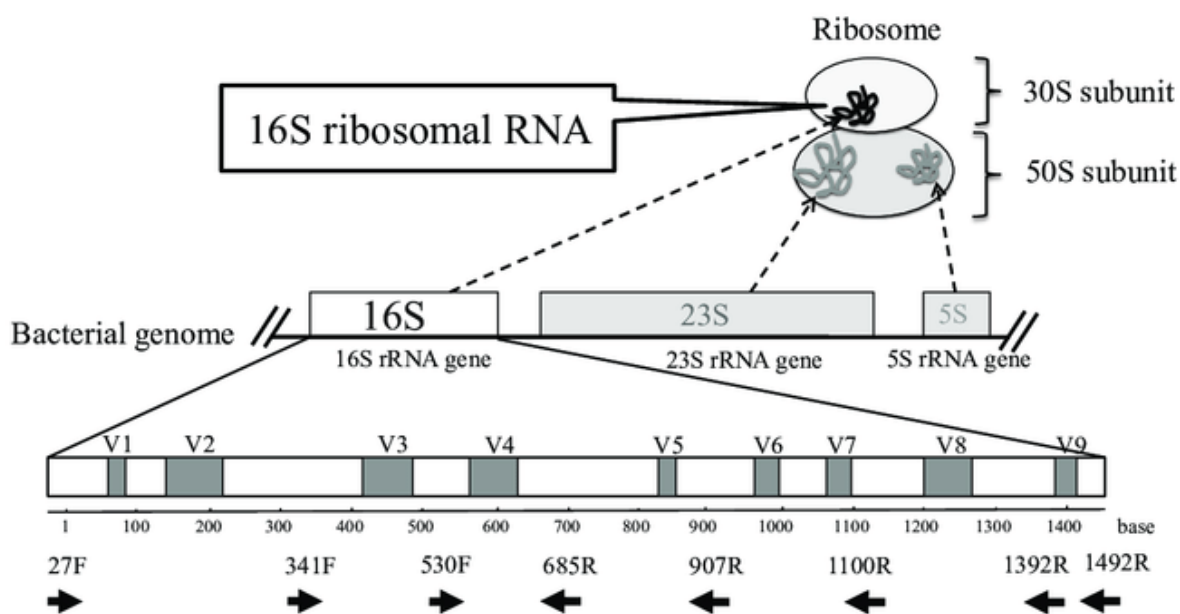
Nhiều bản sao: Mỗi vi khuẩn chứa 5 ~ 10 bản sao 16S rRNA, làm cho độ nhạy phát hiện cao.

Đa thông tin: Cấu trúc bên trong của gene 16S rRNA bao gồm các vùng khác nhau và các vùng được bảo tồn. Khu vực được bảo tồn chia sẻ bởi tất cả các vi khuẩn và các vùng thay đổi có mức độ khác biệt khác nhau giữa các vi khuẩn khác nhau, với tính đặc hiệu của chi hoặc loài, và các khu vực thay đổi và các khu vực bảo tồn được xen kẽ. Do đó, các môi phổ rộng của các vi khuẩn khác nhau có thể được thiết kế theo khu vực bảo tồn và các môi hoặc đầu dò cụ thể của vi khuẩn cụ thể có thể được thiết kế theo khu vực thay đổi. Sự khác biệt giữa các thông tin chứa trong các vùng biến đổi của 16S rRNA làm cho việc phát hiện trở nên cụ thể.

Chiều dài vừa phải: Độ dài của gene mã hóa 16S rRNA là khoảng 1500bp, chứa khoảng 50 vùng chức năng.

Các chức năng của 16S rRNA [43, 202]: 16S rRNA có một số chức năng:
- Sự cố định của protein ribosome đóng vai trò như giàn giáo. Đầu 3' chứa một chuỗi DNA ngược được sử dụng để liên kết với bộ mã phiên mã mở đầu AUG của mRNA. Sự kết hợp của 3's 16S rRNA với protein S1 và S21 được tìm thấy

có liên quan đến việc bắt đầu tổng hợp protein. Nó tương tác với 23S để giúp tích hợp hai đơn vị ribosome 50S và 30S.



Hình 1.4. Cấu trúc hệ gene ribosome của vi khuẩn và vị trí của 16S rRNA [210]

Với sự xuất hiện của công nghệ PCR và sự cải tiến liên tục của công nghệ nghiên cứu axit nucleic, công nghệ phát hiện gene 16S rRNA đã trở thành một công cụ mạnh mẽ để phát hiện và xác định mầm bệnh. Với sự cải tiến liên tục của cơ sở dữ liệu, công nghệ có thể được áp dụng để phân loại, xác định và phát hiện mầm bệnh một cách nhanh chóng và chính xác. Công nghệ này có ba bước chính: thứ nhất, thu thập DNA gene, thứ hai là thu nhận đoạn gene 16S rRNA và cuối cùng là phân tích trình tự gene 16S rRNA. Phân tích trình tự 16S rRNA: Nguyên tắc cơ bản của kỹ thuật phân tích trình tự 16S rRNA là thu được thông tin trình tự 16S rRNA từ gene 16S rRNA trong mẫu vi sinh vật bằng cách nhân bản, giải trình tự hoặc cắt enzyme và lai đầu dò, sau đó so sánh với dữ liệu trình tự hoặc dữ liệu khác trong cơ sở dữ liệu 16S rRNA để xác định vị trí của nó trong cây tiến hóa, do đó xác định các mẫu có thể trong các loài vi khuẩn tồn tại.

Bảng 1.2. Các cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR 16S rRNA [56, 134]

Primer name	Sequence (5'–3')
8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
U1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
928F	TAA AAC TYA AAK GAA TTG ACG GG
336R	ACT GCT GCS YCC CGT AGG AGT CT
1100F	YAA CGA GCG CAA CCC
1100R	GGG TTG CGC TCG TTG
337F	GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG
907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT
785F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA
806R	GGA CTA CVS GGG TAT CTA AT
533F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A
518R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G
1492R	CGG TTA CCT T

Gene 16S rRNA là công cụ phổ biến để xác định vi khuẩn vì các lý do như sau: độ ngắn vừa phải (1,500bp), gene có 10 vùng phổ biến xuất hiện ở phần lớn các vi khuẩn và được phân tách thành 9 vùng (V1-V9) [210]. Trong đó các vùng bảo tồn rất hữu ích trong xác định các phân loại cao hơn, trong khi các vùng biến đổi có thể giúp xác định chi hoặc loài. Phân tích so sánh các cộng đồng vi khuẩn từ các vùng sinh thái riêng biệt ở hồ Baikal được phát hiện bằng phân tích siêu dữ liệu sử dụng các đoạn V2-V3 và V3-V4 của gene rRNA16S

[129]. DNA tổng số lấy từ các mẫu sinh học, được khuếch đại độc lập bằng cách sử dụng các cặp mồi được thiết kế cho các đoạn V2-V3 và V3-V4 và được giải trình tự, sau đó ước tính thành phần cộng đồng và đa dạng vi khuẩn bằng phương pháp tin sinh học [129]. Kết quả của nghiên cứu cho thấy rằng ước tính cộng đồng vi khuẩn đa dạng phân loại bằng cách sử dụng 16S rRNA, trong đó đoạn V2-V3 có độ phân giải cao nhất cho các phân loại bậc thấp (loài và chi). PCR của gene ribosome 16S rRNA của vi khuẩn làm phân tử đích có thể đánh giá sớm sự tồn tại của nhiễm vi khuẩn và xác định mầm bệnh bằng cách phân tích thêm các sản phẩm được khuếch đại và bù đắp cho những thiếu sót trên. Đây là một phạm vi quan trọng trong chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm.

Phương pháp PCR 16S rRNA được áp dụng trong chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh trong những năm gần đây. Một nhóm nhà khoa học đã thực hiện thống kê các kết quả nghiên cứu sử dụng phương pháp PCR 16S rRNA trong chẩn đoán nhiễm trùng đã cho kết quả như sau: Trong 19 báo cáo được đưa vào phân tích, độ nhạy của phương pháp này 0,98 (95% CI: 0,85-1), độ đặc hiệu 0,94 (95% CI: 0,87-0,97), tỷ lệ khả năng dương tính là 16,0 (95% CI: 7,6-33,9), tỷ lệ khả năng âm tính là 0,02 (95% CI: 0,00-0,18) và tỷ lệ chênh lệch chẩn đoán là 674 (95%CI : 0.85-1.0) [230]. Phương pháp này còn được sử dụng trong xét nghiệm nhiễm trùng khi đặt ống dẫn lưu ở bệnh nhân não úng thủy. Trong nghiên cứu của Tamara và cộng sự, nhóm phát triển xét nghiệm PCR 16S rRNA định lượng và phát hiện tải lượng vi khuẩn trong phạm vi từ $2,5 \times 10^9$ xuống còn $2,5 \times 10^4$ bản sao 16S/mL CSF trong điều kiện thí nghiệm đối với nhiều vi khuẩn Gram dương và Gram âm [95]. Tuy nhiên, khi áp dụng cho các mẫu dịch não tủy được lưu trữ từ 25 đợt nhiễm ống dẫn lưu não thất, mối tương quan giữa nuôi cấy vi khuẩn dương tính và nồng độ 16S rRNA chỉ được nhìn thấy trong một nửa số ca nhiễm trùng. Tải lượng vi khuẩn được đo bằng PCR 16S rRNA không cung cấp đủ thông tin ngoài nuôi cấy vi khuẩn để thông báo điều trị nhiễm trùng shunt dịch não

tủy [95]. Nghiên cứu thí điểm này đã thực hiện để kiểm tra việc áp dụng định lượng phân tử tác nhân gây bệnh trong dịch não tủy của bệnh nhân đang điều trị nhiễm trùng ống dẫn lưu. Điều này cho thấy tính ứng dụng của phương pháp này trong chẩn đoán và điều trị là rất hiệu quả.

1.4.2. Phương pháp Metagenomics và giải trình tự gene thế hệ mới (NGS – whole genome sequencing)

Metagenomics là nghiên cứu về metagenomes, nhằm thu vật liệu di truyền trực tiếp từ các mẫu trong môi trường [158]. Nếu như di truyền học và vi sinh vật học truyền thống giải trình tự bộ gene (genomic sequencing) của vi sinh vật dựa trên mẫu là các mẫu dòng đã nuôi cấy, thì ngay từ những nghiên cứu đầu tiên, di truyền học môi trường đã nhân dòng các đoạn trình tự gene đặc hiệu (thường là gene 16S rRNA cho vi khuẩn và 23S cho vi rút) để xây dựng dữ liệu về đa dạng sinh học của quần thể vi sinh vật [235]. Hiện nay, nghiên cứu metagenomics được sử dụng để phân tích trình tự mẫu gene của các vi sinh vật trong quần thể [49]. Từ đó, các chuỗi này sẽ được phân tích, so sánh và xây dựng nên quần thể vi sinh vật có trong mẫu bệnh phẩm.

Giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS) đại diện cho một số công nghệ giải trình tự hiện tại sau giải trình tự thế hệ đầu tiên, được gọi là Sanger. Trong 10 năm qua, các nền tảng NGS mới đã được thực hiện với các tính năng như khả năng giải trình tự nhanh, thông lượng cao và chi phí thấp. NGS khác nhau bao gồm các nền tảng 454 GS FLX của Roche, HiSeq/MiSeq của Illumina hay Ion PGM của Ion Torrent, với khả năng cho ra trình tự hàng triệu đoạn DNA trong thời gian ngắn. Nguyên lý chung của giải trình tự thế hệ mới Illumina là dựa trên nhận diện huỳnh quang của các nucleotide (dNTPs). Khi các nucleotide được bổ sung, các tín hiệu huỳnh quang được phát ra để xác định từng loại. Quá trình này theo từng nucleotide nên giảm thiểu sai lầm khi tổng hợp và thực hiện đồng thời nhiều chuỗi cùng lúc. Vì vậy, thay vì giải trình tự một đoạn DNA duy nhất thì phương pháp này có thể giải trình tự hàng triệu đoạn với thời

gian rút ngắn hơn so với các phương pháp cũ. Sau khi giải trình tự, phân tích metagenomics được tiến hành để xác định và mô tả đặc điểm bộ gene của vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng và vi rút trực tiếp từ các mẫu lâm sàng mà không cần dự đoán trước về mầm bệnh cụ thể. Khả năng phát hiện tất cả các mầm bệnh tiềm ẩn trong một mẫu làm cho giải trình tự metagenomic thế hệ tiếp theo trở thành một công cụ mạnh mẽ trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm [58].

Các bước tiến hành với phân tích metagenomics sử dụng giải trình tự gene thế hệ mới trong phát hiện tác nhân gây bệnh [184]: 1) Giải trình tự thế hệ tiếp theo metagenomic (mNGS) có thể áp dụng với nhiều loại bệnh phẩm như dịch não tủy (CSF), máu hoặc mô. Điều kiện quan trọng khi lấy mẫu là phải lưu trữ đông lạnh ngay để tránh làm DNA và RNA tan rã. Các mẫu cần được xử lý một cách vô trùng để tránh ô nhiễm từ môi trường bên ngoài. 2) RNA và DNA được tách chiết và khuếch đại ngẫu nhiên (sau khi phiên mã ngược RNA) để tạo ra các phân tử cDNA để giải trình tự. 3) Hàng triệu trình tự được tạo ra và được phân tích bằng tin sinh học. Các trình tự liên quan đến bộ gene người, thường bao gồm ~ 97-98% dữ liệu mNGS trong mẫu sẽ bị xóa. Qua trình chọn lọc tiến hành bổ sung, các chuỗi còn lại được tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu gene để xác định được vi sinh vật tương thích nhất. 4) Assembly (ghép các đoạn trình tự): Đây là bước rất phức tạp. Với sự phát triển của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (với kết quả dưới dạng các short-read) thì việc bị lỗi trong xử lý dữ liệu là điều rất dễ mắc phải. Như vậy việc ghép nối các đoạn trình tự của metagenomic thành các hệ gene sẽ rất rắc rối và khó tin cậy, đặc biệt khi lắp ghép các đoạn DNA lặp hay khi ghép các đoạn trình tự của các loài khác nhau thành một contig. Với bước này, thường phải sử dụng các công cụ tin sinh học để phân tích và ghép đoạn. 5) Dự đoán gene: Dự đoán gene của phân tích metagenomic sử dụng tiếp cận trong việc chú thích (annotation) vùng mã hóa trong các contig đã được ghép nối trước đó. Hướng tiếp cận này để phát

hiện gene dựa trên sự tương đồng với các trình tự trong ngân hàng gene, thông thường bằng cách tìm kiếm BLAST. 6) Đa dạng loài: Để xác định cấu trúc và chức năng của quần thể vi sinh vật trong metagenomics, các đoạn trình tự phải được cố định hóa. Việc cố định này được hiểu là quá trình gắn một đoạn trình tự với một sinh vật cụ thể. Cố định hóa dựa trên sự tương đồng bao gồm các phương pháp như BLAST, được sử dụng để tìm kiếm marker hoặc các đoạn trình tự tương tự trong những dữ liệu có sẵn đã công bố. Sử dụng thuật toán để xác định sự đa dạng của quần thể, đánh giá đa dạng di truyền trong một quần thể sinh vật với loại dữ liệu là phân loại các đoạn trình tự thành những đơn vị phân loài (Operational Taxonomic Units - OTUs) dựa trên các đoạn trình tự giống nhau [152]. Các OTU sau đó có thể được sử dụng cho việc ước lượng loài, đa dạng sinh học, thành phần, mức độ phong phú. 7) Báo cáo về danh sách RNA hoặc DNA của vi rút hay ký sinh trùng hoặc nấm và vi khuẩn.

Với việc ứng dụng công nghệ giải trình tự gene thế hệ mới và phương pháp phân tích metagenomics, việc định danh các vi khuẩn trong quần thể được tiến hành nhanh hơn, bên cạnh đó, còn có thể phát hiện được các mối liên quan giữa các vi khuẩn trong quần thể. Bên cạnh đó, các công nghệ Omics cung cấp dữ liệu về biểu hiện gene trên toàn bộ bộ gene, dịch mã protein và sản xuất chất chuyển hóa được điều chỉnh khác biệt trong nhiễm trùng huyết ở trẻ sơ sinh [31]. Proteomics đo các thành phần protein được giải phóng sau khi nhiễm trùng hoặc viêm. Proteomics máu cuống rốn và nước ối đã cung cấp thông tin liên quan đến phản ứng của thai nhi đối với các viêm nhiễm trong ối và đã dự đoán thành công nhiễm trùng sơ sinh giai đoạn sớm (EOS) với độ chính xác >92% [38]. Proteomics bao gồm bạch cầu trung tính defensin 1–2, cathelicidin, S100A12, S100A8, pro-apolipoprotein C2, apolipoprotein A-E-H, β -2 microglobulin, haptoglobin, desarginin từ nước ối, máu cuống rốn và huyết tương được tìm thấy có giá trị trong chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh sớm và muộn (EOS và LOS) [39].

Hiện nay có rất nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp metagenomics - giải trình tự gene thể hệ mới trong việc chẩn đoán các bệnh nhiễm trùng sơ sinh như viêm não, viêm ruột. Báo cáo thống kê gần đây cho thấy các nghiên cứu sử dụng giải trình tự gene thể hệ mới chủ yếu tập trung vào đánh giá khả năng phát hiện tác nhân gây bệnh bằng phương pháp này từ các mẫu đã được xét nghiệm là âm tính [28]. Điều này cho thấy việc ứng dụng của giải trình tự gene có thể giúp phát hiện các trường hợp bị bỏ sót, để có hướng điều trị kịp thời cho bệnh nhân.

Phương pháp giải trình tự 16S rRNA

Phương pháp giải trình tự 16S rRNA phân tích trên vùng gene của vi khuẩn với trình tự gene khoảng 1.550 bp [209]. Tính đa hình và đặc hiệu của 16S rRNA có thể cung cấp thông tin về thành phần loài vi sinh vật và có giá trị thống kê. Giải trình tự gene 16S rRNA được ứng dụng phổ biến hiện nay và được xác định cho số lượng lớn các chủng vi sinh vật trên ngân hàng Genbank. Bên cạnh đó, giải trình tự 16S rRNA giúp đo lường được mối quan hệ giữa các vi khuẩn giúp phân loại được ở nhiều cấp độ như chi, loài [208].

Phương pháp phân tích đoạn gene 16S rRNA chủ yếu bao gồm 3 loại sau [48]: (1) Giải trình tự các sản phẩm PCR trên vectơ plasmid và so sánh với trình tự trong cơ sở dữ liệu 16S rRNA để xác định vị trí của nó trong cây tiến hóa và xác định các loài vi sinh vật có thể có trong mẫu. Thông tin thu được bằng phương pháp này là toàn diện nhất, nhưng trong mẫu Trình tự phức tạp đòi hỏi phải giải trình tự rộng rãi. (2) Lai các sản phẩm PCR với các đầu dò đặc hiệu 16S rRNA để thu được thông tin thành phần vi sinh vật. Ngoài ra, đầu dò có thể được phát hiện trực tiếp bằng cách lai tại chỗ với mẫu. Lai tạo tại chỗ không chỉ có thể xác định các đặc điểm hình thái và sự phong phú của vi khuẩn, mà còn phân tích sự phân bố không gian của chúng. (3) Phân tích đa hình chiều dài đoạn hạn chế của các sản phẩm PCR đã được thực hiện. Loại gene vi sinh vật được xác định bằng cách quan sát bản đồ điện di cắt enzyme và phân tích, sau

đó so sánh với dữ liệu trong thư viện ribosome và mối quan hệ giữa thành phần vi sinh vật của mẫu và loài vi sinh vật khác nhau đã được phân tích. 16S rRNA là gene bảo toàn nhất cho tất cả các vi khuẩn và một số gene bảo toàn nhất trong quá trình tiến hóa. Một số trình tự gene vẫn bảo toàn trong quá trình tiến hóa lâu dài.

Nghiên cứu của nhóm nhà khoa học thực hiện tại Uganda, đã sử dụng các phương pháp sinh học phân tử như phân tích 16S rRNA và phân tích metagenomics để tìm ra tác nhân mới gây nên nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy ở trẻ nhỏ [83]. Phương pháp phối hợp phân tích sẽ mang lại hiệu quả và hướng đi mới trong nghiên cứu vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm. Trong nghiên cứu tại Uganda, nhóm nhà khoa học thuộc trường đại học bang Pennsylvania đã phát hiện tác nhân gây bệnh não úng thủy là vi khuẩn *Paenibacillus thiaminolyticus* thông qua giải trình tự 16S rRNA và kiểm chứng lại bằng qPCR. Ngoài ra, phương pháp này còn giúp nhóm phân tích mối liên quan giữa vi sinh vật ngoài môi trường sống, bệnh viện và với con người. Từ đó, xác định được nguồn lây nhiễm của vi khuẩn gây bệnh cũng như mối liên hệ giữa môi trường sống đến trẻ mắc bệnh.

Mặc dù vậy, phương pháp này cũng có những giới hạn về mặt thông tin của các vi sinh vật gây bệnh có thể chưa đầy đủ, thêm vào đó việc phân tích cần nhiều thời gian và phải được đào tạo bài bản.

Phương pháp giải trình tự RNA (RNA sequencing)

Giải trình tự RNA (RNA-seq) là phương pháp được ứng dụng và phát triển những năm gần đây sử dụng công nghệ giải trình tự sâu - giải trình tự thông lượng cao để lập hồ sơ hệ phiên mã của tế bào [231]. Ngoài việc định lượng biểu hiện của gene, dữ liệu do RNA-seq tạo ra có thể phát hiện các bản phiên mã mới, xác định việc cắt nối thay thế các gene và phát hiện biểu hiện đặc trưng của alen [47]. Giải trình tự RNA (RNA-seq) đã làm rõ thêm các chức năng phức tạp của quá trình phiên mã, bên cạnh phiên mã mRNA (RNA thông

tin) còn có RNA tổng số, tiền mRNA và RNA không mã hoá (miRNA và ncRNA) để ứng dụng trong nghiên cứu các quần thể RNA (RNA population) [178]. Việc lựa chọn phương pháp giải trình tự RNA phụ thuộc vào mục đích và kết quả nghiên cứu. Hiện nay có hai hướng giải trình tự RNA chính đó là giải trình tự đoạn ngắn (short read) sau đó được lắp ráp lại thành các đoạn contig và giải trình tự đoạn dài (long read) với các tập hợp các contigs gắn kết với nhau tạo thành scaffolds [47]. Mặc dù các công nghệ giải trình tự RNA khác nhau nhưng đều dựa trên quy trình giống nhau trong việc tạo ra các sản phẩm và phân tích thư viện giải trình tự. Phương pháp giải trình tự RNA có ưu điểm phát hiện đồng thời được các tác nhân gây bệnh bao gồm vi khuẩn, vi rút, nấm và ký sinh trùng. Do vậy có thể sử dụng phương pháp này để sàng lọc vi sinh vật gây bệnh và tìm ra tác nhân gây bệnh mới. Tuy nhiên, cũng giống như phân tích giải trình tự 16S rRNA, phương pháp này cũng cần sự đầu tư về phân tích, xây dựng công cụ xử lý số liệu và cần các chuyên gia tin sinh học được đào tạo bài bản thực hiện.

Kỹ thuật gene mới

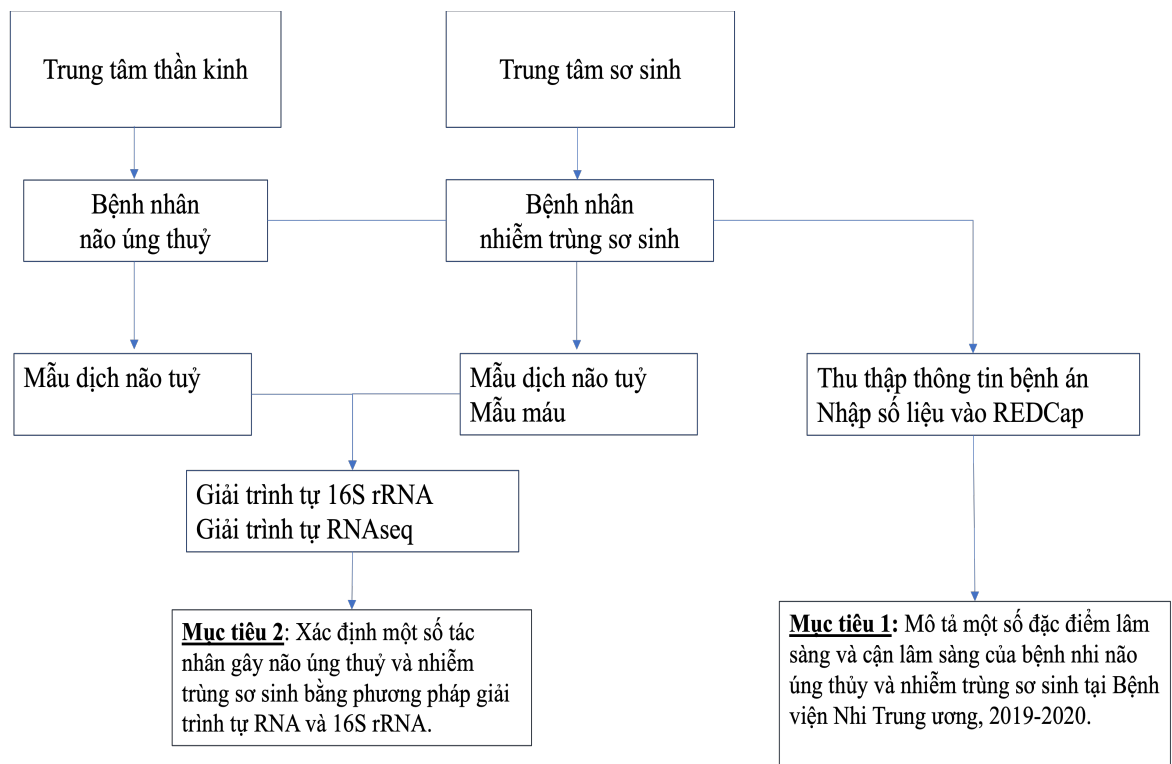
Hiện nay, các nhà khoa học cũng đang tập trung nghiên cứu vào các RNA không mã hoá. Các RNA không mã hóa (phiên mã) bao gồm microRNA (miRNA) và RNA tròn điều khiển các tín hiệu đến tế bào bao gồm tăng sinh, biệt hóa, phát triển, trao đổi chất, apoptosis và sản xuất cytokine tiền viêm [55]. Cả hai biểu hiện tăng (miRNA 15-16a-23b-451) và giảm (miRNA 25-129-132-181a-223) đều được báo cáo, trong khi độ nhạy 80–89% và độ đặc hiệu 79–98% được tìm thấy trong chẩn đoán nhiễm trùng huyết sơ sinh [74]. Exosome và bẫy ngoại bào bạch cầu trung tính được giải phóng trong quá trình viêm có thể là mục tiêu điều trị trong tương lai.

Từ các ưu điểm cũng như các nghiên cứu về giải trình tự 16S rRNA và RNA, chúng tôi đã thực hiện đề tài này với mục tiêu xác định tác nhân gây bệnh ở bệnh nhi nhiễm trùng sơ sinh và não úng thủy.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu thuộc dự án nghiên cứu tiền khả thi về tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh giữa Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Bệnh viện Nhi Trung ương và Trường Đại học bang Pennsylvania. Nghiên cứu thực hiện theo phương pháp mô tả kết hợp phân tích phòng thí nghiệm, thiết kế nghiên cứu theo hai mục tiêu đề ra được mô tả trong hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện tại Bệnh viện Nhi Trung ương, giai đoạn từ tháng 10/2019 đến tháng 12/2020. Mẫu bệnh nhân được thu thập tại Trung tâm sơ sinh và Trung tâm thần kinh của Bệnh viện Nhi, sau đó chuyển về lưu trong

điều kiện thích hợp tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cho đến khi thực hiện nghiên cứu.

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện trên trẻ sơ sinh nghi ngờ mắc não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương, giai đoạn từ tháng 10/2019 đến tháng 12/2020, được lấy mẫu máu, dịch não tủy (DNT) để xác định căn nguyên.

Tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ

2.3.1. Bệnh nhân não úng thủy

a. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Từ 12 tháng tuổi trở xuống có hiệu chỉnh tuổi khi sinh (lấy gốc là 38 tuần tuổi).
- Có cân nặng từ 1000g trở lên.
- Tiêu chuẩn chẩn đoán lâm sàng não úng thủy:
Trẻ nhỏ còn thóp: bất đối xứng đầu-mặt do vòng đầu tăng nhanh, nôn, thóp phồng, dấu hiệu mặt trời lặn
Trẻ lớn: có hội chứng tăng áp lực nội sọ (nôn, phù gai thị)
- Tiêu chuẩn cận lâm sàng:
X-quang sọ: các dấu hiệu dẫn khớp sọ, dấu ấn ngón tay
Cắt lớp vi tính sọ não, cộng hưởng từ sọ não: cả 2 sừng thái dương $\geq 2\text{mm}$ và tỉ số FH/ID $>50\%$ (FH: khoảng cách xa nhất của hai sừng trán; ID: khoảng cách giữa 2 bản trong của sọ ở cùng mức với FH).
- Không có tiền sử mắc não úng thủy sơ sinh và một trong hai nhóm tiêu chuẩn sau:

Nhóm 1: Não úng thủy sau nhiễm trùng

Có tiền sử sốt và/hoặc co giật trong vòng 3 tháng trước khi có các biểu hiện lâm sàng của não úng thủy.

Có kết quả chẩn đoán hình ảnh và nội soi cho thấy các dấu hiệu viêm não thất trước đó như có vách ngăn, túi dịch và xuất hiện chất bẩn trong hệ thống não thất.

Nhóm 2: Não úng thủy không do nhiễm trùng

Dị dạng bẩm sinh hoặc các tổn thương gây tắc mạch như khối u, phình động mạch, dị dạng mạch, u Dandy-Walker hoặc các dị dạng bẩm sinh khác của hệ thần kinh.

Hoặc

Não úng thủy hậu xuất huyết: dịch não tủy có máu, không có nguyên nhân hậu nhiễm trùng hoặc dị dạng bẩm sinh hệ thần kinh.

- Bố/mẹ/người giám hộ trên 18 tuổi đồng ý cho tham gia nghiên cứu.

b. Tiêu chuẩn loại trừ

- Đã có phẫu thuật trước đó trên hệ thần kinh (đặt ống dẫn lưu, phá sán não thất, hoặc phẫu thuật thoát vị màng não tủy)
- Tình trạng bệnh lý tiếp liên da-thần kinh như thoát vị màng não tủy, thoát vị não, dị tật bẩm sinh cột sống, đường rò sau sinh

2.3.2. Bệnh nhân mắc nhiễm trùng sơ sinh

a. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Trẻ sơ sinh dưới 28 ngày tuổi có hiệu chỉnh thời gian sinh (lấy gốc là 38 tuần tuổi)
- Có cân nặng sấp xỉ 1000g trở lên.
- Tiêu chuẩn chẩn đoán lâm sàng nhiễm trùng sơ sinh:
Sốt, lơ mơ, bỏ bú
Hoặc hạ thân nhiệt, lơ mơ, bỏ bú
Hoặc thóp phồng và/hoặc co giật, sốt, bỏ bú
- Tiêu chuẩn cận lâm sàng:
Bạch cầu trung tính tăng hoặc giảm (theo tuổi)

CRP tăng

- Bố/mẹ/người giám hộ trên 18 tuổi đồng ý cho tham gia nghiên cứu.

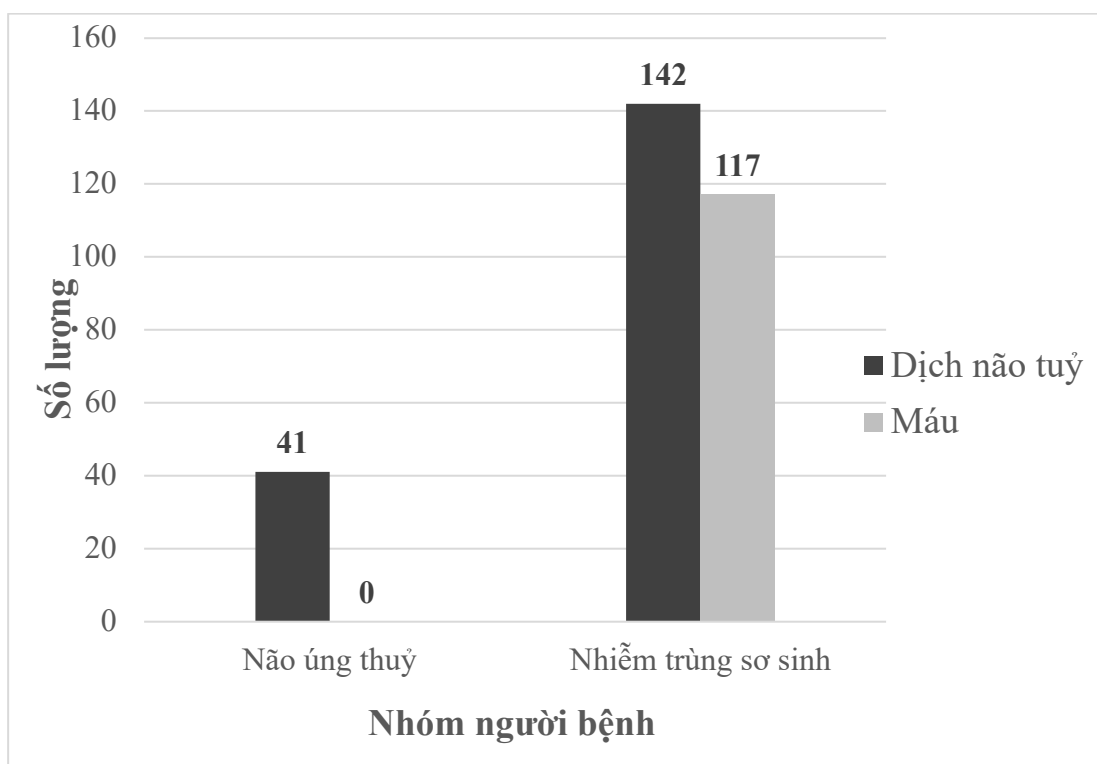
b. Tiêu chuẩn loại trừ

- Tình trạng nhiễm trùng khác ngoài nhiễm trùng sơ sinh đã được xác định (trừ nhiễm trùng đường tiết niệu).
- Dị dạng bẩm sinh đã được xác định.
- Bất thường trên nhiễm sắc thể.
- Lỗ rò trên da hoặc lỗ rò hệ tiêu hóa đã được chẩn đoán.
- Tổn thương khi sinh khác như vết thương hoặc gãy xương.

2.4. Cỡ mẫu và lựa chọn đối tượng nghiên cứu

2.4.1. Cỡ mẫu

Do đây là nghiên cứu tiền khả thi được thực hiện nhằm cung cấp số liệu cho nghiên cứu khác trong tương lai, nên sẽ không áp dụng công thức tính toán cỡ mẫu.



Hình 2.2. Số lượng mẫu

Nghiên cứu này lấy mẫu thuận tiện, thu tuyển tất cả các bệnh nhân đáp ứng theo tiêu chuẩn lựa chọn. Thông tin thu thập được từ nghiên cứu này có thể có thể được sử dụng để xác định thiết kế nghiên cứu chặt chẽ hơn cho các nghiên cứu trong tương lai với số lượng bệnh nhân lớn hơn.

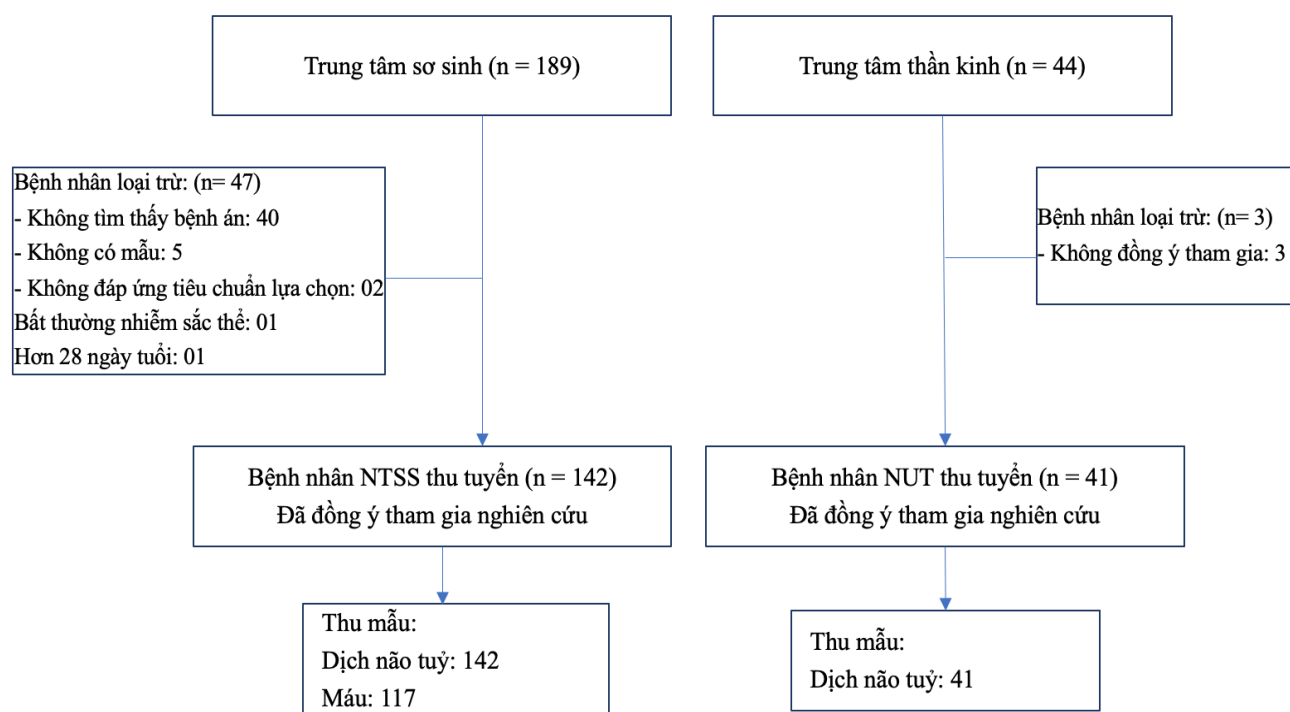
Sau khi thu thập trong giai đoạn từ 2019-2020, tổng số bệnh nhi não úng thủy là 41 trẻ và nhiễm trùng sơ sinh là 142 trẻ. Số mẫu bệnh phẩm máu thu được từ nhiễm trùng sơ sinh là 117 mẫu, nhóm não úng thủy không thu mẫu máu. Số mẫu bệnh phẩm dịch não tủy (CSF) là 183 trong đó 41 mẫu của nhóm não úng thủy và 142 mẫu từ nhóm nhiễm trùng sơ sinh.

2.4.2. Lựa chọn đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu được thu tuyển đồng thời ở hai địa điểm là Khoa Thần kinh và Khoa sơ sinh trong giai đoạn từ cuối 2019 đến cuối 2020.

Đối với bệnh não úng thủy: đối tượng nghiên cứu sẽ được lựa chọn từ các bệnh nhân nhập viện và điều trị não úng thủy tại Bệnh viện Nhi Trung ương (Khoa Thần kinh). Việc lựa chọn bệnh nhân sẽ được thực hiện liên tục từ khi bắt đầu triển khai thu tuyển bệnh nhân cho đến khi hết thời gian thực hiện theo tiêu chuẩn lựa chọn. Trong nghiên cứu này, thời gian lấy mẫu từ cuối 2019 đến cuối 2020, giai đoạn này xảy ra dịch COVID-19 nên số lượng bệnh nhân NUT thu tuyển không đủ như dự kiến ban đầu. Do vậy, chỉ thu được 41 bệnh nhân đạt tiêu chuẩn nghiên cứu.

Đối với bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh: các bệnh nhân sẽ được thu tuyển tại Bệnh viện Nhi Trung ương (Khoa Sơ sinh). Việc lựa chọn bệnh nhân cũng thực hiện tương tự như đối với bệnh não úng thủy.



Hình 2.3. Quy trình thu tuyển bệnh nhân

Quy trình thu tuyển bệnh nhân được mô tả như sau:

Bước 1: Xác định sự phù hợp với các tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ. Các bác sĩ điều trị tại Khoa Thần kinh và Khoa Sơ sinh của bệnh viện sẽ dựa vào tiêu chuẩn lựa chọn để sàng lọc bệnh nhân đang điều trị hoặc bệnh nhân mới được nhập viện. Thu tuyển bệnh nhân đồng thời ở hai khoa cùng thời điểm.

Bước 2: Cung cấp thông tin và ký thỏa thuận tham gia nghiên cứu. Bố/mẹ/người giám hộ trên 18 tuổi của bệnh nhân sẽ được cán bộ nghiên cứu và bác sĩ điều trị cung cấp thông tin về nghiên cứu, mục đích, quy trình thực hiện, nguy cơ và lợi ích của việc tham gia nghiên cứu nhằm tìm nguyên nhân, nâng cao phương thức điều trị và phòng bệnh trong tương lai, để từ đó bố/mẹ/người giám hộ của bệnh nhân có thể quyết định cho bệnh nhân tham gia nghiên cứu hay không. Thu thập thông tin bệnh nhân ngay sau khi có thỏa thuận tham gia nghiên cứu. Số liệu được lấy từ bệnh án và hồ sơ của bệnh nhân, nhập và mã hoá đảm bảo tính bảo mật và đạo đức trong nghiên cứu.

Bước 3: Lấy mẫu. Nghiên cứu sẽ cung cấp các dụng cụ lấy mẫu máu, dịch não tủy, mẫu phân để tiến hành lấy, chia mẫu và bảo quản mẫu ngay sau thời điểm lấy mẫu.

2.4.3. Cách lấy mẫu

2.4.3.1. Bệnh nhân não úng thủy

- Thể tích: 1,0mL dịch não tủy

Trên bệnh nhân mắc não úng thủy, việc lấy mẫu sẽ được thực hiện theo hai trường hợp:

✓ Trường hợp 1: bệnh nhân có chỉ định phẫu thuật, mẫu dịch não tủy sẽ được lấy trong khi thực hiện phẫu thuật để xử trí tình trạng não úng thủy theo chỉ định của bác sĩ điều trị.

✓ Trường hợp 2: bệnh nhân mắc não úng thủy nhưng chưa có chỉ định phẫu thuật, việc chọc dịch não tủy sẽ được thực hiện chủ động theo chỉ định của bác sĩ điều trị.

Mẫu dịch não tủy cần thu được từ lần chọc dịch đầu tiên (chọc dịch não tủy qua đường thóp, chọc dịch não tủy qua đường cột sống, nội soi phá sàn não thất/đốt đám rối màng mạch, đặt ống dẫn lưu...).

Việc chọc dịch não tủy sẽ do cán bộ y tế bệnh viện thực hiện theo quy trình chuẩn của Bệnh viện Nhi Trung ương. Vận chuyển và bảo quản mẫu dịch não tủy từ Bệnh viện Nhi Trung ương tới Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

2.4.3.2. Bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh

Thể tích: 0,5 mL máu; 0,5 mL dịch não tủy.

Mẫu máu và dịch não tủy chỉ được thu thập đồng thời với quy trình lấy mẫu bệnh phẩm thường qui của bệnh viện, theo chỉ định của bác sĩ không được thu thập chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu trong bất cứ trường hợp nào. Mẫu được ưu tiên thu thập trong lần lấy mẫu lần đầu tiên tại bệnh viện, nếu không gây hại cho trẻ.

Đối với mẫu máu: Quy trình lấy mẫu theo thường quy của Bệnh viện.

Đối với mẫu dịch não tủy: Trên bệnh nhân mắc nhiễm trùng sơ sinh, việc chọc dịch não tủy sẽ được thực hiện một cách chủ động tương tự như bệnh nhân mắc não úng thủy chưa có chỉ định phẫu thuật.

Bảng 2.1: Thể tích mẫu máu và dịch não tủy cần lấy, so sánh với lượng máu và dịch não tủy trong cơ thể trẻ

Bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh						
Cân nặng: >1.0 kg						
	Thể tích tổng trong cơ thể		Thể tích lấy cho xét nghiệm theo thường quy của bệnh viện	Thể tích lấy cho nghiên cứu*	Tổng	% so với thể tích tổng trong cơ thể
Mẫu máu (mL)	80		0,5	0,5	1,0	1,25%
	Tổng thể tích DNT nội sọ	Tổng thể tích DNT ở trẻ	Thể tích lấy cho nuôi cấy và nhuộm gram			
Dịch não tủy (mL)	3,26	6,5	0,5	0,5	1,0	15%
Bệnh nhân não úng thủy						
Cân nặng: >1.0 kg						
	Tổng thể tích DNT nội sọ	Tổng thể tích DNT ở trẻ	Thể tích lấy cho nuôi cấy và nhuộm gram			
Dịch não tủy (mL)	>2*3,26	>13	0,5	1,0	1,5	<12%

** 0,5 mL là mức tối thiểu cho xét nghiệm sinh học phân tử. Đối với bệnh nhân cần phải phẫu thuật để xử trí tình trạng não úng thủy, một lượng lớn dịch não tủy bị thoát ra ngoài sẽ được thu thập lại để làm xét nghiệm, trong trường hợp đó thể tích mẫu dịch não tủy có thể lên đến trên 1,0 mL.*

** Trên đây là ước lượng áp dụng cho trẻ có cân nặng 1000gr, trên thực tế với những trẻ có cân nặng lớn hơn thì tỷ lệ mẫu cần lấy so với tổng thể tích có trong cơ thể trẻ sẽ nhỏ hơn so với ước lượng trên.*

** Chúng tôi ước lượng rằng lượng dịch não tủy ở trẻ sơ sinh mắc não úng thủy tối thiểu gấp 2 lần so với trẻ bình thường (trên thực tế thường là gấp trên 10 lần)*

2.5. Thu thập thông tin

Các thông tin sẽ được thu thập bằng bộ câu hỏi/phiếu thu thập thông tin bao gồm:

- Thông tin nhân khẩu học như tuổi của bệnh nhân, giới tính, nơi thường trú, dân tộc, cân nặng khi sinh, cân nặng tại thời điểm nghiên cứu, tiền sử bệnh tật, tiền sử tiêm vắc xin của bà mẹ và của bệnh nhân...
- Thông tin về các biểu hiện lâm sàng của bệnh trước, trong và sau khi nhập viện như ngày khởi phát các triệu chứng của bệnh
- Thông tin về các kết quả cận lâm sàng (chẩn đoán hình ảnh, xét nghiệm vi sinh, công thức máu...).
- Các biến số nghiên cứu trình bày trong bảng Phụ lục 2.

2.6. Kỹ thuật xét nghiệm

Được thực hiện tại phòng xét nghiệm vi sinh của Bệnh viện Nhi Trung ương, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Trường đại học Bang Pennsylvania, Mỹ.

2.6.1. Tại Bệnh viện Nhi Trung ương

Các mẫu bệnh phẩm (máu, dịch não tủy) được chuyển đến phòng xét nghiệm, được chia thành 2 phần. Một phần được tiến hành nuôi cấy, nhuộm gram xác định tác nhân gây bệnh (tuân thủ thường qui xét nghiệm tại bệnh viện). Phần mẫu còn lại được lưu trữ trong tủ lạnh âm sâu và chuyển về Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

Kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn

- Cấy dịch não tủy:

Chỉ định: khi bệnh nhi có biểu hiện nhiễm trùng thần kinh trung ương nghi do vi khuẩn.

Qui trình thực hiện theo thường quy của bệnh viện: Ly tâm bệnh phẩm, lấy cặn nhuộm soi Gram và nuôi cấy. Duy trì nuôi cấy 3 đến 5 ngày mà vẫn âm tính thì sẽ trả lời âm tính.

- Cấy máu:

Chỉ định: khi bệnh nhi có biểu hiện nhiễm trùng toàn thân.

Qui trình thực hiện theo thường quy của bệnh viện: Đưa chai chứa bệnh phẩm vào Hệ thống máy cấy tự động. Kết quả của quá trình này nếu có vi khuẩn mọc trong vòng 5 ngày thì máy sẽ tự động báo và sẽ lấy vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường Thạch máu, đưa vào tủ ấm 37°C, theo dõi trong 24 giờ. Chuyển vào máy định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ tự động. Máy sẽ cho định danh vi khuẩn và kháng sinh đồ phù hợp vi khuẩn. Nếu kết quả ở máy cấy tự động chưa mọc vi khuẩn thì tiếp tục duy trì nuôi cấy đến 5 ngày mà vẫn âm tính thì sẽ trả lời âm tính.

Kỹ thuật miễn dịch

- Thực hiện ELISA CMV (IgM, IgG), ELISA EBV (IgM, IgG), ELISA HSV (IgM, IgG), ELISA VZV (IgM, IgG), ELISA Measle Virus (IgM, IgG),

ELISA Mumps Virus (IgM, IgG), ELISA Rubella (IgM, IgG) theo kit của Diapro (Ý) và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Test nhanh RSV: hoá chất SD RSV, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.6.2. Tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

Kỹ thuật định danh tác nhân bằng vật liệu di truyền sẽ được thực hiện tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương với sự hỗ trợ và chuyển giao kỹ thuật từ Đại học Bang Pennsylvania, Hoa Kỳ như sau:

- Các mẫu dịch não tủy, mẫu máu được tiến hành tách DNA/RNA bằng sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết ZymoBiomics DNA MiniPrep (Zymo, Mỹ) sử dụng hạt từ tính (bead) và proteinase K theo thường qui hướng dẫn sử dụng của bộ sinh phẩm, và chia thành 2 tuýp 0,5ml, cất ở tủ âm sâu cho đến khi thực hiện phân tích giải trình tự gene.
- Một phần mẫu được chia sẻ và sẽ gửi tới phòng thí nghiệm của Đại học Bang Pennsylvania để thực hiện các xét nghiệm chuyên sâu hơn. Các mẫu bệnh phẩm sẽ được mã hoá và phân tích độc lập với các thông tin nhân khẩu học của bệnh nhân nhằm đảm bảo tính khách quan khi phân tích.

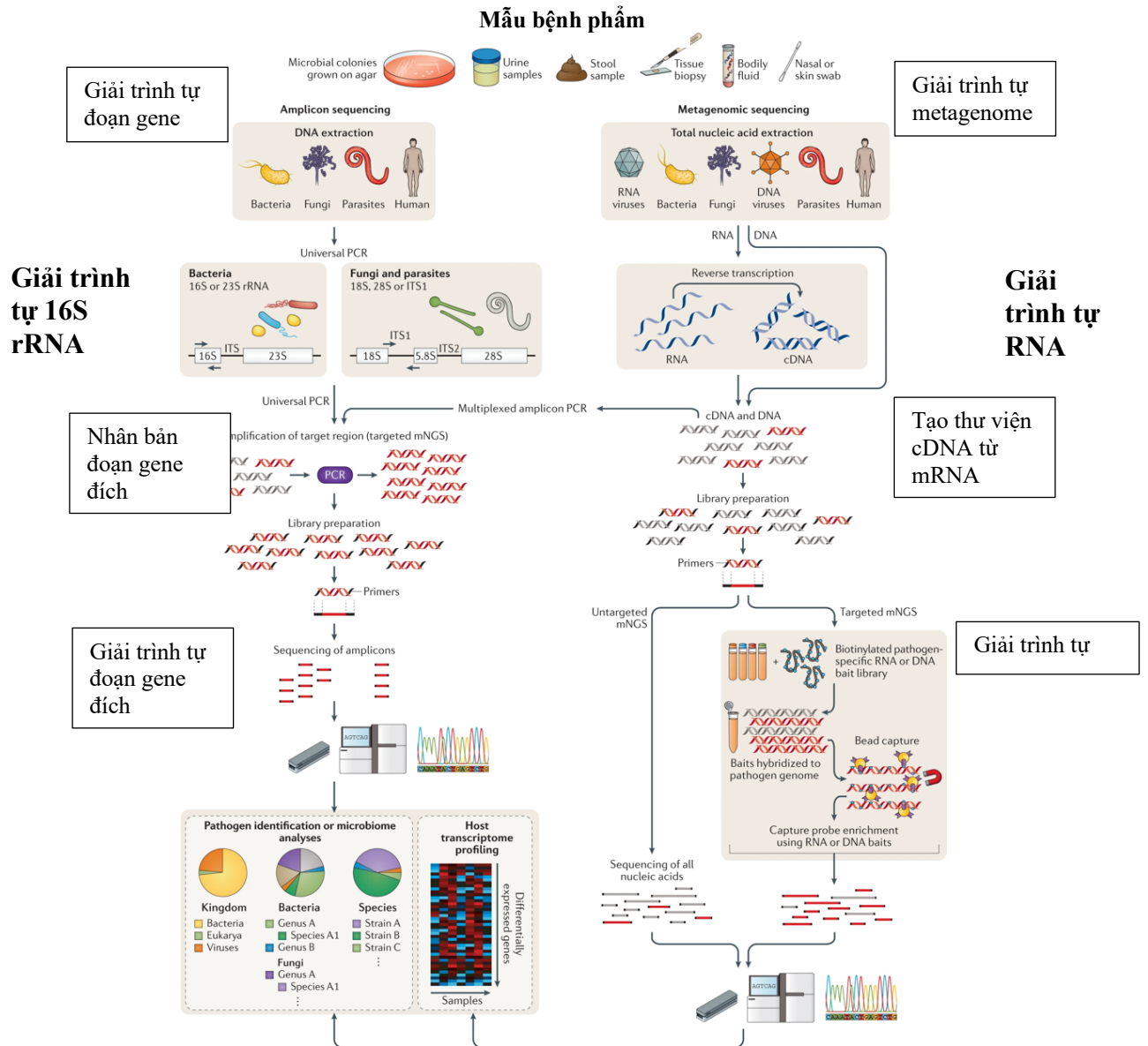
2.6.3. Tại trường đại học bang Pennsylvania

2.6.3.1. Kỹ thuật giải trình tự 16S rRNA

Các mẫu bệnh phẩm (máu và dịch não tủy) được tiến hành giải trình tự 16S rRNA theo quy trình chuẩn của Trường Đại học Bang Pennsylvania hướng dẫn [83].

DNA được tách chiết theo bộ sinh phẩm ZymoBiomics DNA MiniPrep (Zymo, Mỹ) sử dụng hạt từ tính (bead) và proteinase K, sau đó thu hồi 100ul DNA bằng dung dịch đệm elution. Sản phẩm DNA được tinh sạch và đo nồng độ phù hợp, sau đó được đưa làm khuôn giải trình tự 16S rRNA. 2 µl DNA

được ủ với 2 ng/μl đầu probe 336R-M13 (5'-CAGGGTTTTCCCAGTCACGA CACTGCTGCSYCCCGTAGGA GTCT-3') của vùng gene V1-V2, sau đó được kéo dài bởi 5 U/μl Klenow (NEB, Cat# M0210). Các sản phẩm và môi dư thừa sẽ được loại bỏ bởi enzyme 20 U/μl exonuclease (NEB, Cat# M0293). DNA sau đó được nhân bản bởi cặp mồi M13 (5'-CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') và 27F reverse (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') với dung dịch phản ứng MolTaq 16S/18S PCR 2X mastermix (Molzym, Cat# S-030-0250) ở 95 °C trong 15 giây, và 60 °C trong 2 phút với 35 vòng. Sản phẩm sau khi nhân bản được tinh sạch và tạo thư viện bằng bộ Hyper Prep Kit (KAPA Biosystems, Cat# KK8504). Thư viện được đo bằng Qubit, sau đó DNA tổng số thu được sẽ được giải trình tự bằng máy MiSeq sử dụng bộ sinh phẩm MiSeq V3 600 Cycles PE của Illumina với 20% PhiX và 6pM kích thước thư viện mẫu.

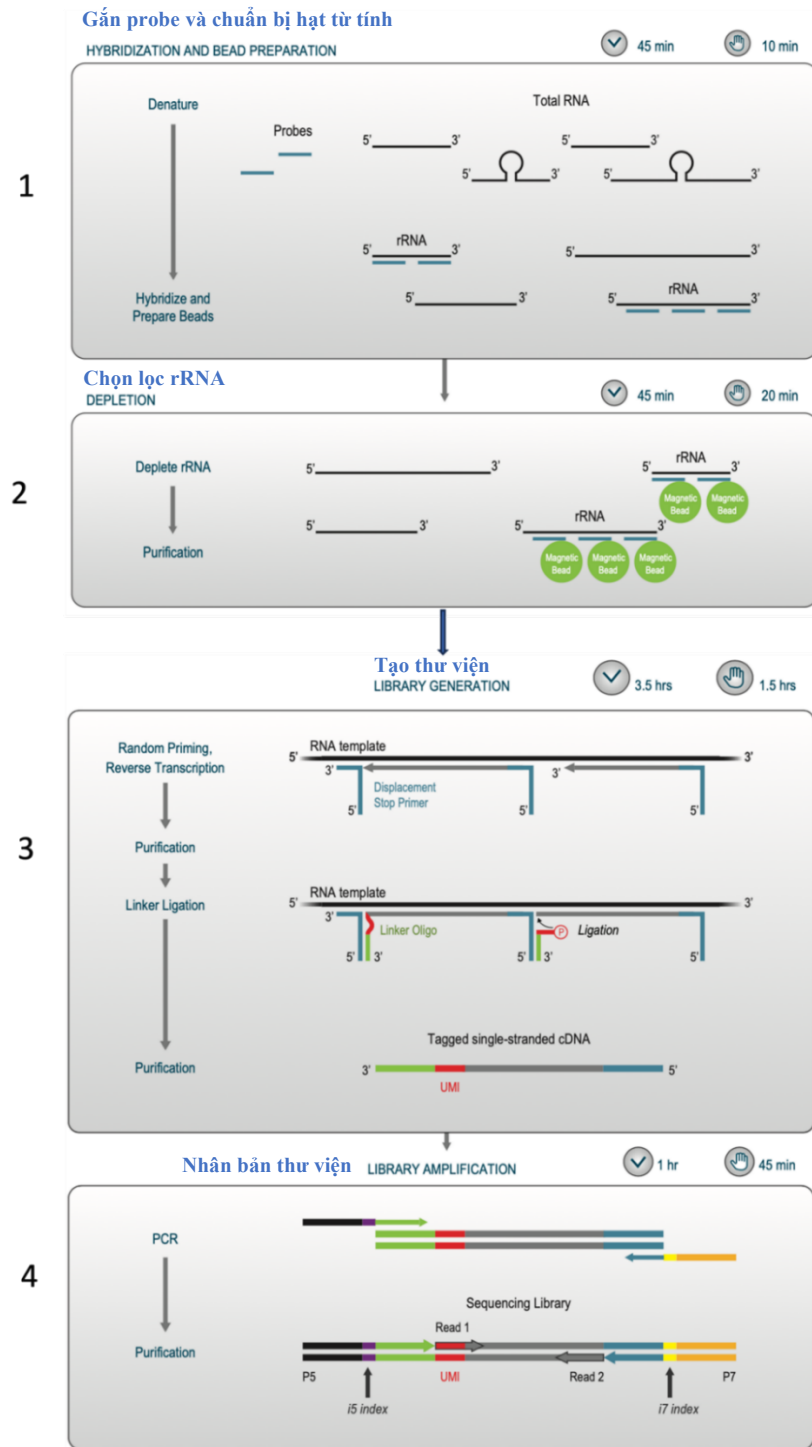


Hình 2.4. Phương pháp phân tích mẫu lâm sàng bằng giải trình tự và phân tích metagenomics [123]

2.6.3.2. Kỹ thuật giải trình tự RNA (RNA sequencing)

RNA được tách chiết từ mẫu máu và dịch não tủy theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm Direct-zol RNA Miniprep (Zymo, Mỹ) có sử dụng hạt từ tính (bead) để tách mẫu, sau đó sử dụng nguyên lý tách mẫu bằng phenol-chloroform của bộ kit để tách, 50 uL RNA được thu hồi bằng nước đã khử RNA/DNA.

RNA tổng số (total RNA) sẽ được đo nồng độ để chọn lọc mẫu. Sau đó, 1-1000 ng của RNA tổng số sẽ được tiến hành loại bỏ RNA nguồn gốc từ người bằng bộ kit rRNA Depletion Kits for Human/Mouse/Rat V2 (Lexogen, Áo). Sản phẩm sau tinh sạch là 10 μ l RNA sẽ được sao chép ngược và tinh sạch lần nữa bằng hạt từ tính, sau đó gắn Oligo vào đầu 3' của chuỗi cDNA. Phản ứng PCR để nhân bản các thư viện cDNA đã được gắn index i5 và i7 ở hai đầu 3' và 5', sau đó sản phẩm sẽ được tinh sạch để đo nồng độ và cho vào máy giải trình tự Miseq V3 600 Cycles PE của Illumina. Các bước này sử dụng bộ kit bằng kit CORALL Total RNA-Seq Library Prep Kits (Lexogen, Áo).



Hình 2.5. Quy trình giải trình tự RNA theo Lexogen

Chú thích: Bước 1: Hybridization and bead preparation - Gắn RNA với mỗi probe và chuẩn bị hạt từ tính: tại bước này, RNA được “làm giàu” từ RNA tách chiết qua phản ứng gắn mỗi probes tạo ra các đoạn RNA. Sau đó hạt từ tính sẽ được sử dụng để tinh sạch sản phẩm của bước này. Bước 2: Depletion – Chọn lọc rRNA: Bước này loại bỏ một số rRNA không cần

thiết và tinh sạch sản phẩm. Bước 3: Library generation – Tạo thư viện cDNA: tại đây, thư viện cDNA tạo ra từ phản ứng reverse transcription PCR (phiên mã ngược), sau đó sản phẩm được tinh sạch để gắn các oligo nối với barcode của đoạn cDNA. Sau khi tinh sạch sản phẩm sẽ có cDNA gắn tag cho giai đoạn tiếp theo. Bước 4: Library amplification - Nhân bản thư viện: Các đoạn cDNA được gắn index hai đầu (index 5 và 7), sau đó chạy phản ứng nhân bản thư viện. Sản phẩm sau nhân bản được tinh sạch, đo nồng độ và cho vào giải trình tự.

2.7. Quản lý và phân tích số liệu

Số liệu sẽ được nhập và quản lý bằng phần mềm Redcap (Research Electronic Data Capture, <https://www.project-redcap.org/>), phân tích thống kê bằng phần mềm R, phân tích metagenomics bằng công cụ tin sinh học như Qiime2 và một số luồng phân tích khác.

2.7.1. Nhập và quản lý số liệu bằng REDCap

Thông tin bệnh nhân được thu thập trong quá trình thu tuyển mẫu và từ bệnh án của bệnh nhân. Số liệu được nhập qua REDCap với các trường thông tin về nhân khẩu, lâm sàng và cận lâm sàng, kết quả xét nghiệm, nuôi cấy vi sinh vật gây bệnh.

Lý do lựa chọn REDCap: đây là một ứng dụng dựa trên cơ sở website, an toàn để xây dựng và quản lý các khảo sát và cơ sở dữ liệu trực tuyến. Phần mềm miễn phí cho các đối tác của REDCap. REDCap có nhiều tính năng, bao gồm [59, 60]:

Thiết kế dự án trực tuyến hoặc ngoại tuyến: Trực tuyến bằng trình thiết kế trực tuyến hoặc ngoại tuyến bằng cách sử dụng một mẫu từ điển dữ liệu của Wikipedia trong Microsoft Excel có thể được tải lên REDCap.

Bảo mật dữ liệu: Nhập dữ liệu hoặc xây dựng khảo sát hoặc cơ sở dữ liệu trực tuyến từ mọi nơi qua kết nối web an toàn, bảo mật với mã xác thực. Người sử dụng có quyền kiểm soát trực tiếp và toàn bộ hệ thống của mình, REDCap được cá nhân hóa hoàn toàn để đáp ứng các chính sách bảo mật và nhu cầu của người dùng.

Nhanh chóng và linh hoạt: việc xây dựng cơ sở dữ liệu, phiếu khảo sát được thực hiện ngay trên website.

Hoàn toàn tùy chỉnh: Cán bộ nghiên cứu được phân quyền có thể kiểm soát việc định hình cơ sở dữ liệu.

Theo dõi hoạt động người dùng: Để theo dõi thao tác dữ liệu và hoạt động của người dùng nhằm đảm bảo tính toàn vẹn của dữ liệu và khôi phục khi cần thiết. Người quản lý số liệu có thể kiểm tra ngay sau khi dữ liệu được tải lên cơ sở dữ liệu từ các thiết bị giúp thu thập số liệu như máy tính, máy tính bảng, điện thoại thông minh.

Dữ liệu được trích xuất sang nhiều định dạng khác nhau: như Excel, PDF, các phần mềm phân tích phổ biến như SPSS, SAS, Stata, R.

2.7.2. Phân tích thành phần phân loài các mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật metagenomics (qiime2, dada2, picrust, v.v.)

Kết quả thu được sau giải trình tự phân tích để xác định các đặc điểm sau:

- Thành phần phân loài (từ mức loài hoặc chi trở lên)
- Đa dạng sinh học (chỉ số alpha và beta) của các mẫu
- Độ phong phú của từng nhóm (mức loài, chi hoặc cao hơn)

Các thông tin này trên nhóm bệnh phẩm máu, dịch não tủy và trên các nhóm đối sánh (não úng thủy sau nhiễm trùng, não úng thủy nguyên phát, nhiễm trùng sơ sinh) sẽ được phân tích so sánh tương quan để xác định tác nhân tiềm năng nhằm hình thành các giả thuyết về tác nhân gây bệnh.

Kết quả giải trình tự 16S rRNA từ 300 mẫu dịch não tủy và máu từ hai nhóm NUT và NTSS được làm sạch và phân tích qua QIIME1/2, để xác định vị trí phân loại, các đoạn tinh sạch sau khi xử lý được phân tích, những đoạn có độ tương đồng trên 97% [41] sẽ được nhóm vào một đơn vị phân loại chức năng (OTU). Kết quả có 172 mẫu dịch não tủy và 71 mẫu máu có kết quả đạt chất lượng phân tích. Sau đó, số liệu giải trình tự 16S được được khử nhiễu

bằng Portra – là gói phân tích và làm sạch dữ liệu được tích hợp với R và Decontam R (https://benjjneb.github.io/decontam/vignettes/decontam_intro.html).

Kết quả giải trình tự RNA (RNA sequencing - RNA-seq) được kiểm tra chất lượng qua Fastq file và MultiQC. Giải trình tự RNA-seq là giải trình tự với độ sâu tối ưu là 50 triệu đọc (high depth sequencing with 50 million reads). Độ sâu giải trình tự cao hơn tạo ra nhiều lần đọc thông tin hơn, điều này làm tăng sức mạnh thống kê để phát hiện biểu hiện khác biệt giữa các gene có mức độ biểu hiện thấp hơn [219]. Do dữ liệu về RNA-seq là rất lớn nên phải sử dụng công cụ tin sinh học hỗ trợ. Nghiên cứu này được thực hiện bởi nhóm chuyên gia phân tích số liệu của trường đại học bang Pennsylvania. Dữ liệu sau khi sàng lọc loại bỏ adapters thì được chạy lọc loại bỏ gene có nguồn gốc từ người (human gene), sử dụng gói phân tích Bioconductor MicrobimeExplorer [205]. Sau đó, số liệu được so sánh với ngân hàng dữ liệu ID-seq để tìm ra các vi sinh vật có trong quần thể (<https://idseq.net>). Dữ liệu từ ID-seq sẽ được xem xét và phân tích qua gói *PathSeeker* (<https://github.com/Mercedeh66/PathSeeker>) tích hợp trên R để lọc số liệu hiệu quả và đưa ra kết quả chính xác về quần thể vi sinh vật. *PathSeeker* được phát triển bởi nhóm chuyên gia về phân tích số liệu của đại học Yale, Mỹ. Kết quả có 85 mẫu dịch não tủy và 52 mẫu máu đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.7.3 Xử lý và phân tích số liệu

Các tác nhân gây bệnh được xác định thông qua giải trình tự gene của tác nhân vi sinh sẽ được mô tả bằng phân loại định danh tác nhân và mô tả mối liên hệ giữa các chủng của cùng loại tác nhân trên các bệnh nhân khác nhau bằng cây tiến hoá. Số liệu điều tra được làm sạch và phân tích bằng R. Thông tin chưa đầy đủ được thu thập bằng hồi cứu bệnh án.

Phân tích sinh học phân tử 16S rRNA và RNA-seq bằng cách sử dụng R, và gói phân tích Bioconductor/metagenomeSeq (http://www.cbcb.umd.edu/software/meta_genomeSeq) [205]. Đối với 16S rRNA, phân tích đa dạng và hiển thị hóa: Nghiên cứu đa dạng hệ vi sinh vật (alpha diversity) được thực hiện dựa trên xác định một số chỉ số cơ bản, trong đó quan trọng nhất là các chỉ số Shannon, Simpson, ACE và Chao1 [68]. Phương pháp tọa độ (ordination) được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các kiểu thành phần loài và biến thiên môi trường cơ bản, sử dụng phổ biến trong các phân tích thống kê với những bộ dữ liệu lớn (big data) [33]. Phân tích tọa độ chính (PCoA) để đánh giá sự khác biệt trong các mẫu hệ vi khuẩn đường ruột, các OTU vi khuẩn ở mức độ chi đã được gắn vào ma trận PCoA thay vì PCA. Đối với RNA-seq, dữ liệu từ ID-seq sẽ được xem xét và phân tích qua gói *PathSeeker* (<https://github.com/Mercedeh66/PathSeeker>) tích hợp trên R để lọc số liệu hiệu quả và đưa ra kết quả chính xác về quần thể vi sinh vật. *PathSeeker* được phát triển bởi nhóm chuyên gia về phân tích số liệu của đại học Yale, Mỹ. Sử dụng phần mềm R phiên bản 4.2.3 để vẽ biểu đồ và phân tích.

2.8. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Mục đích của nghiên cứu được thông báo, giải thích với gia đình và người nhà bệnh nhi. Đối tượng chỉ được đưa vào nghiên cứu sau khi có sự đồng ý. Mọi thông tin cá nhân của bệnh nhi và của gia đình bảo đảm tuyệt đối bí mật chỉ được sử dụng vào mục đích nghiên cứu khoa học của đề tài.

Đây là nghiên cứu quan sát không can thiệp mọi kết quả, ý kiến đề xuất của đề tài chỉ nhằm mục đích nâng cao chất lượng điều trị, chăm sóc và nâng cao sức khỏe trẻ em.

Nghiên cứu đã được thông qua hội đồng đạo đức theo giấy chứng nhận số HĐĐĐ - 17/2019 ngày 01/7/2019 của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và số 1227/BVNTW-VNCSKTE ngày 04/9/2019 của Bệnh viện Nhi Trung ương.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Mô tả một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhi não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương, 2019-2020

3.1.1. Một số đặc điểm nhân khẩu học của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

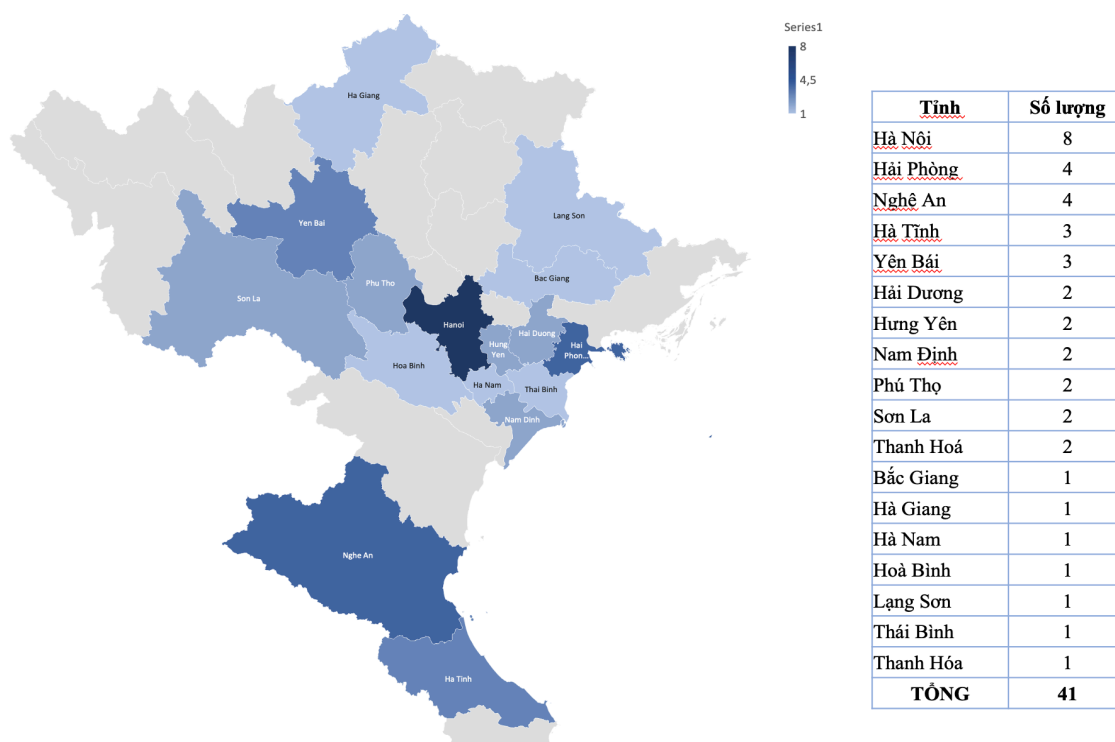
3.1.1.1. Một số đặc điểm của trẻ mắc não úng thủy

Bảng 3.1. Một số đặc điểm nhân khẩu học của nhóm bệnh nhân não úng thủy (n = 41)

Đặc điểm	Chỉ số	
Tuổi (tháng)	GTTB $\pm$ SD	4,0 $\pm$ 3,1
Cân nặng (gram)	GTTB $\pm$ SD	5502,0 $\pm$ 2686,4
Chiều cao (cm)	GTTB $\pm$ SD	55,4 $\pm$ 9,1
Kích thước vòng đầu (cm)	GTTB $\pm$ SD	41,5 $\pm$ 7,6
Tuổi thai lúc sinh (tuần)	GTTB $\pm$ SD	33,3 $\pm$ 4,8
Thứ tự trẻ, n (%)	1	12 (29,3%)
	2	8 (19,5%)
	3	6 (14,6%)
	4	1 (2,4%)
<i>Hình thức sinh, n (%)</i>		
Sinh thường		17 (41,5%)
Sinh mổ		7 (17,1%)
<i>Phân nhóm NUT, n (%)</i>		
NUT sau nhiễm trùng (PIH)		25 (61,0%)
NUT không do nhiễm trùng (NPIH)		16 (39,0%)

Ghi chú: GTTB: giá trị trung bình, SD: Độ lệch chuẩn, n: số lượng, %: tỷ lệ phần trăm

Số lượng bệnh nhân đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu là 41 bệnh nhân, trong đó có 28 nam và 13 nữ thuộc hai nhóm NUT do nhiễm trùng (PIH - chiếm 61,9%) và NUT không do nhiễm trùng (NPIH - chiếm 38,1%). Độ tuổi trung bình của nhóm là 4,0 tháng, cân nặng trung bình là 5502,0 gram. Chiều dài trung bình là 55,4 cm với kích thước vòng đầu là 41,5 cm. Tuổi thai trung bình của nhóm là 33,3 tuần với số trẻ sinh non 18/41 (tương đương 43,9%). Trẻ sinh ra là con thứ 1 và 2 là chủ yếu, và tỷ lệ sinh thường chiếm đa số.



Hình 3.1. Phân bố của bệnh nhân Não úng thủy theo khu vực địa lý

Trong nghiên cứu này, Hà Nội có số lượng trẻ nhiều nhất (8/41) so với các tỉnh khác. Tuy nhiên, tỷ lệ trẻ đến từ nông thôn và miền núi phía bắc là cao nhất, chiếm 68,3% trong đó 19,5% số trẻ thuộc khu vực miền núi. Tỷ lệ trẻ là dân tộc thiểu số chiếm 9,7% (H'mông, Khơ mú và Tày) , còn lại là dân tộc kinh.

Bảng 3.2. Đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân não úng thủy

Đặc điểm	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn	Ngưỡng chuẩn
Bạch cầu ($10^9/L$)	12,1	6,2	3,5-10,5
Huyết sắc tố (g/L)	125,6	94,9	104-125
Neutrophil ($10^9/L$)	4,4	3,1	2,5 – 6,4
Lymphocytes (%)	52,9	15,6	20-25
Eosinophiles (%)	3,4	3,9	
Basophiles (%)	0,3	0,2	
Protein dịch não tủy (mg/L)	2,6	4,3	

Các chỉ số xét nghiệm của nhóm bệnh nhân NUT ở bảng 3.2, các chỉ số về máu đều thể hiện trong cơ thể người bệnh có xuất hiện sự nhiễm trùng hay không. Cụ thể, giá trị trung bình của bạch cầu là 12,1 cao hơn so với ngưỡng $8,7 - 16,7 \times 10^9/L$, chỉ số Lymphocytes trung bình 52,9% trong khi tỷ lệ này ở người bình thường là từ 20-25%.

Bảng 3.3. Kết quả chẩn đoán lâm sàng trước và sau khi ra viện

Đặc điểm lâm sàng	Số lượng (%)
<i>Trước khi vào viện</i>	
Giãn não thất	18 (43,9 %)
Giãn não thất từ bào thai	6 (14,6 %)
Viêm màng não	13 (31,7 %)
Nhiễm trùng sơ sinh	5 (12,1 %)
<i>Ra viện</i>	
Não úng thủy	30 (73,2 %)
Viêm màng não (NTSS)	9 (22,0 %)
Suy hô hấp	2 (4,8 %)

Trong số 41 trẻ mắc não úng thủy, chẩn đoán trước khi vào viện được chia thành bốn đặc điểm chính: Giãn não thất, giãn não thất từ bào thai, viêm

màng não và nhiễm trùng sơ sinh. Trong đó, một số người bệnh có cả hai hoặc ba đặc điểm này, cụ thể: 18 trường hợp có dấu hiệu tăng kích thước vòng đầu và chẩn đoán giãn não thất, 13 trường hợp chẩn đoán viêm màng não (bao gồm 04 trẻ sinh non), 06 trẻ giãn não thất từ trong bào thai và 05 trẻ chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh (bao gồm 02 trẻ sinh non). Chẩn đoán sau khi ra viện có 30 trường hợp (tương ứng 73,2%) là não úng thủy, 09 bệnh nhân chẩn đoán viêm màng não do tác nhân vi sinh (chiếm 22,0%) và 02 trường hợp suy hô hấp (chiếm 4,8%). Trong nhóm NUT nghiên cứu, có 03 trường hợp trẻ sinh non mắc bệnh nặng và tử vong (mô tả ở bảng 3.4), tỷ lệ tử vong ca bệnh là 7,3%.

Bảng 3.4. Đặc điểm của bệnh nhi não úng thủy tử vong

Đặc điểm	Bệnh nhi 1	Bệnh nhi 2	Bệnh nhi 3
Tuổi khi nhập viện (ngày)	0	40	41
Giới tính	Nam	Nam	Nam
Cân nặng (g)	970	1500	3000
Tuổi thai lúc sinh (tuần)	26	27	32
Hình thức sinh	Sinh thường	Sinh thường	Sinh mổ
Chẩn đoán			
Bệnh chính	Suy hô hấp	Giãn não thất	Viêm màng não do <i>E. coli</i>
Bệnh kèm theo	Xuất huyết não độ 4	Đẻ non	Nhiễm trùng sơ sinh
Thời gian điều trị (ngày)	34	8	133

Ba ca tử vong là các bệnh nhi dưới 2 tháng tuổi, giới tính nam và đều là các trường hợp sinh non dưới 37 tuần. Chẩn đoán bệnh chính là suy hô hấp, giãn nở thất và viêm màng não do *E. coli*. Thời gian điều trị hay thời gian nằm viện lần lượt là 34 ngày, 8 ngày và 133 ngày.

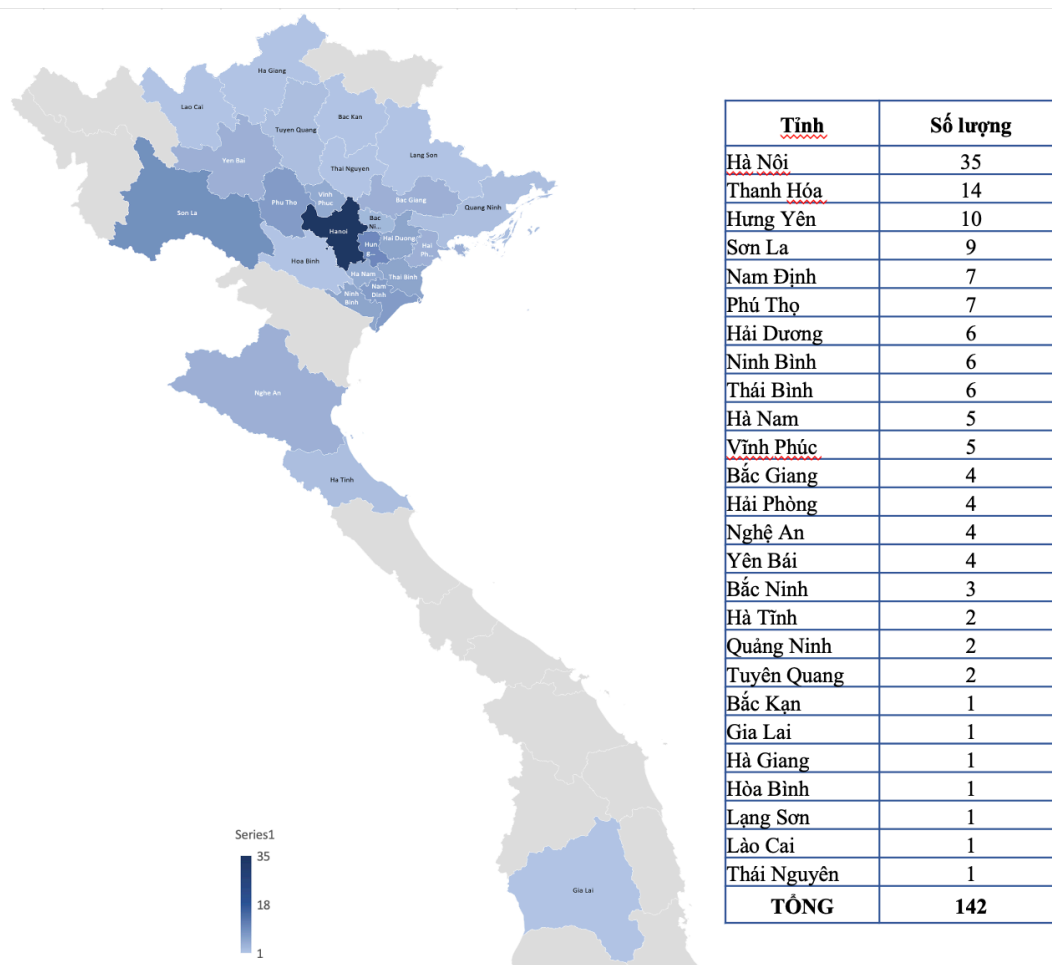
3.1.1.2. Một số đặc điểm của trẻ nhiễm trùng sơ sinh

Bảng 3.5. Một số đặc điểm nhân khẩu của nhóm bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh (n = 142)

Đặc điểm	Chỉ số	
Tuổi (ngày)	GTTB $\pm$ SD	9,1 $\pm$ 10,1
Giới tính, n (%)		
	Nam	92 (64,8 %)
	Nữ	50 (35,2 %)
Cân nặng (gram)	GTTB $\pm$ SD	2867,9 $\pm$ 1033,3
Kích thước vòng đầu (cm)	GTTB $\pm$ SD	32,4 $\pm$ 3,5
Tuổi thai lúc sinh (tuần)	GTTB $\pm$ SD	36,3 $\pm$ 4,0
Phân nhóm tuổi thai, n (%)	< 37 tuần	51 (35,9%)
	$\geq$ 37 tuần	87 (61,3%)
Thời gian vỡ ối (giờ)	GTTB $\pm$ SD	2,5 $\pm$ 7,1
Thứ tự trẻ, n (%)	1	62 (43,7 %)
	2	48 (33,8 %)
	3	29 (20,4 %)
	4	2 (1,4 %)
Hình thức sinh, n (%)		
	Sinh thường	74 (52,1%)
	Sinh mổ	67 (47,2%)

Ghi chú: GTTB: giá trị trung bình, SD: Độ lệch chuẩn, n: số lượng, %: tỷ lệ phần trăm

Số lượng bệnh nhân tham gia nghiên cứu là 142 trẻ. Tuổi trung bình nhập viện của trẻ là 9,1 ngày với tuổi thai khi sinh trung bình là 36,3 tuần, tỷ lệ trẻ sinh đủ tháng cao hơn so với trẻ sinh non. Tỷ lệ nam và nữ nhập viện lần lượt là 64,8% và 35,2%. Cân nặng trung bình của nhóm NTSS khoảng 2867,9 gram, kích thước vòng đầu trung bình là 32,4 cm. Tuổi thai trung bình 36,3 tuần, tỷ lệ sinh thường là 52,1% và sinh mổ là 47,2%. Trẻ sinh non dưới 37 tuần chiếm 35,9%, trẻ sinh đủ tháng là 61,3%. Trẻ sinh ra là con đầu lòng chiếm 43,7%.



Hình 3.2. Phân bố bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh theo khu vực địa lý

Sau khi phân tích số liệu về đặc điểm địa lý cho thấy bệnh nhân tập trung ở khu vực Hà Nội (24,6%) là cao nhất và rải rác ở các tỉnh thành khu vực phía Bắc. Tỷ lệ trẻ đến từ thành phố chiếm 39,4 %, trẻ thuộc khu vực miền núi là 12,7% và 47,9% trẻ thuộc khu vực nông thôn.

Bảng 3.6. Đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh (n = 142)

Đặc điểm	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Ngưỡng chuẩn
Bạch cầu ($10^9/L$)	15,1	8,0	3,5-10,5
Heamoglobin (g/L)	132,4	25,9	104-125
Neutrophil ($10^9/L$)	8,6	6,2	2,5 – 6,4
Lymphocytes (%)	28,1	15,4	20-25
Eosinophiles (%)	2,9	3,1	
Basophiles (%)	0,8	2,5	
Số lượng tế bào trong dịch não tủy (tế bào có nhân/mm ³)	660,1	6314,5	
Protein dịch não tủy	2,4	10,0	

Các yếu tố sinh hoá máu thể hiện tình trạng nhiễm trùng của trẻ với giá trị trung bình của bạch cầu là $15,1 \times 10^9/L$, bạch cầu trung tính (neutrophil) là $8,6 \times 10^9/L$ và tỷ lệ eosinophiles là 2,9%, số lượng tế bào trong dịch não tủy là 752,9/mm³, các chỉ số này đều cao hơn so với ngưỡng tiêu chuẩn.

Bảng 3.7. Chẩn đoán bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh khi ra viện (n=142)

Chẩn đoán	Số lượng	Tỷ lệ %
Nhiễm trùng sơ sinh (NTSS)	75	52,8
<i>NTSS</i>	70	
<i>NTSS do nấm Candida</i>	1	
<i>NTSS do E.coli</i>	1	
<i>NTSS do Enterobacter</i>	1	
<i>Sốc nhiễm trùng</i>	2	
Nhiễm trùng tiết niệu	1	0,7
Nhiễm trùng thần kinh	28	19,7
<i>Viêm màng não (VMN)</i>	21	
<i>VMN do Enterovirus</i>	2	

Chẩn đoán	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>VMN do Herpatitis E Virus - HEV</i>	3	
<i>VMN do Respiratory Syncytial Virus - RSV</i>	1	
<i>VMN do Herpes Simplex virus - HSV</i>	1	
Suy hô hấp	14	9,9
Nhiễm trùng hô hấp	9	6,4
<i>Viêm đường hô hấp</i>	2	
<i>Viêm phế quản</i>	4	
<i>Viêm phế quản do Elizabethkingia</i>	1	
<i>Viêm phổi</i>	2	
Tăng huyết áp phổi sơ sinh	1	0,7
Não úng thủy	2	1,4
Xuất huyết não	1	0,7
Giang mai bẩm sinh	2	1,4
Sinh non	4	2,8
Bệnh khác	5	3,5

Chẩn đoán bệnh nhi mắc nhiễm trùng sơ sinh chiếm tỉ lệ cao nhất là 52,8%, trong đó một số trường hợp xác định căn nguyên qua nuôi cấy hoặc xét nghiệm PCR đa môi (NTSS do nấm, do vi khuẩn *E.coli* và *Enterobacter*). Nhiễm trùng tiết niệu xác định 01 trường hợp. Nhiễm trùng thần kinh chiếm 19,1% trong đó một số bệnh nhi xác định được tác nhân gây viêm màng não do vi rút như Enterovirus, vi rút hợp bào hô hấp, vi rút viêm gan E hay vi rút Herpes. Suy hô hấp chiếm 9,9%, nhiễm trùng hô hấp có tỷ lệ 6,4% và tăng huyết áp phổi sơ sinh chiếm 0,7%. Trong số các bệnh nhân, có 02 bệnh nhân chẩn đoán mắc não úng thủy có tỷ lệ 1,4% và 01 bệnh nhân xuất huyết não chiếm 0,7%. Giang mai bẩm sinh có 02 trường hợp, sinh non có 04 trường hợp. Các bệnh khác bao gồm ngạt sau sinh, loạn sản phế quản phổi, co giật sơ sinh và động kinh. Các bệnh nhi này khi nhập viện được chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh

nhưng kết quả nuôi cấy và xét nghiệm không phát hiện được tác nhân gây bệnh. Trong số bệnh nhân NTSS, có 12 trẻ nặng và tử vong (mô tả trong bảng 3.8), tỷ lệ tử vong ca bệnh là 8,5%.

Bệnh nhi tử vong do nhiễm trùng sơ sinh đều dưới 1 tháng tuổi. Trong số 12 trẻ, tỷ lệ theo giới tính là 07 nam và 05 nữ. Trẻ sinh non dưới 37 tuần là 06 trường hợp và cũng là trẻ sinh ra nhẹ cân. Trẻ sinh thường nhiều hơn trẻ sinh mổ, thời gian nằm viện đa phần dưới một tháng, có một trường hợp điều trị 53 ngày.

Bảng 3.8. Đặc điểm của bệnh nhi mắc nhiễm trùng sơ sinh tử vong

Đặc điểm	BN 1	BN 2	BN 3	BN 4	BN 5	BN 6	BN 7	BN 8	BN 9	BN 10	BN 11	BN 12
Tuổi khi nhập viện (ngày)	28	0	1	18	8	0	5	0	26	7	1	19
Giới tính	Nam	Nam	Nữ	Nữ	Nam	Nam	Nam	Nữ	Nữ	Nam	Nữ	Nam
Cân nặng (g)	1200	3000	970	2280	1600	3000	2800	2700	1600	2600	2650	2000
Tuổi thai lúc sinh (tuần)	29	39	29	35	30	40	38	40	29	37	40	35
Hình thức sinh	Sinh mổ	Sinh mổ	Sinh mổ	Sinh thường	Sinh thường	Sinh thường	Sinh mổ	Sinh thường	Sinh thường	Sinh thường	Sinh thường	Sinh thường
Chẩn đoán												
Bệnh chính	NTSS	NTSS	NTSS	Shock NTSS	NTSS	NTSS	NTSS	Ngạt sau sinh	NTSS do Enterbacter	NTSS	NTSS	NTSS
Bệnh kèm theo	Suy hô hấp	Suy hô hấp							Sinh non	Suy đa tạng		
Thời gian nằm viện (ngày)	7	11	53	2	31	3	27	3	11	3	33	5

Chú thích: BN: Bệnh nhi, NTSS: nhiễm trùng sơ sinh

3.1.1.3. Kết quả xét nghiệm miễn dịch của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

a. Não úng thủy

Bảng 3.9. Kết quả xét nghiệm miễn dịch tự động và test nhanh của bệnh nhân não úng thủy

Kết quả phản ứng miễn dịch tự động	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>Vi rút Cytomegalo (CMV) IgG dương tính</i>	01	2,4
<i>Dương tính với Vi rút Cytomegalo CMV IgG - IgM và vi rút Herpes HSV 1+2 IgG</i>	01	2,4
<i>Âm tính</i>	27	65,8
Kết quả phản ứng test nhanh		
<i>Dương tính với Vi rút hợp bào hô hấp A (RSV A)</i>	02	5,1
<i>Âm tính</i>	10	24,3

Không phải tất cả các bệnh nhân não úng thủy được xét nghiệm miễn dịch tự động và test nhanh với một số tác nhân gây bệnh phổ biến, bác sĩ dựa trên chẩn đoán lâm sàng để yêu cầu thực hiện các xét nghiệm này. Trong số 29 bệnh nhân được thực hiện phản ứng miễn dịch tự động, 01 bệnh nhân dương tính với IgG vi rút Cytomegalo (CMV), 01 bệnh nhân dương tính với cả IgG – IgM vi rút Cytomegalo (CMV) và IgG của vi rút Herpes 1+2 (HSV). Trong 12 bệnh nhân có kết quả test nhanh, 02 bệnh nhân dương tính với vi rút hợp bào hô hấp A (RSV A).

b. Nhiễm trùng sơ sinh

Bảng 3.10. Kết quả xét nghiệm miễn dịch tự động và test nhanh của bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh (n=142)

Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Kết quả phản ứng miễn dịch tự động		

Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>CMV IgG/IgM</i>	23	16,2
<i>HSV 1+2 IgG</i>	17	12,0
<i>Rubella IgG</i>	16	11,3
<i>Treponema pallidum TPHA</i>	5	3,5
<i>EBV-VCA IgG</i>	5	3,5
<i>Toxoplasma IgG</i>	4	2,8
Kết quả phản ứng test nhanh		
<i>Respiratory syncytial virus A (RSV A)</i>	10	7,0
<i>Âm tính</i>	19	13,4
<i>Không thực hiện</i>	113	79,6

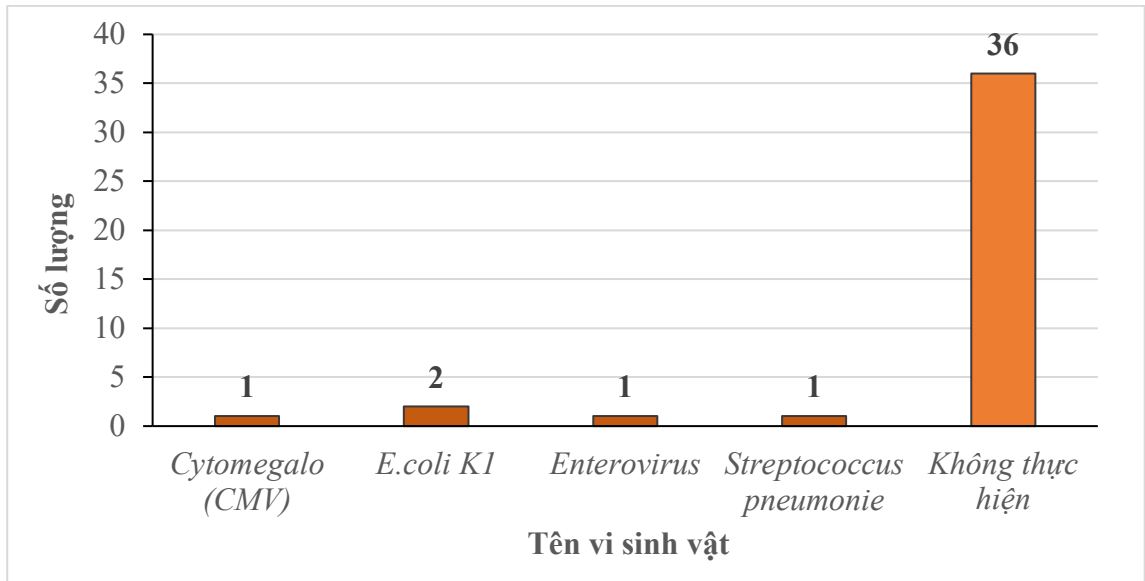
Kết quả phản ứng miễn dịch tự động cho thấy Cytomegalovirus - CMV IgG/IgM dương tính có tỷ lệ cao nhất là 16,2%. Herpes simplex viruses – HSV 1+2 IgG và Rubella IgG có tỷ lệ dương tính lần lượt là 12,0% và 11,3%, theo sau là *Treponema pallidum TPHA* và vi rút Epstein-Barr - EBV VCA IgG với tỷ lệ bằng nhau 3,5%, *Toxoplasma IgG* chiếm 2,8%. Phản ứng test nhanh Respiratory syncytial virus A (RSV A) - vi rút hợp bào hô hấp có tỷ lệ dương tính là 7,0%.

3.1.2. Các tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh ở trẻ sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương, 2019-2020

a. Kết quả phát hiện một số tác nhân gây bệnh não úng thủy

Kết quả nuôi cấy máu và dịch não tủy của nhóm não úng thủy là âm tính.

Mẫu dịch não tủy và mẫu máu của bệnh nhân được thực hiện chạy PCR đa môi phát hiện nhiều tác nhân [22].

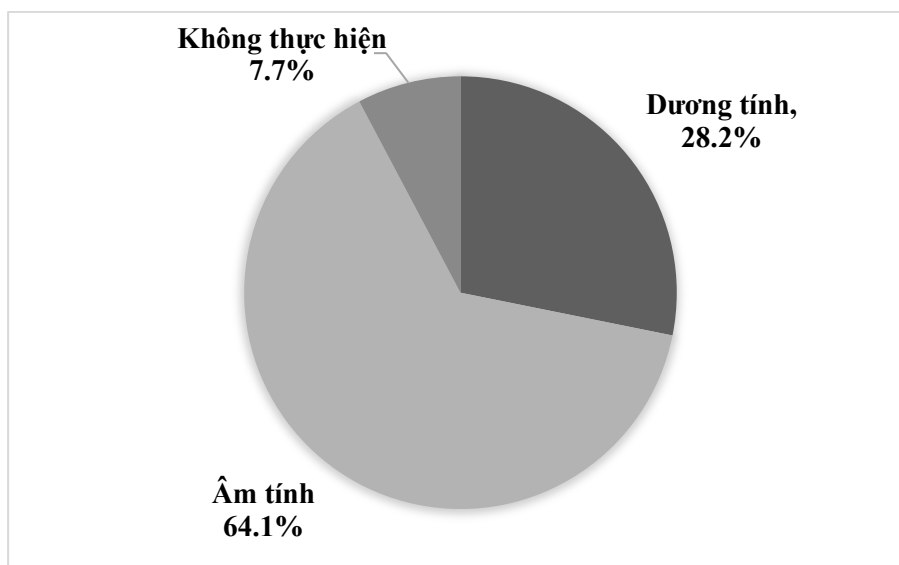


Hình 3.3. Kết quả PCR mẫu dịch não tủy của bệnh nhân não úng thủy

Kết quả PCR ở mẫu dịch não tủy của bệnh nhân NUT phát hiện 4 tác nhân gây bệnh bao gồm Cytomegalovirus, Enterovirus, vi khuẩn *Escherichia coli* K1 và *Streptococcus pneumoniae* ở 5 bệnh nhân được chỉ định thực hiện xét nghiệm (hình 3.3). Theo số liệu ghi nhận, 01 bệnh nhân bệnh nhân được xét nghiệm realtime PCR với CMV có kết quả dưới 1000 copy/ml trong số 02 bệnh nhân có xét nghiệm CMV IgG dương tính.

b. Kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh nhiễm trùng sơ sinh

Bệnh nhi nhiễm trùng sơ sinh được thực hiện nuôi cấy mẫu bệnh phẩm máu và dịch não tủy để phát hiện tác nhân gây bệnh.



Hình 3.4. Tỷ lệ nuôi cấy máu (n = 142)

Trong tổng số 142 bệnh nhi có 131 bệnh nhân có kết quả nuôi cấy máu với tỷ lệ dương tính là 28,2% (hình 3.4).

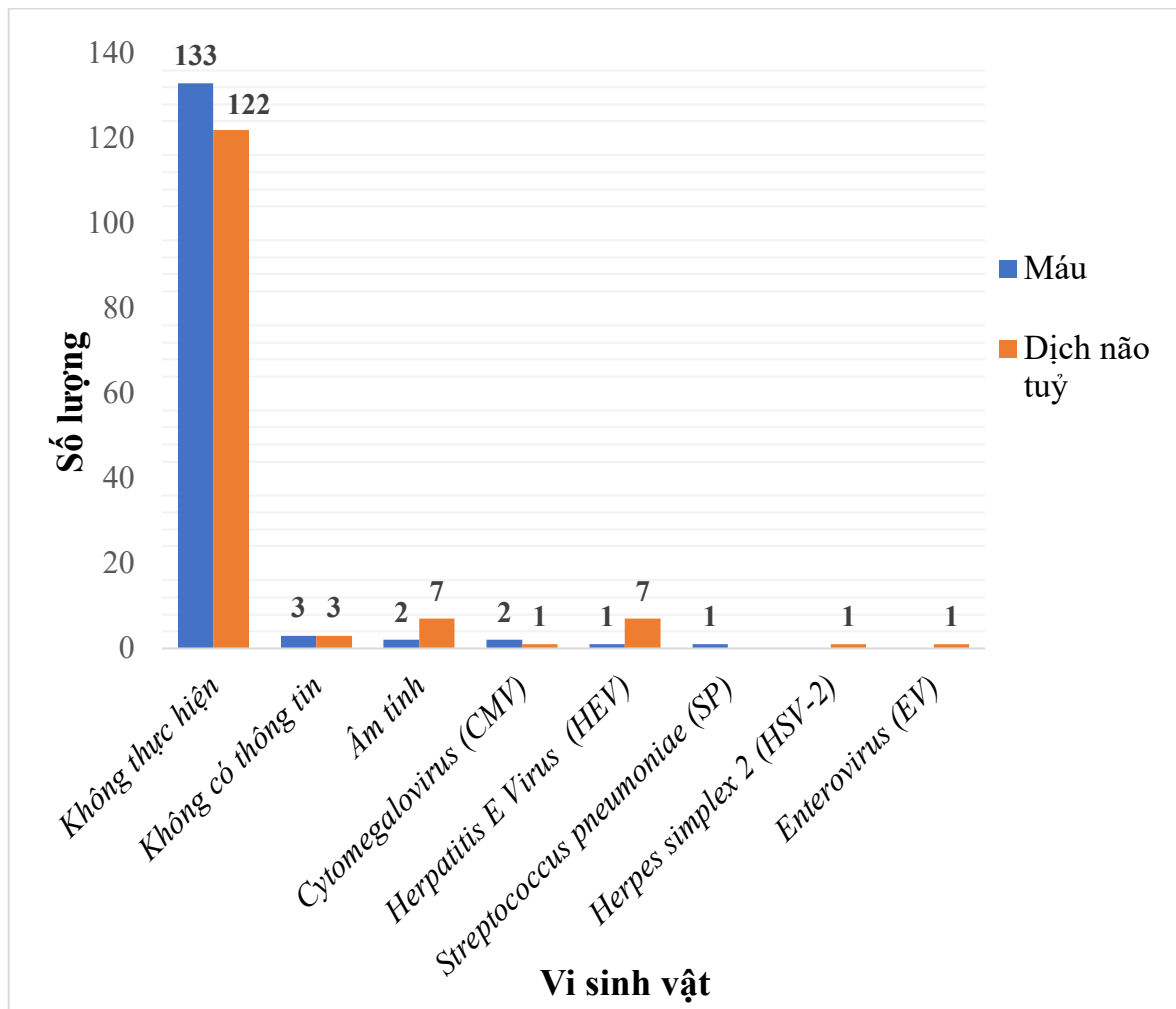
Bảng 3.11. Kết quả nuôi cấy phát hiện tác nhân gây bệnh của nhiễm trùng sơ sinh

STT	Vi sinh vật	Mẫu bệnh phẩm	
		Máu	Dịch não tủy
Gram âm			
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	
2	<i>Escherichia coli</i>	6	1
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	
4	<i>Burkholderia cepacia</i>	2	
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	
7	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1	1
8	<i>Acinetobacter iwoffii, Escherichia coli</i>	1	
9	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	
11	<i>Serratia fonticola</i>	1	
12	<i>Serratia marcescens</i>	1	
13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	

STT	Vi sinh vật	Mẫu bệnh phẩm	
		Máu	Dịch não tủy
Gram dương			
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> spp.	1	
4	<i>Enterococcus faecium</i>	1	
5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	
Nấm			
1	<i>Candida guillerrmondii</i>	1	
2	<i>Candida orthopsilosis</i>	1	
3	<i>Candida tropicalis</i>	1	
Âm tính		91	128
Không thực hiện		11	12
TỔNG		142	142

Ở nhóm bệnh nhi mắc NTSS, có 40 trường hợp bệnh nhi có kết quả nuôi cấy máu dương tính với vi sinh vật gây bệnh (tương đương 28,2%), các vi sinh vật gây bệnh cũng được phát hiện chủ yếu thông qua nuôi cấy máu bao gồm vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm, Gram dương và nấm (bảng 3.11). Tỷ lệ nuôi cấy dịch não tủy dương tính là 1,4% tương ứng với 02 trường hợp, trong đó một bệnh nhi dương tính với *Elizabethkingia meningoseptica* và một người dương tính với *Escherichia coli*. Kết quả nuôi cấy phát hiện một số các tác nhân vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm như *Klebsiella pneumoniae* (11 mẫu bệnh phẩm), *Escherichia coli* (07 mẫu), *Burkholderia cepacia* (02 mẫu), *Enterobacter cloacae* (03 mẫu), *Elizabethkingia meningoseptica* (02 mẫu) (bảng 3.11). Vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* có tỷ lệ nuôi cấy dương tính cao nhất là 7,7%, sau đó là *E. coli* với 4,9%. Vi khuẩn Gram dương có nhóm *Staphylococcus* spp. với *Staphylococcus aureus* xuất hiện ở 02 mẫu máu, *Staphylococcus haemolyticus* ở 01 mẫu, *Staphylococcus epidermidis* và *Corynebacterium* spp.

đồng thời ở 01 mẫu, *Enterococcus faecium* có 01 mẫu và *Streptococcus agalactiae* có ở 01 mẫu. Các vi khuẩn được phân lập thuộc nhóm Gram âm chiếm số lượng lớn hơn (33 mẫu) so với vi khuẩn Gram dương (6 mẫu) và Gram dương chỉ có kết quả nuôi cấy máu. Trong các tác nhân có sự xuất hiện của nấm *Candida* spp. bao gồm ba chủng: *Candida guillerrmondii*, *Candida orthopsilosis* và *Candida tropicalis*. Mỗi chủng nấm được phát hiện ở 01 mẫu máu qua nuôi cấy. Phương pháp nuôi cấy cho tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh ở nhóm nhiễm trùng sơ sinh là 14,8% trên tổng số 284 mẫu bệnh phẩm máu và dịch não tủy. Đáng lưu ý, kết quả nuôi cấy máu và dịch não tủy có hai trường hợp cùng loại vi khuẩn đó là *Elizabethkingia meningoseptica* và *Escherichia coli*.



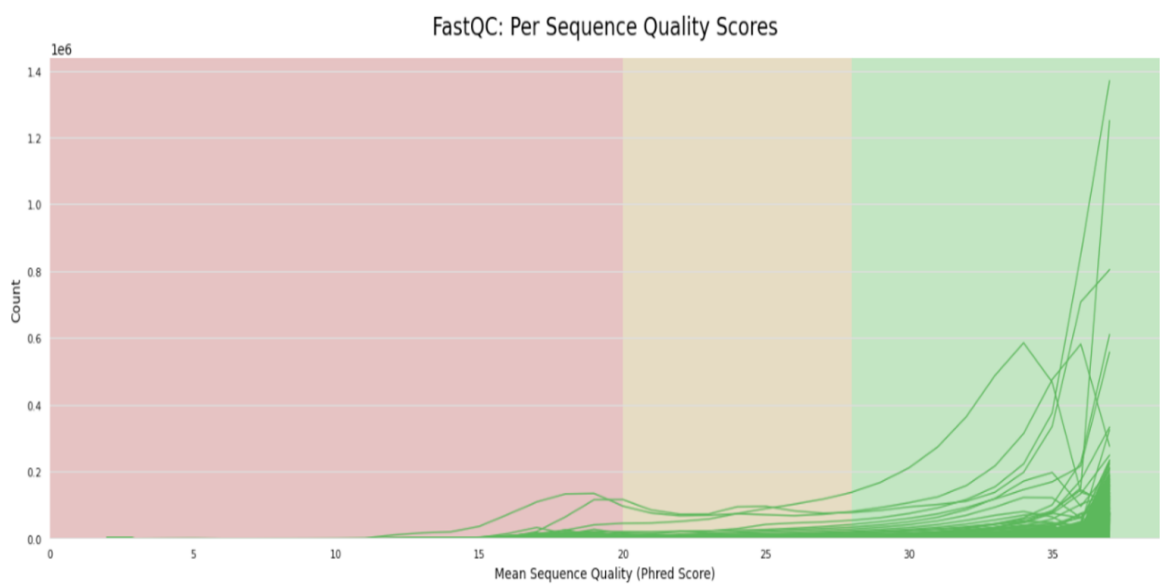
Hình 3.5. Kết quả PCR đa môi cho mẫu NTSS (n = 142)

Ở bệnh nhân NTSS, vi khuẩn phát hiện được bằng phương pháp PCR đa mồi là *Streptococcus pneumonia* trên mẫu bệnh phẩm máu. Các tác nhân vi rút như Cytomegalovirus (CMV), Enterovirus (EV), Herpatitis E virus (HEV) và Herpes simplex 2 virus (HSV-2) được phát hiện bằng phương pháp PCR, trong đó HEV có số lượng nhiều nhất là 8 mẫu với 7 mẫu dịch não tủy và 01 mẫu máu. Vi rút đại thực bào (Cytomegalovirus – CMV) có ở 03 mẫu bệnh phẩm trong đó có 02 mẫu máu và 01 mẫu dịch não tủy.

3.2. Giải trình tự gene thể hệ mới xác định tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

3.2.1. Ứng dụng giải trình tự gene 16S rRNA trong phát hiện tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

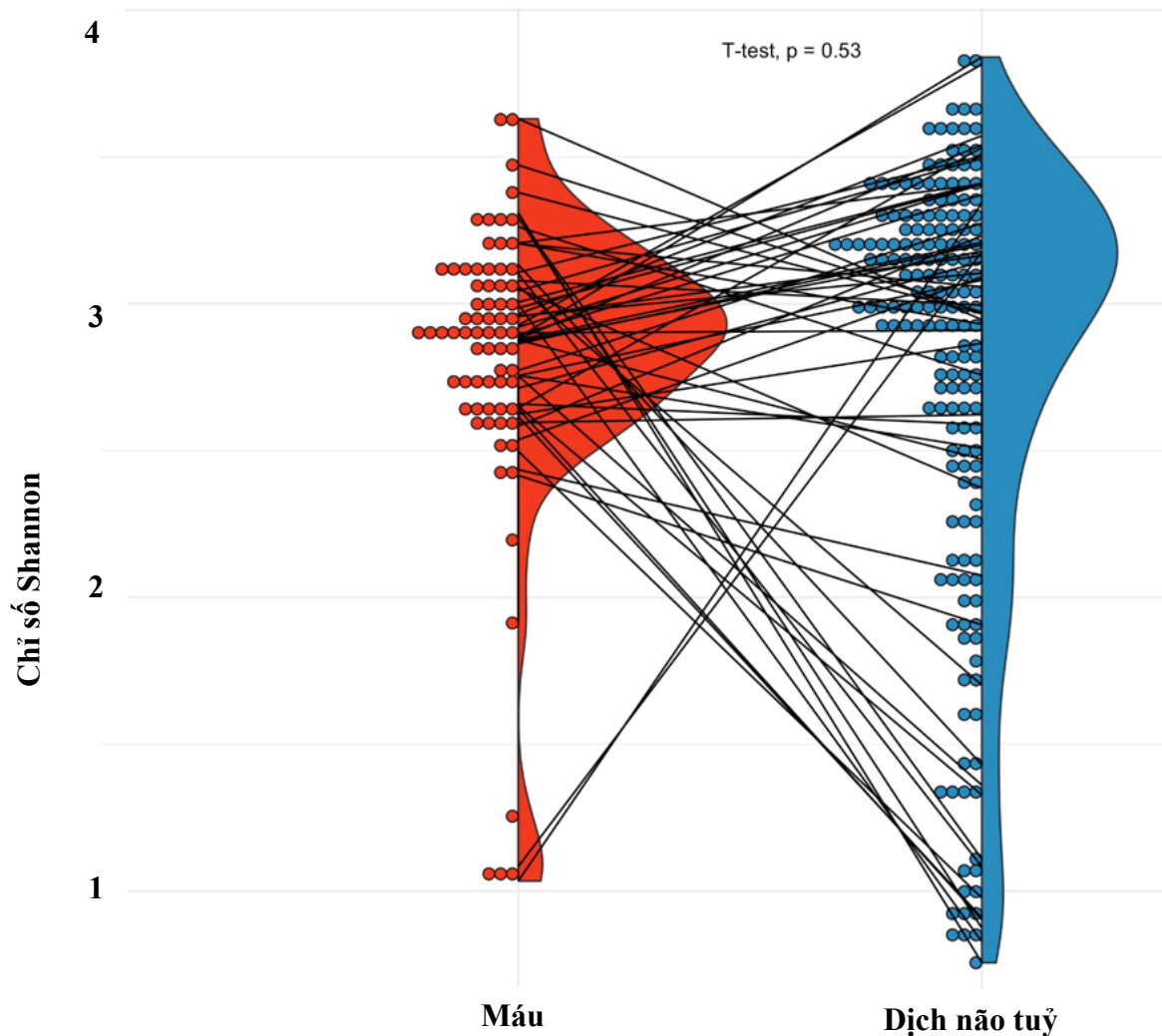
3.2.2.1. Kết quả phân tích so sánh các chỉ số đa dạng sinh học



Hình 3.6. Chỉ số kiểm soát chất lượng của giải trình tự (Phred score) của mẫu máu – nhóm nhiễm trùng sơ sinh

Kết quả giải trình tự 16s rRNA được đánh giá chất lượng qua chỉ số Phred score – đánh giá độ chính xác của các lần gọi (base call). Đối với kết quả đầu ra

của nghiên cứu này, chỉ số Phred là trên 30 (sấp xỉ 34), với sản phẩm từ giải trình tự Illumina thì là đạt tiêu chuẩn để thực hiện phân tích [147].

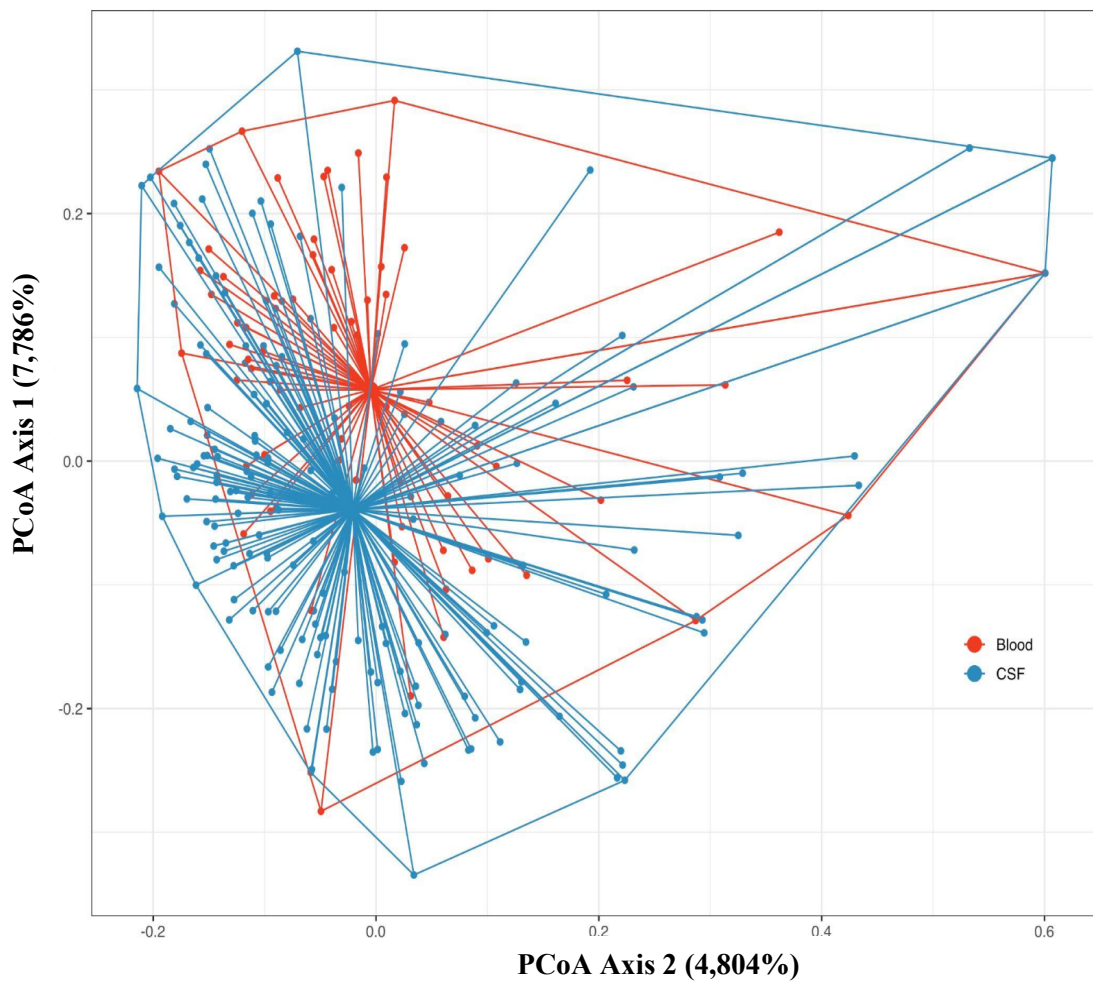


Hình 3.7. Chỉ số đa dạng sinh học loài H (Shanon index)

Chú thích: chấm tròn nhỏ màu xanh: các nhóm vi sinh vật ở mẫu dịch não tủy, chấm tròn nhỏ màu đỏ: các vi sinh vật ở mẫu máu; đường kẻ thể hiện sự tương đồng hay cùng một nhóm vi sinh vật ở cả hai mẫu.

Khi phân tích chỉ số đa dạng loài (Shannon index) ở cả hai nhóm máu và dịch não tủy của bệnh nhân NUT và NTSS, ở mẫu máu (thuộc nhóm NTSS), chỉ số này trong khoảng từ 1-3,6, ở dịch não tủy là 0,5-3,8. Chỉ số Shannon – Weiner càng cao thì quần xã càng đa dạng [199]. Giá trị của Shanon thường từ 1,5 đến 3,5, hiếm khi vượt qua được 4,5. Sự đa dạng về tác nhân vi sinh vật là

tương đối cao ở cả hai nhóm mẫu. Thêm vào đó, khi nhìn vào biểu đồ phân bố hình 3.7, khi so sánh giữa hai nhóm mẫu có thể thấy không có sự khác biệt về tính đa dạng vi sinh vật (với t-test $p > 0,05$). Cũng có thể thấy, ở mẫu dịch não tủy, một số vi sinh vật có mức độ đa dạng loài thấp (chỉ số Shannon < 1) nhưng những vi sinh vật này là có mức độ đa dạng loài cao ở nhóm máu (chỉ số Shannon = 3), và ngược lại, chỉ số đa dạng thấp ở mẫu máu nhưng lại cao ở dịch não tủy.



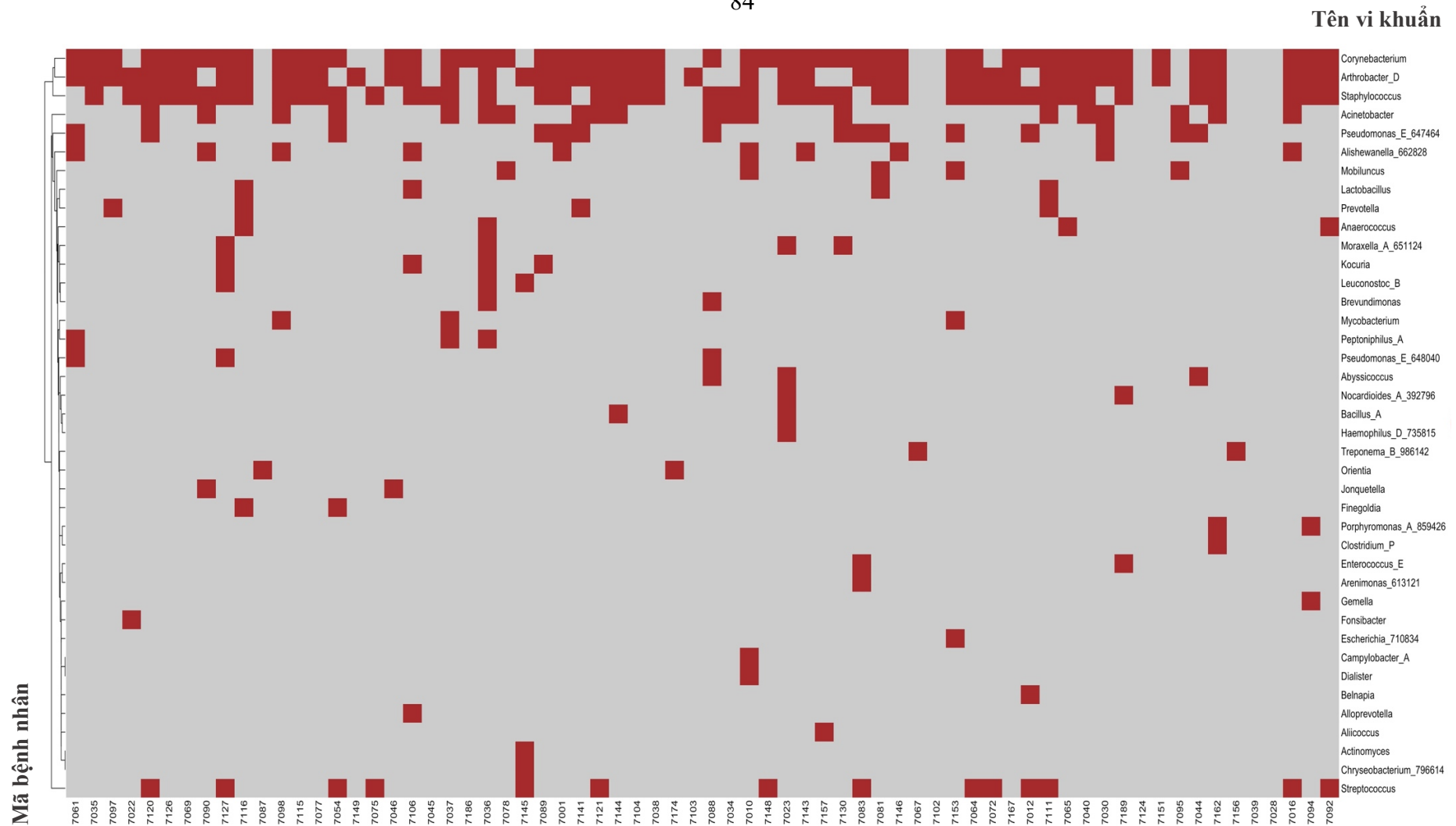
Hình 3.8. Kết quả phân tích toạ độ chính (PcoA) ở hai mẫu máu và dịch não tủy.

Chú thích: màu đỏ: mẫu bệnh phẩm máu, màu xanh: mẫu dịch não tủy; các đường kẻ là sự phân bố theo các chiều của nhóm vi sinh vật.

Hình 3.8 là kết quả phân tích các thành phần chính (Principle coordinate analysis – PCoA) thể hiện sự phân bố dựa trên ma trận đơn vị phân loài (Operational Taxonomic Units – OTU) của mẫu máu và dịch não tủy. Chiều định vị 1 (Axis 1) và 2 (Axis 2) giải thích và thể hiện cho 7,786% và 4,804% toàn bộ dữ liệu. Bên cạnh đó, có thể thấy tâm của hai phân bố của hai nhóm khá gần nhau, cho thấy thành phần vi khuẩn trong máu và dịch não tủy có xu hướng phân nhóm tương đối giống nhau. Phân tích PCoA cho thấy các điểm dữ liệu của hai nhóm mẫu máu và dịch não tủy phân bố tương đối gần nhau trên cùng một trục, điều này cho thấy không có sự khác biệt lớn về thành phần vi khuẩn giữa hai nhóm mẫu.

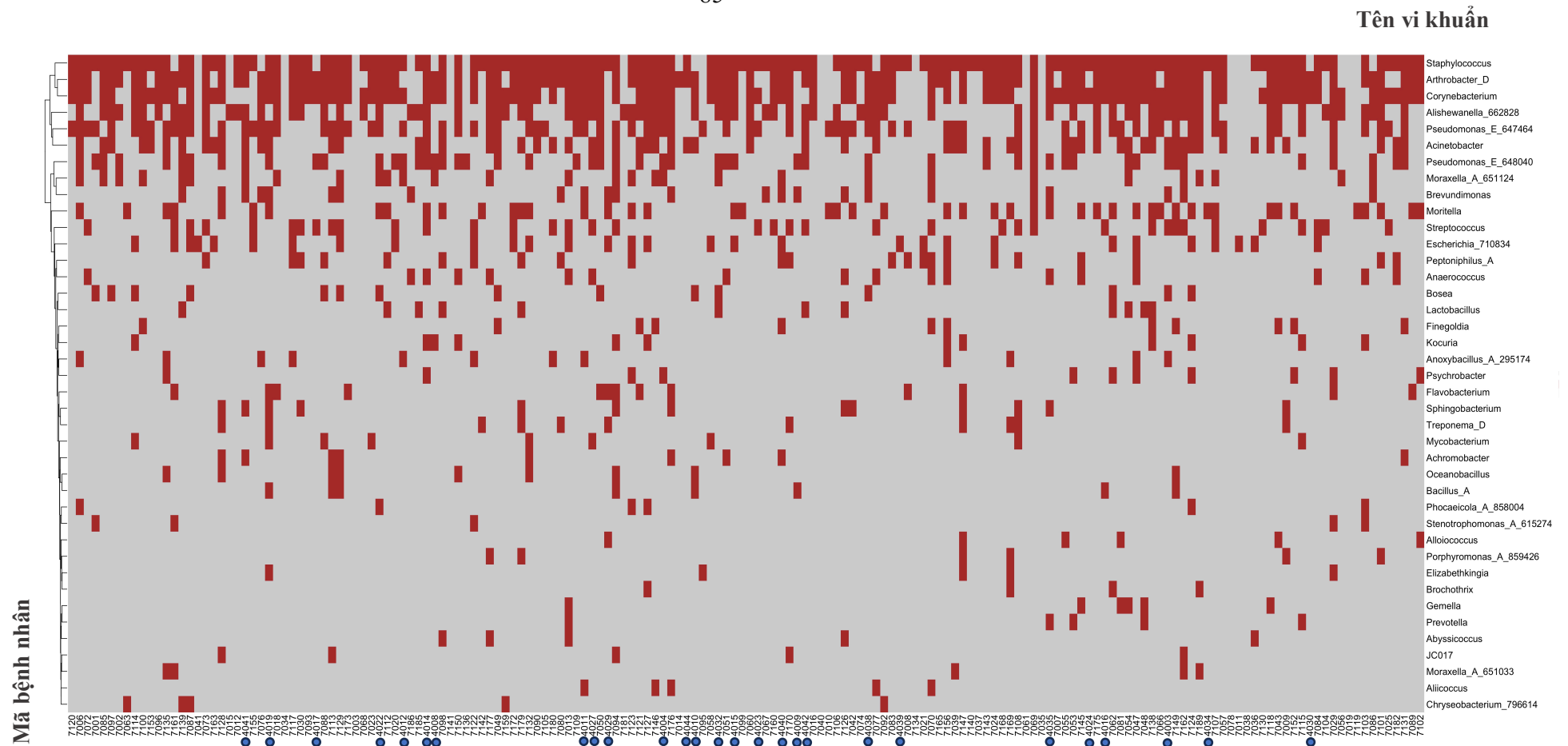
3.2.2.2. Thành phần vi sinh vật gây bệnh ở não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

Kết quả phân tích thành phần loài cho thấy ở mẫu máu có 52 chi của tác nhân gây bệnh được tìm thấy trên tổng số 71 mẫu máu của nhóm nhiễm trùng sơ sinh có kết quả giải trình tự 16S rRNA (hình 3.9). Trong đó có sự xuất hiện của *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* với tần xuất xuất hiện ở các mẫu chiếm tỷ lệ cao. Mẫu máu chỉ có ở bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh.



Hình 3.9. Tính đa dạng trong thành phần loài khi phân tích 16S rRNA ở mẫu máu của nhóm NTSS

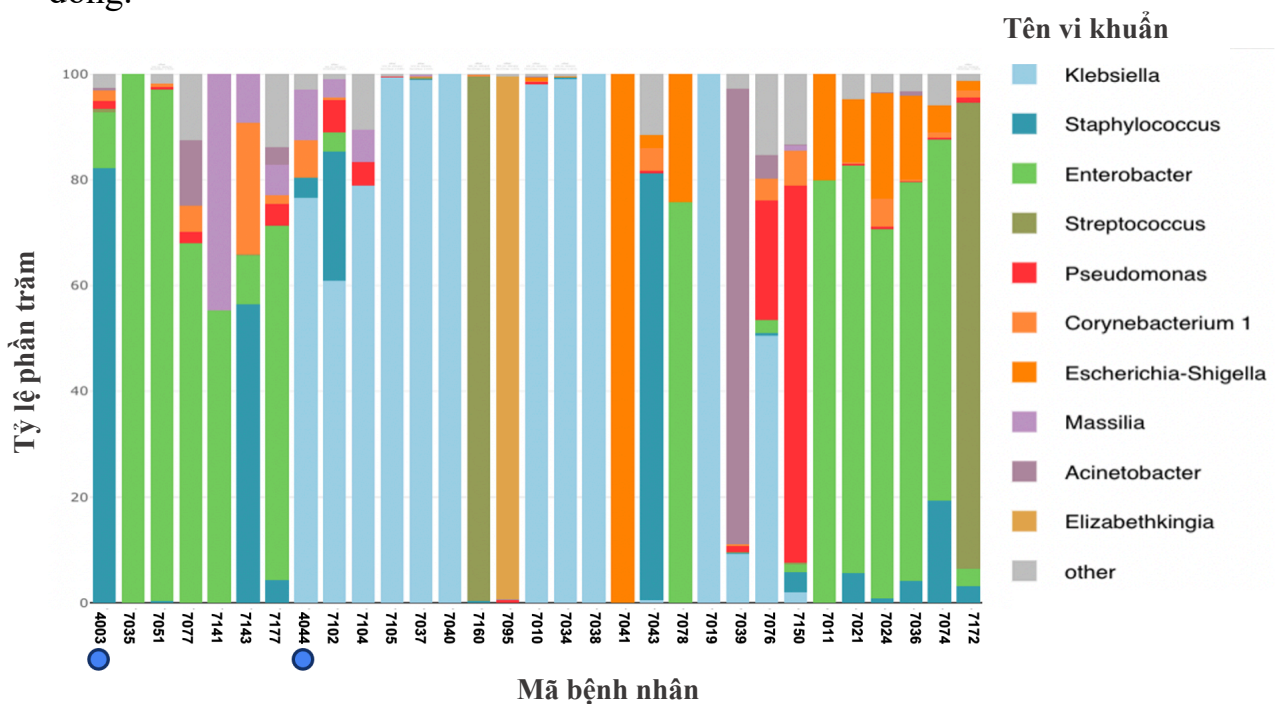
Chú thích: Trục tung là mã số bệnh nhân, trục hoành là tên vi khuẩn; Mỗi ô màu đỏ tương ứng với kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh trên mẫu bệnh phẩm máu. Ví dụ: kết quả giải trình tự 16S rRNA của mẫu máu của mã 7092 là có sự xuất hiện của vi khuẩn nhóm Streptococcus, Anaerococcus, Staphylococcus, Athrobacter_D và Corynebacterium.



Hình 3.10. Tính đa dạng trong thành phần loài khi phân tích 16S rRNA ở mẫu dịch não tủy của nhóm NTSS

Chú thích: Trục tung là mã số bệnh nhân, trục hoành là tên vi khuẩn; Mỗi ô màu đỏ tương ứng với kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh trên mẫu bệnh phẩm dịch não tủy; Chấm xanh là đại diện cho mẫu dịch não tủy của nhóm não ung thủy.

Kết quả phân tích 16S rRNA từ mẫu dịch não tủy có 126 chi vi khuẩn gây bệnh được phát hiện trên tổng số 172 mẫu dịch não tủy đạt đủ điều kiện phân tích. Trong đó, có 37 mẫu dịch não tủy thuộc nhóm não úng thủy có kết quả giải trình tự 16S rRNA, trên tổng số 41 mẫu. Các tác nhân xuất hiện trong nhóm não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh với tần suất nhiều là *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* và *Acinetobacter* (Hình 3.10). Có thể thấy thành phần vi sinh vật gây bệnh giữa hai nhóm máu và dịch não tủy khá tương đồng.

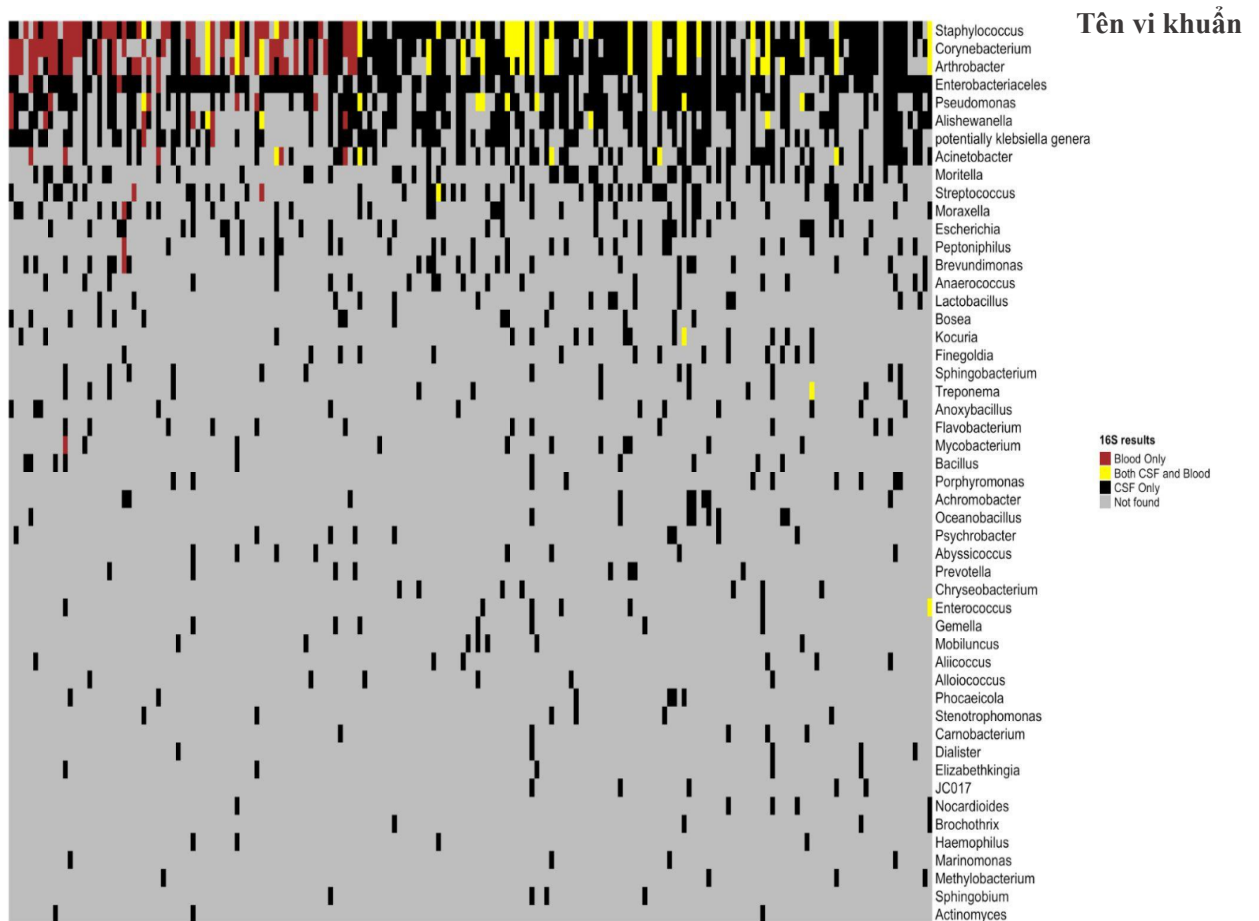


Hình 3.11. Phân bố tác nhân vi khuẩn nghi ngờ gây bệnh trong mẫu dịch não tủy

Hình 3.11 mô tả 31 trẻ sơ sinh phát hiện được tác nhân nghi ngờ gây bệnh trong mẫu dịch não tủy, trong số đó có 02 bệnh nhân não úng thủy và 19 bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh. Não úng thủy có hai tác nhân chiếm tỷ lệ cao là *Klebsiella* (gần 80%) ở bệnh nhân mã số 4044 và *Staphylococcus* (hơn 80%) ở bệnh nhân 4003. Các vi khuẩn nhóm *Klebsiella* và *Enterobacter* chiếm tỷ lệ nhiều nhất trong nhóm bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh. Kết quả giải trình tự 16S rRNA từ dịch não tủy của một số bệnh nhân phát hiện một loại tác nhân

duy nhất. Kết quả phân tích của bệnh nhân 7160 phát hiện vi khuẩn *Streptococcus*, bệnh nhân 7041 là vi khuẩn *Escherichia coli*, ở các bệnh nhân 7040, 7038 và 7019 là vi khuẩn *Klebsiella*.

Trong tổng số 300 mẫu máu và dịch não tủy từ bệnh nhân NTSS và NUT, 243 mẫu có kết quả phân tích 16S rRNA, cho tỷ lệ xét nghiệm chẩn đoán tác nhân gây bệnh là 81%. Bệnh nhân não úng thủy có kết quả giải trình tự 16S rRNA phát hiện vi khuẩn thuộc nhóm *Klebsiella* và *Staphylococcus* chiếm tỷ lệ cao. Các tác nhân nghi ngờ gây bệnh nhiễm trùng sơ sinh bao gồm vi khuẩn thuộc nhóm *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* và *Pseudomonas*.



Hình 3.12. So sánh thành phần loài giữa mẫu máu và dịch não tủy

Chú thích: các ô màu đỏ là kết quả 16S rRNA của mẫu máu, các ô màu đen là kết quả 16S rRNA mẫu dịch não tủy, các ô màu vàng là kết quả trùng lặp của 16S rRNA ở mẫu máu và dịch não tủy, các ô màu xám là không phát hiện tác nhân.

Theo hình 3.12, các chi vi khuẩn xuất hiện phổ biến trong mẫu bệnh phẩm máu và dịch não tủy là *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*. Các chi khác như *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* có ở cả hai mẫu bệnh phẩm nhưng ở mẫu dịch não tủy chiếm tỷ lệ nhiều hơn. Kết quả phân tích 16S rRNA trùng khớp giữa mẫu máu và dịch não tủy cho thấy sự lưu hành của tác nhân trong cơ thể bệnh nhân.

3.2.2. Ứng dụng giải trình tự RNA (RNA sequencing) trong phát hiện tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

Kết quả giải trình tự RNA lập hồ sơ hệ phiên mã bằng công nghệ giải trình tự sâu với 50 triệu lần đọc và sử dụng các công cụ phân tích dữ liệu đã đưa ra các tác nhân gây nên bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh. Nhóm nghiên cứu đã sử dụng *PathSeeker* là công cụ chính trong phân tích, sàng lọc dữ liệu metagenomics để khẳng định các tác nhân vi sinh vật xuất hiện trong máu và dịch não tủy.

Bảng 3.12. Thành phần vi rút, vi khuẩn trong mẫu máu (nhóm nhiễm trùng sơ sinh) sau phân tích giải trình tự RNA-seq

Mã mẫu	Tên chi	Tên phân loại
7011	Enterovirus	Enterovirus B
7013	Enterovirus	Enterovirus B
7028	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7028	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
7031	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7033	Enterovirus	Enterovirus B
7039	Enterovirus	Enterovirus B
7039	Muromegalovirus	Murid betaherpesvirus 1
7039	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7041	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>

Mã mẫu	Tên chi	Tên phân loại
7041	Enterovirus	Enterovirus B
7044	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7045	Enterovirus	Enterovirus B
7054	Enterovirus	Enterovirus B
7061	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus</i> sp. AK26
7063	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7070	Enterovirus	Enterovirus B
7072	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7076	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
7085	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7087	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7156	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
7076	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
7090	Enterovirus	Enterovirus B
7093	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
7096	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7097	Enterovirus	Enterovirus B
7100	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
7102	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7103	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7117	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
7124	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7126	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7126	Enterovirus	Enterovirus B
7127	Enterovirus	Enterovirus B
7129	Enterovirus	Enterovirus B

Mã mẫu	Tên chi	Tên phân loại
7129	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
7129	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7142	<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter hominis</i>
7142	<i>Oligella</i>	<i>Oligella urethralis</i>
7142	Enterovirus	Enterovirus B
7145	Enterovirus	Enterovirus B
7146	Enterovirus	Enterovirus B
7147	Enterovirus	Enterovirus B
7149	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
7151	Enterovirus	Enterovirus B
7154	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7156	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
7157	Enterovirus	Enterovirus B
7162	Enterovirus	Enterovirus B
7175	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
7175	Alphapapillomavirus	Alphapapillomavirus 6
7188	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>

Ghi chú: Mã bệnh nhân 7xxx: quy định cho nhóm nhiễm trùng sơ sinh.

Theo bảng 3.12, có thể thấy phương pháp giải trình tự RNA phát hiện các vi khuẩn gây bệnh phổ biến như *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Treponema palladium*, cũng như một số vi khuẩn khó có khả năng phát hiện bằng các phương pháp thông thường như *Orientia tsutsugamushi* và *Campylobacter hominis*. Trong số vi khuẩn có ở mẫu máu, *Klebsiella* chiếm tỷ lệ cao nhất với 10 mẫu, sau đó là *Orientia tsutsugamushi* với 7 mẫu, *Treponema palladium* có ở 3 mẫu, *Burkholderia cepacia* có 2 mẫu; ngoài ra còn có sự xuất hiện của vi khuẩn *Campylobacter hominis* và *Oligella urethralis* ở cùng một

mẫu máu. Các vi rút xuất hiện trong mẫu máu bao gồm Enterovirus B, Cytomegalovirus, Muromegalovirus và Alphapapillomavirus. Enterovirus chiếm số lượng nhiều nhất với 26 mẫu, tiếp sau là Cytomegalovirus với 5 mẫu, Murid betaherpesvirus 1 và Alphapapillomavirus 6 mỗi loại có một mẫu. Đáng lưu ý trong máu của bệnh nhân mã 7039 có hai loại vi rút là Enterovirus, Muromegalovirus và vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi*, bệnh nhân 7129 có hai vi khuẩn *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae* và Enterovirus B, một số bệnh nhân khác cũng có sự xuất hiện của hai loại vi rút hoặc hai loại vi khuẩn hoặc vi rút và vi khuẩn trong máu.

Bảng 3.13. Thành phần vi rút, vi khuẩn trong mẫu dịch não tủy sau phân tích RNAseq

Mã mẫu	Tên chi	Tên phân loại
<i>Nhóm Não úng thủy</i>		
4002	Enterovirus	Enterovirus B
4024	Simplexvirus	Human alphaherpesvirus 2
4037	Rotavirus	Rotavirus A
4041	Cytomegalovirus	Human betaherpesvirus 5
4041	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
4042	Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1
<i>Nhóm nhiễm trùng sơ sinh</i>		
7002	Enterovirus	Enterovirus B
7005	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
7006	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7009	Enterovirus	Enterovirus B
7011	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7011	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7013	Enterovirus	Enterovirus B

Mã mẫu	Tên chi	Tên phân loại
7014	Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1
7017	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
7019	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7019	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7024	Muromegalovirus	Murid betaherpesvirus 1
7025	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7026	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
7033	Enterovirus	Enterovirus B
7035	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
7035	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7038	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7038	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7040	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7040	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7041	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7041	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7045	Enterovirus	Enterovirus B
7047	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7050	Enterovirus	Enterovirus B
7052	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7052	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7054	Enterovirus	Enterovirus B
7062	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7067	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
7068	Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1
7070	Enterovirus	Enterovirus B

Mã mẫu	Tên chi	Tên phân loại
7071	Enterovirus	Enterovirus B
7077	Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1
7079	<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>
7079	<i>Lautropia</i>	<i>Lautropia mirabilis</i>
7087	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7089	Simplexvirus	Human alphaherpesvirus 2
7092	Cytomegalovirus	Human betaherpesvirus 5
7095	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Elizabethkingia anophelis</i>
7096	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7106	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7113	Enterovirus	Enterovirus B
7114	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7114	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7115	Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1
7119	Cytomegalovirus	Human betaherpesvirus 5
7124	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7126	Enterovirus	Enterovirus B
7127	Enterovirus	Enterovirus B
7127	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7132	Enterovirus	Enterovirus B
7132	Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1
7133	Cytomegalovirus	Human betaherpesvirus 5
7135	Rotavirus	Rotavirus A
7139	Muromegalovirus	Murid betaherpesvirus 1
7140	Enterovirus	Enterovirus B
7142	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

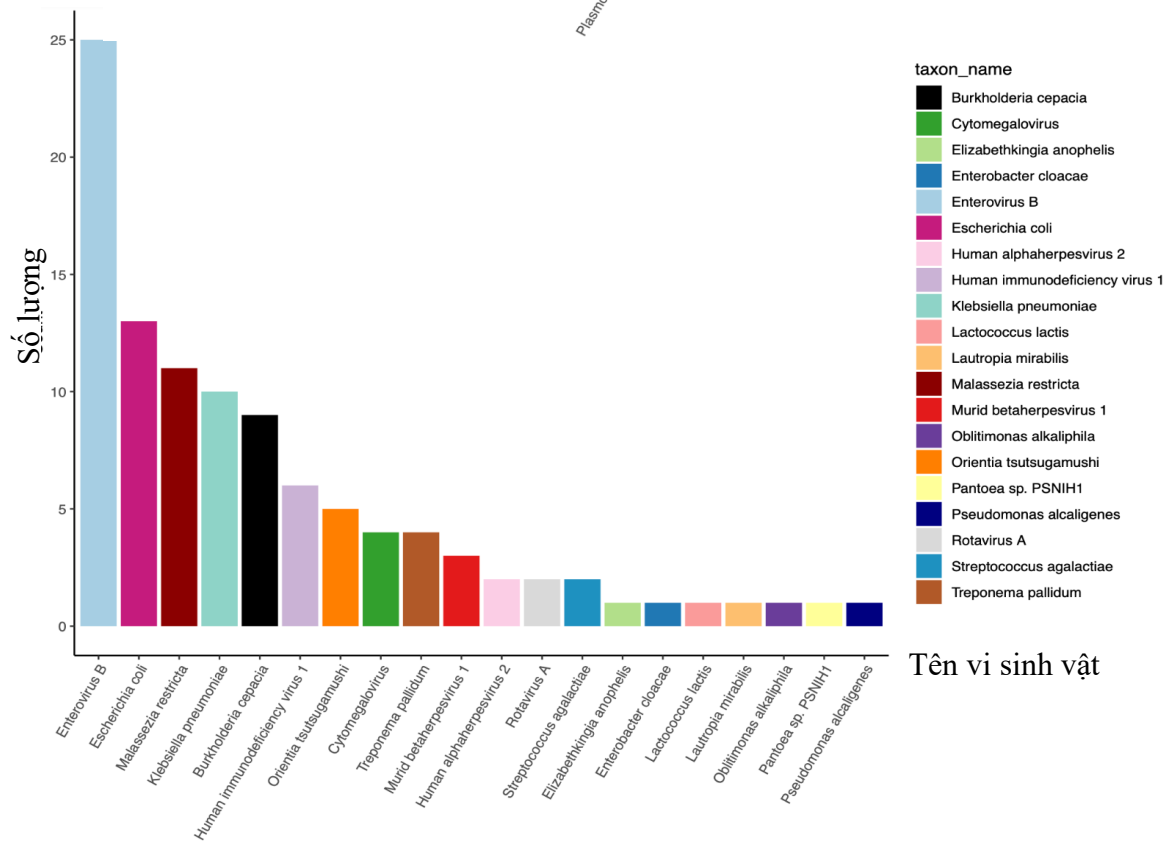
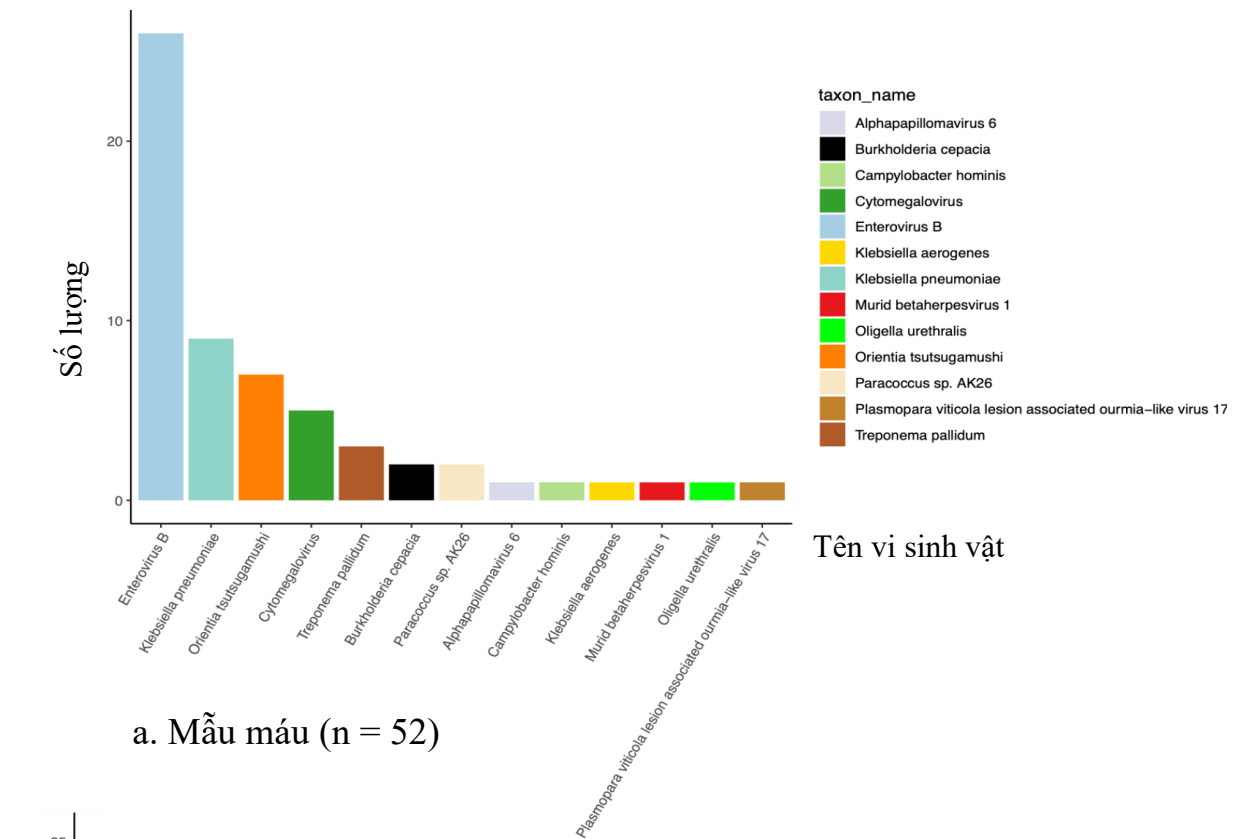
Mã mẫu	Tên chi	Tên phân loại
7142	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7145	Enterovirus	Enterovirus B
7148	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
7150	Enterovirus	Enterovirus B
7155	Enterovirus	Enterovirus B
7155	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
7157	Enterovirus	Enterovirus B
7159	Enterovirus	Enterovirus B
7160	Muromegalovirus	Murid betaherpesvirus 1
7162	Enterovirus	Enterovirus B
7165	Enterovirus	Enterovirus B
7172	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
7174	<i>Orientia</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
7178	Enterovirus	Enterovirus B
7179	Enterovirus	Enterovirus B
7180	Enterovirus	Enterovirus B
7182	Enterovirus	Enterovirus B
7184	Enterovirus	Enterovirus B

Ghi chú: Mã bệnh nhân 4xxx: quy định cho nhóm não úng thủy; Mã bệnh nhân 7xxx: quy định cho nhóm nhiễm trùng sơ sinh.

Khi phân tích kết quả giải trình tự RNA trong dịch não tủy theo thành phần nhóm vi sinh vật thì có nhóm vi khuẩn và vi rút. Đối với nhóm vi khuẩn, *Klebsiella pneumoniae* và *Escherichia coli* chiếm tỷ lệ nhiều hơn so với các vi khuẩn khác lần lượt là 10 và 13 mẫu. Vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* cũng xuất hiện trong mẫu dịch não tủy với 5 mẫu, *Treponema pallidum* xuất hiện ở 4 mẫu, *Streptococcus agalactiae* có ở 2 mẫu, *Elizabethkingia anophelis* và

Enterobacter cloacae chỉ có ở 1 mẫu. Hai vi khuẩn hiếm gặp *Lactococcus lactis* và *Lautropia mirabilis* cũng được khẳng định có sự xuất hiện trong mẫu dịch não tủy. Tác nhân Enterovirus B có phân bố nhiều nhất với 28 mẫu. Trong các tác nhân vi rút có sự xuất hiện của Human immunodeficiency virus 1 ở 06 bệnh nhân, Human betaherpesvirus 5 có ở 5 mẫu, tiếp sau đó là Murid betaherpesvirus 1 với 3 mẫu và Human alphaherpesvirus 2 cùng Rotavirus mỗi loại là 2 mẫu.

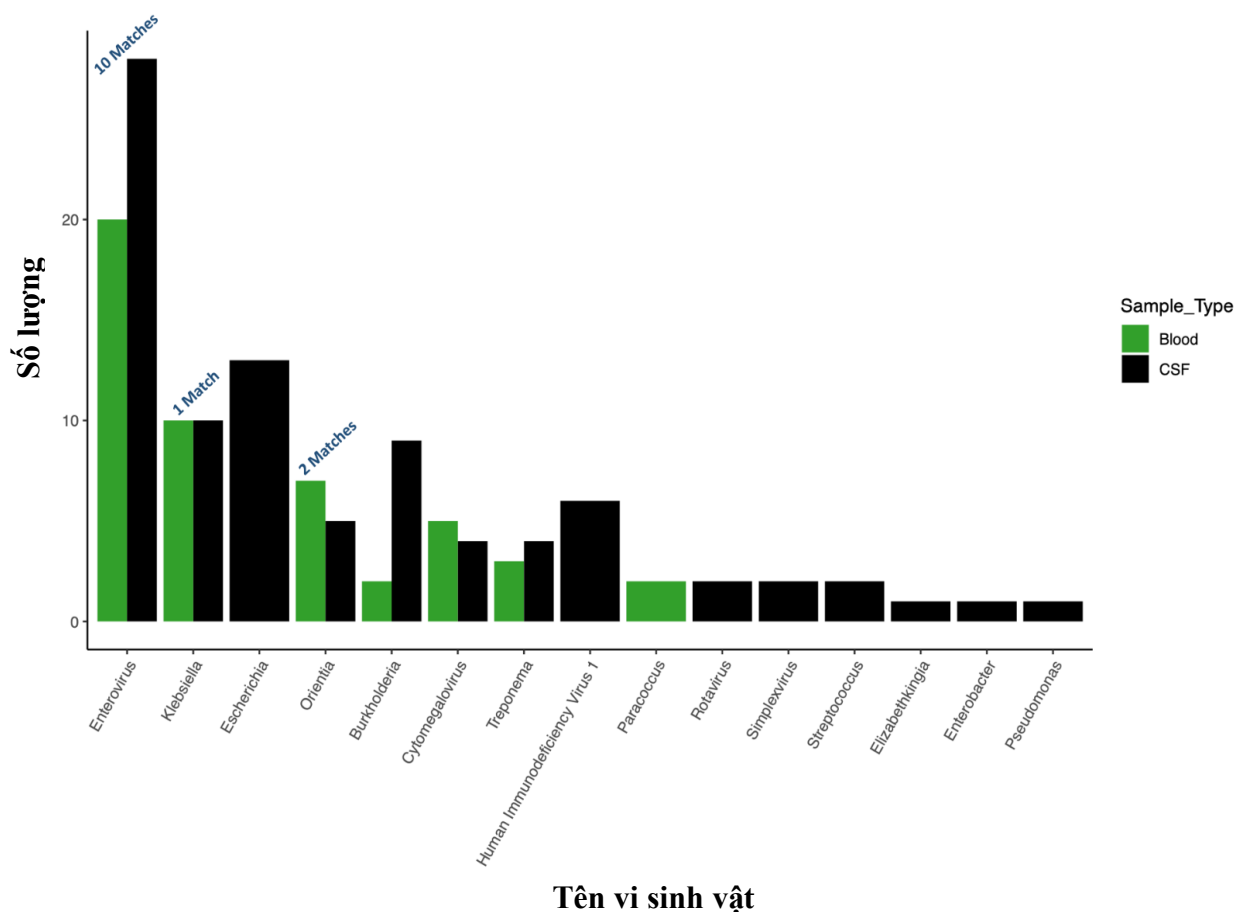
Kết quả giải trình tự RNA trong dịch não tủy được chia theo hai nhóm bệnh nghiên cứu là nhóm não úng thủy và nhóm nhiễm trùng sơ sinh. Ở nhóm não úng thủy, có 05 trên tổng số 41 mẫu dịch não tủy có kết quả giải trình tự RNA. Các vi sinh vật được phát hiện ở nhóm não úng thủy bao gồm Enterovirus B, Human alphaherpesvirus 2, Rotavirus A, Human immunodeficiency virus 1 (HIV 1), Human betaherpesvirus 5 và *Treponema palladium*. Trong đó ở mẫu bệnh phẩm 4041 có hai tác nhân là Human betaherpesvirus 5 và vi khuẩn *Treponema palladium*. Nhóm nhiễm trùng sơ sinh có thành phần vi sinh vật đa dạng hơn nhóm não úng thủy. Ngoài các tác nhân giống nhau, nhóm NTSS còn có vi khuẩn *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter cloacae*, *Orientia tsutsugamushi* và Murid betaherpesvirus 1.



Hình 3.13. Phân bố thành phần vi sinh vật trong mẫu máu (a) và mẫu dịch não tủy (b) sau phân tích giải trình tự RNA

Chú thích: (a), (b) là biểu đồ phân bố các vi sinh vật ở mẫu máu và dịch não tủy ở cả nhóm não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh. Trục tung là số lượng mẫu, trục hoành là tên vi sinh vật; Mỗi màu tượng trưng cho một loại vi sinh vật, thể hiện sự xuất hiện của vi sinh vật đó trong mẫu máu và dịch não tủy.

Hình 3.13 thể hiện sự phân bố các tác nhân được phát hiện bằng phương pháp giải trình tự RNA ở hai nhóm mẫu bệnh phẩm máu và dịch não tủy. Mẫu bệnh phẩm máu (hình 3.13. a) chỉ có ở nhóm nhiễm trùng sơ sinh nên có thể nói các vi sinh vật được phát hiện trong máu của bệnh nhi mắc nhiễm trùng sơ sinh, sự phân bố vi sinh vật được mô tả trong bảng 3.11 ở trên. Khi so sánh thành phần vi sinh vật giữa hai nhóm máu và dịch não tủy, có thể thấy thành phần khá tương đồng tuy nhiên ở dịch não tủy có số lượng lớn hơn.



Hình 3.14. So sánh thành phần tác nhân gây bệnh ở mẫu máu và mẫu dịch não tủy

Chú thích: Màu xanh: mẫu bệnh phẩm máu; Màu đen: mẫu dịch não tủy

Khi so sánh thành phần loài giữa mẫu máu và mẫu dịch não tủy qua phân tích RNA-seq được mô tả trong hình 3.14 cho thấy sự tương đồng trong phát hiện tác nhân gây bệnh. Một số vi sinh vật xuất hiện ở cả hai loại mẫu như vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, *Orientia tsutsugamushi* và *Treponema palladium*. Enterovirus xuất hiện đồng thời ở mẫu máu và dịch não tủy của 10 bệnh nhân, *Klebsiella* trùng khớp ở 1 bệnh nhân và *Orientia* trùng khớp ở hai bệnh nhân. Một số tác nhân như vi khuẩn nhóm *Escherichia*, *Streptococcus*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* và Human Immunodeficiency virus 1 (HIV 1), Rotavirus, Simplexvirus chỉ có ở trong mẫu dịch não tủy.

Trong tổng số 300 mẫu phân tích giải trình tự RNA, có 52 mẫu máu và 85 mẫu dịch não tủy đạt tiêu chuẩn và xác định được thành phần vi sinh vật gây bệnh. Phương pháp RNA-seq xác định được cả vi rút và vi khuẩn trong khi các phương pháp khác không thực hiện được. Tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh bằng phương pháp giải trình tự RNA (RNA-seq) là 45,7%.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân và một số tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

4.1.1. Một số đặc điểm của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh

Độ tuổi trung bình mắc NUT ở trẻ sơ sinh trong nghiên cứu là 4,0 tháng. Theo nghiên cứu của nhóm nhà khoa học Mỹ tại Uganda, tuổi mắc não úng thủy sau nhiễm trùng từ 1-3 tháng tuổi sau khi có dấu hiệu nhiễm trùng [182]. Trong một nghiên cứu khác, tuổi phát hiện não úng thủy trong khoảng 6 tháng tuổi và hiếm khi quan sát thấy được ở trẻ mới sinh [138]. Có thể thấy, tỉ lệ trẻ sinh non trong nhóm NUT là khá cao, chiếm 43,9%. Sinh non là một trong những nguyên nhân gây nên não úng thủy, cụ thể là não úng thủy sau xuất huyết não [89]. Theo tổng hợp của tác giả David và Linda, tỷ lệ trẻ sinh non đặc biệt là trẻ dưới 28 tuần có nguy cơ bị xuất huyết não thất là 20-30%, và đến 50% trẻ này có nguy cơ phát triển thành não úng thủy [171]. Sự phân bố của bệnh nhi não úng thủy rải rác các tỉnh phía bắc và tỷ lệ ở nông thôn (68,3%) cao hơn ở thành thị (hình 3.1). Các nghiên cứu về não úng thủy sơ sinh tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào đặc điểm lâm sàng và các kỹ thuật phẫu thuật thần kinh, số liệu phân bố địa lý của bệnh nhân hiện chưa có thông kê cụ thể. Tỷ lệ tử vong ca bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi (7,3%) nằm trong khoảng 4%-87% theo báo cáo của Dewan và cộng sự [131]. Ba bệnh nhi não úng thủy tử vong đều là trẻ sinh non và có các bệnh kèm theo như suy hô hấp, giãn não thất và viêm màng não. Theo báo cáo tại Trung Quốc, trẻ sinh non có nguy cơ mắc não úng thủy và não úng thủy từ trong bào thai cũng có thể là nguyên nhân gây ra sinh non, và tỷ lệ trẻ nhẹ cân và sinh non trong nghiên cứu này là gần 33% [238]. Khi phân tích nhóm bệnh nhân NTSS, cũng giống như ở nhóm NUT, tỷ lệ bé trai mắc cao hơn bé gái, kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trong nước [4, 7, 9]. Phân bố địa lý của bệnh nhân chủ yếu ở khu vực phía Bắc, do

Bệnh viện Nhi Trung ương là bệnh viện tuyến Trung ương nên hầu hết các trường hợp bệnh nhân nặng sẽ được chuyển về đây. Đặc điểm phân bố về cân nặng, tuổi thai của 142 trẻ, tỷ lệ sinh đủ tháng (tuổi thai từ 37 tuần trở lên) chiếm tỷ lệ 61,3% và có nguy cơ mắc NTSS cao hơn. Nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Shehab El-Din và cộng sự, theo nghiên cứu này trong tổng số 304 bệnh nhân được chẩn đoán nhiễm trùng sơ sinh thì trẻ có tuổi thai từ 37 tuần trở lên có tỷ lệ NTSS cao nhất [215]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 12 trường hợp tử vong cho tỷ lệ tử vong ca bệnh là 8,5%. Theo nghiên cứu của nhóm nhà khoa học Singapore, tỷ lệ tử vong ca bệnh của NTSS chung là 18%, ở các nước nghèo là 25%, các nước thu nhập trung bình là 25% [57]. Đề tài của chúng tôi thực hiện trong giai đoạn ngắn với số lượng mẫu chỉ ở Bệnh viện Nhi Trung ương nên có thể tỷ lệ tử vong ca bệnh không mang tính đại diện cho khu vực hay quốc gia. Trong số trẻ tử vong, 50% là trẻ sinh non và nhẹ cân. Theo nghiên cứu về nguyên nhân ảnh hưởng đến tỷ lệ tử vong do NTSS, tỷ lệ tử vong ở trẻ NTSS có cân nặng khi sinh $<1\ 500\text{ g}$ là 50%, 23,8% ở những trẻ có cân nặng khi sinh $1\ 500\text{--}2\ 500\text{ g}$ và 18,2% ở những trẻ có cân nặng khi sinh từ 1.500 g trở lên. $>2\ 500\text{ g}$ [99]. Điều này chứng minh được sinh non và nhẹ cân là một yếu tố nguy cơ của NTSS.

Kết quả xét nghiệm kháng thể của vi rút Cytomegalo (CMV) và vi rút hợp bào hô hấp A (RSV A) được phát hiện ở cả nhóm bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh. Ở nhóm não úng thủy, trong số 02 bệnh nhân có kết quả CMV IgG dương tính thì có 01 bệnh nhân được xét nghiệm realtime PCR mẫu dịch não tủy cho CMV và có kết quả dưới 1000 copy/ml. Hai bệnh nhân này đều sinh thường và có biểu hiện viêm màng não – não úng thủy. Tuy nhiên không thể khẳng định chắc chắn CMV là tác nhân chính gây nên não úng thủy ở hai trẻ này. Ở nhóm nhiễm trùng sơ sinh, có 03 bệnh nhân có kết quả xét nghiệm realtime PCR cho CMV trên tổng số 23 bệnh nhân xét nghiệm CMV IgG/IgM dương tính. Trong số đó, 02 bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng viêm màng não vào não úng thủy, còn 01 bệnh nhân có triệu chứng viêm phổi mãn

tính. Tuy nhiên cũng không thể khẳng định chắc chắn CMV là tác nhân gây bệnh chính ở các trường hợp này. Vi rút Cytomegalo (CMV) gây nên nhiễm trùng sơ sinh, đặc biệt gây mất thính lực ở trẻ em. CMV có thể lây truyền từ mẹ sang con trong quá trình sinh nở, hoặc cho bú [197]. Phát hiện kháng thể của vi rút CMV ở giai đoạn đầu cũng chưa thể khẳng định được là nhiễm bệnh hay do kháng thể từ mẹ sang [195]. Một nghiên cứu đã chỉ ra rằng CMV IgM chỉ cho độ nhạy 48,8% với nhóm trẻ có triệu chứng nhiễm bệnh và 22,1% ở nhóm trẻ không có triệu chứng bệnh [116], điều này cho thấy độ nhạy và độ chính xác của phương pháp phát hiện kháng nguyên và kháng thể là thấp. Do vậy, để khẳng định tác nhân là CMV thì cần phải tiến hành phương pháp PCR. Vi rút RSV A được phát hiện qua phản ứng test nhanh, kỹ thuật này có độ nhạy thấp, theo nghiên cứu thì độ nhạy của test nhanh RSV A là 75,3% [37, 85]. Điều này cho thấy rằng mặc dù âm tính giả không phải là hiếm, nhưng kết quả dương tính có thể làm tăng độ tin cậy trong chẩn đoán và có thể hỗ trợ việc ra quyết định, như giảm khả năng kê đơn kháng sinh không phù hợp. Thêm vào đó vi rút hợp bào hô hấp RSV A thông thường sẽ đồng nhiễm với vi khuẩn để tấn công hệ hô hấp của người bệnh. Trong nghiên cứu của chúng tôi, một bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh có kết quả dương tính với RSV A bằng test nhanh và dương tính với *Streptococcus pneumoniae* qua xét nghiệm PCR. Điều này phù hợp với luận điểm nghiên cứu vi rút hợp bào hô hấp A (RSV A) thường xuất hiện cùng vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* gây tổn thương cho đường hô hấp như phế quản, phổi của trẻ sơ sinh [51]. Thông thường, phản ứng xét nghiệm kháng thể CMV và HSV 1+2 thường thực hiện ở phụ nữ có thai để kiểm soát nhiễm bệnh. Vi rút CMV và HSV có khả năng lây truyền từ mẹ sang con với tỷ lệ từ 30-50% [217]. Theo nghiên cứu của Kristin Liermann và cộng sự, đã điều tra việc phát hiện nhiễm trùng nguyên phát và kết luận rằng công cụ huyết thanh HSV IgM không nên được sử dụng để đưa ra quyết định điều trị kháng vi-rút HSV, nhưng với phản ứng HSV 1+2 IgG thì nhóm tác giả đánh giá độ nhạy là từ 91-96% [170]. Do vậy, nếu kết quả HSV 1+2 IgG là dương

tính thì có thể hỗ trợ bác sĩ trong đánh giá điều trị bệnh nhân. Vi rút EBV thường được sàng lọc cho phụ nữ mang thai và có nguy cơ truyền từ mẹ sang con. Phản ứng của EBV-VCA IgG được đánh giá là khá nhạy với 86,27% [125]. Vì thế phương pháp này có thể dùng để sàng lọc mẫu bệnh phẩm nghi ngờ. *Treponema pallidum* TPHA cũng thường dùng trong các trường hợp nghi ngờ giang mai hoặc ở trẻ nhỏ nếu nghi ngờ giang mai lây truyền từ mẹ. Phản ứng *Treponema pallidum* TPHA/TPPA được Tổ chức y tế thế giới đánh giá với độ nhạy từ 84,5%-97,7% [211]. Độ nhạy của phản ứng kháng Rubella IgG được đánh giá cao từ 98-99% [132] do vậy khi phản ứng dương tính tức là có sự xuất hiện của vi rút này ở bệnh nhân, tuy nhiên vẫn cần phải theo dõi và kiểm tra thường xuyên mới khẳng định được là bẩm sinh hay mắc phải. Với phản ứng kháng *Toxoplasma* IgG cũng tương tự, độ nhạy của phản ứng là 89,7%-100% khi thử trên mẫu chuẩn [88] nên kết quả dương tính là đáng tin cậy. Các kết quả xét nghiệm trên đều có độ nhạy khá cao, tuy nhiên, với các xét nghiệm này thì chỉ có thể nói rằng bệnh nhân có dấu ấn của các vi khuẩn và vi rút này chứ chưa thể khẳng định chắc chắn đây là các căn nguyên chính gây nên bệnh do đặc tính của kháng thể có thể truyền từ mẹ sang con. Đặc biệt với các chẩn đoán về giang mai bẩm sinh hay mắc phải, cần có sự theo dõi với trẻ sơ sinh mới có thể đưa ra kết luận [146].

4.1.2. Một số căn nguyên gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy và PCR đa môi

Kết quả nuôi cấy và PCR đa môi trong nghiên cứu này được thu thập từ bệnh án của bệnh nhân. Các kết quả này được thực hiện dựa trên chỉ định của bác sĩ lâm sàng để tìm ra các căn nguyên cơ bản gây NTSS và NUT. Do vậy không phải tất cả các bệnh nhân đều có kết quả PCR. Cho đến nay, nuôi cấy vi khuẩn vẫn là chuẩn vàng trong xác định tác nhân gây bệnh, PCR được ứng dụng để khẳng định kết quả nuôi cấy và xác định thêm các tác nhân vi rút, nấm hoặc ký sinh trùng.

Phương pháp nuôi cấy giúp phát hiện tác nhân gây NTSS với tỷ lệ là 14,8%, tỷ lệ này sắp xỉ nghiên cứu tại Bhutan (14%) [162], Trung Quốc (13,5%) [73] và thấp hơn so với nghiên cứu tại Nam Ấn Độ [84], nghiên cứu tại Syria (19,29%) [187]. Các vi khuẩn phân lập được từ kết quả nuôi cấy là các vi khuẩn phổ biến gây NTSS, bao gồm: Vi khuẩn Gram âm: *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* và *Elizabethkingia meningoseptica*; Vi khuẩn Gram dương: *Staphylococcus aureus*. Nghiên cứu của Okomo và cộng sự tại Châu Phi cận Sahara báo cáo tỷ lệ nuôi cấy máu dương tính với các vi khuẩn *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* và *Pseudomonas* ở bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh là 38% và với *Staphylococcus aureus* là 25% [193]. Cũng trong bài báo này, *Streptococcus* nhóm B lại có tỷ lệ phân lập được cao nhất với 25%, theo sau là *K. pneumoniae* và *E. coli* [193]. Điều này khác với nghiên cứu của chúng tôi, *K. pneumoniae* có tỷ lệ phân lập cao nhất (7,7%), và phần lớn xuất hiện ở trẻ có cân nặng dưới 2500g. Trong khi đó, một nghiên cứu khác tương đối tương đồng với kết quả của chúng tôi, báo cáo của Majid Malaki chỉ ra rằng tỷ lệ *K. pneumoniae* nuôi cấy dương tính là 6% và tập trung chủ yếu ở nhóm trẻ nhẹ cân dưới 2500g [177]. Kết quả điều tra tại Ấn Độ, *K. pneumoniae* là tác nhân chính gây nên nhiễm trùng sơ sinh và cũng thuộc nhóm vi khuẩn kháng kháng sinh nhiều nhất [103]. *E. coli* là vi khuẩn được phân lập với tỷ lệ cao thứ hai. Những năm gần đây, *E. coli* gây NTSS được lưu ý do gây tỷ lệ tử vong cao. Theo báo cáo tại Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2022 về NTSS ở trẻ sơ sinh đủ tháng, *E. coli* là tác nhân gây nên tử vong sơ sinh cao nhất [17]. *Enterobacter cloacae* cũng là vi khuẩn trong nhóm vi khuẩn nhiễm trùng bệnh viện và được cho là nguyên nhân gây nên các vụ nhiễm trùng tại các khu vực chăm sóc sơ sinh [126]. Vi khuẩn này có tỷ lệ lây nhiễm cao ở trẻ sơ sinh nhẹ cân và sinh non thuộc nhóm nhiễm trùng sơ sinh khởi phát sớm [120]. Trong nghiên cứu này, *Burkholderia cepacia* phân lập từ nuôi cấy máu với tỷ lệ 1,7%. Vi khuẩn *B. cepacia* có liên quan đến sự suy giảm nhanh chức năng phổi, tăng tỷ lệ tử vong và “hội chứng

cepacia”, có biểu hiện như sốt, viêm phổi hoại tử tiến triển nhanh và nhiễm trùng huyết [216, 220]. Vi khuẩn này có thể phân lập trong môi trường bệnh viện do khả năng tồn tại ở môi trường khử trùng. Đây là vi khuẩn cơ hội, sẽ tấn công vào cơ thể khi bị suy giảm miễn dịch. *Acinetobacter baumannii* được ghi nhận với tỷ lệ nuôi cấy máu dương tính ở bệnh nhân NTSS là 8 - 22% và được đánh giá thuộc nhóm 3 vi khuẩn chính gây NTSS cùng với *Klebsiella* spp. và *E. coli* [176]. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận sự xuất hiện của *A. baumannii* trong hai loại mẫu bệnh phẩm khi nuôi cấy, nuôi cấy máu dương tính chỉ có 1 mẫu trên tổng số 117 mẫu máu. Rất nhiều các vi khuẩn như *Acinetobacter iwoffi*, *Enterobacter aerogenes*, *Stenotrophomonas maltophilia* là tác nhân gây nhiễm trùng sơ sinh nhưng tỷ lệ phân lập được trong nuôi cấy là rất thấp ở nghiên cứu này. Vi khuẩn *Elizabethkingia meningoseptica* cũng có tỷ lệ nuôi cấy máu thấp nhưng xuất hiện trong cả hai loại mẫu bệnh phẩm (máu, dịch não tủy). *Elizabethkingia meningoseptica* gây tỷ lệ tử vong cao ở NTSS từ 23-52% một phần do đặc tính kháng kháng sinh của vi khuẩn [163]. *Staphylococcus aureus* là vi khuẩn Gram dương phân lập được từ mẫu máu của 02 trẻ sơ sinh trong đó có một trẻ tử vong. Hai bệnh nhân này đều thuộc nhóm NTSS khởi phát muộn, nhưng trẻ tử vong thuộc có cân nặng sơ sinh dưới 2500g và thuộc khu vực miền núi. Trong nghiên cứu của chúng tôi, *S. aureus* là vi khuẩn Gram dương chiếm tỷ lệ cao ở NTSS khởi phát muộn. Theo nghiên cứu tại Úc, vi khuẩn *S. aureus* gây NTSS và chiếm 70% tỷ lệ ở NTSS khởi phát muộn [212]. Một nghiên cứu khác tại Ả rập Saudi ghi nhận *S. aureus*, *Klebsiella* và *Pseudomonas aeruginosa* là các vi khuẩn thuộc nhóm NTSS khởi phát muộn. [110]. Tác giả Nguyễn Thị Ngọc Tú thực hiện nghiên cứu tại Bệnh viện Nhi Trung ương đã báo cáo *S. aureus* chiếm tỷ lệ cao nhất ở NTSS khởi phát muộn [17]. Tuy nhiên, trong báo cáo của Hà Đức Dũng tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương năm 2019, *S. aureus* lại xuất hiện phổ biến ở NTSS khởi phát sớm [9]. Có thể do tính chất đặc trưng của từng bệnh viện nên tỷ lệ này khác nhau. Bên cạnh các vi khuẩn gây bệnh được phân lập, nấm *Candida* spp. cũng là tác nhân gây nhiễm trùng

sơ sinh phổ biến ở nhóm NTSS khởi phát muộn, đặc biệt trẻ sơ sinh có thời gian nằm viện lâu thì nguy cơ nhiễm bệnh cao hơn [112, 191].

Trong nghiên cứu này, kết quả xét nghiệm PCR cho dịch não tủy và máu ở cả hai nhóm NTSS và NUT đều có sự xuất hiện của Cytomegalovirus (CMV). Theo nghiên cứu của Sara Mansfield và cộng sự, CMV xuất hiện có liên quan đến NTSS do vi khuẩn, khi cơ thể bị suy giảm miễn dịch [77]. Sự có mặt của CMV có hai mặt trái ngược, một mặt CMV làm tăng cường kích hoạt đại thực bào giúp chống lại vi khuẩn gây NTSS, mặt khác việc gây phản ứng viêm quá mức có thể dẫn đến sốc NTSS gây tử vong [77]. CMV còn tấn công hệ thần kinh và gây nên mất thính lực ở trẻ. CMV có thể lây truyền từ mẹ sang con trong quá trình sinh nở, hoặc cho bú [197]. Trong nghiên cứu này, một số bệnh nhi có kết quả miễn dịch tự động dương tính với CMV IgG/IgM tuy nhiên không thể khẳng định đó là tác nhân gây bệnh. Nghiên cứu của Ehab Abd Elmoniem Albanna và cộng sự đã so sánh giữa phương pháp tìm CMV IgM và chạy PCR cho CMV ở nhóm bệnh nhân sơ sinh nghi ngờ mắc CMV, kết quả CMV IgM cho độ nhạy 63,2% và PCR cho CMV có độ nhạy là 100% [32]. PCR vẫn là phương pháp cho kết quả chính xác nhất. Trong nghiên cứu gần đây tại Uganda, PCR phát hiện CMV đồng nhiễm với vi khuẩn *Paenibacillus* gây não úng thủy ở trẻ sơ sinh [83]. Enterovirus chỉ xuất hiện trong mẫu dịch não tủy ở cả hai nhóm NTSS và NUT, điều này cho thấy sự tồn tại của Enterovirus trong hệ thống thần kinh trung ương ở trẻ sơ sinh và là nguyên nhân gây nên viêm não, viêm màng não hoặc não úng thủy [87, 229]. Nghiên cứu ở Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2016-2019 cũng chỉ ra CMV, Enterovirus và HEV nằm trong số các tác nhân gây viêm não, viêm màng não ở trẻ [20]. Viêm gan E ở trẻ sơ sinh thường là do lây truyền từ mẹ sang con với tỷ lệ từ 30-100% [167] hoặc lây truyền do môi trường sống ô nhiễm. PCR phát hiện viêm gan E có thể hỗ trợ đưa ra phương hướng điều trị phù hợp với bệnh nhân. Phương pháp PCR cũng chẩn đoán được bệnh nhân nhiễm *Streptococcus pneumoniae* (phế cầu), là một tác nhân “bị lãng quên” của nhiễm

trùng sơ sinh. Thông thường, khi nhắc đến vi khuẩn thuộc nhóm này gây bệnh NTSS người ta thường nghĩ đến *Streptococcus agalactia*. Trong nghiên cứu này, nuôi cấy máu cũng phát hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* ở bệnh nhân NTSS. Một số báo cáo gần đây đã cho thấy sự xuất hiện của *S. pneumoniae* ở trẻ sơ sinh thuộc giai đoạn NTSS khởi phát sớm, tại Nhật Bản ghi nhận trường hợp bé trai 38 tuần tuổi nhiễm vi khuẩn này [237], tại Sri Lanka cũng ghi nhận hai trường hợp trẻ sơ sinh mắc phải phế cầu [148]. Theo nghiên cứu ở Thụy Điển, tuy *S. pneumoniae* xuất hiện ít ở nhóm NTSS nhưng lại gây tỷ lệ tử vong rất cao (50%) [207]. Tuy nhiên, sự phát triển của vắc xin đã giúp giảm tỷ lệ lây nhiễm vi khuẩn này ở trẻ em. Phương pháp PCR đa môi trường chẩn đoán tác nhân gây bệnh được ứng dụng ở Bệnh viện Nhi trung ương đã giúp phát hiện rất nhiều tác nhân bổ sung cho phương pháp nuôi cấy truyền thống, ví dụ như các tác nhân vi rút. Tuy nhiên, giới hạn của phương pháp này là thời gian, số lượng mẫu, sinh phẩm và chỉ xác định được các tác nhân phổ biến đã biết do vậy kỹ thuật này thường thực hiện khi có chỉ định của bác sĩ khi có nghi ngờ thông qua chẩn đoán lâm sàng. Trong nghiên cứu này, số lượng bệnh nhân được chỉ định thực hiện xét nghiệm PCR phát hiện tác nhân gây bệnh ở nhóm bệnh nhân NUT là 5/41 (chỉ có dịch não tủy), và ở nhóm NTSS là 23/284 (bao gồm cả mẫu máu và dịch não tủy).

4.2. Xác định tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh bằng 16S rRNA và RNA-seq

Khi phân tích trình tự 16S rRNA ở hai nhóm bệnh nhân và trên 2 loại mẫu máu, dịch não tủy cho thấy thành phần vi sinh vật gây bệnh đa dạng hơn so với hai phương pháp nuôi cấy và PCR đa môi. Các tác nhân phổ biến như *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia* đều được phát hiện qua nuôi cấy, PCR đa môi và 16S rRNA. *Klebsiella pneumoniae* là tác nhân gây NTSS rất phổ biến, nghiên cứu của nhóm tác giả Somaya M. Desouky (Ai Cập) đã đưa ra kết quả tương tự khi so sánh giữa nuôi cấy và phân tích 16S

rRNA [130]. Phương pháp giải trình tự 16S rRNA là một phương pháp hiệu quả để phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây NTSS và NUT, đặc biệt là các tác nhân ít phổ biến. Trong nghiên cứu này, *Treponema pallidum* và *Orientia tsutsugamushi* được xác định qua phân tích 16S rRNA trong khi nuôi cấy hay PCR đa môi trường không phát hiện được *Treponema pallidum*, thông thường được xác định qua xét nghiệm tìm kháng thể giang mai đặc hiệu *Treponema pallidum* TPHA (TPHA - *Treponema pallidum* haemagglutination assay) dựa trên nguyên lý ngưng kết hạt gelatin/hồng cầu [111]. Tuy nhiên phản ứng này không thể khẳng định là vi khuẩn là tác nhân gây bệnh hay do truyền từ mẹ mang bệnh sang. Thông thường phải sau 12 tháng đến 18 tháng mới khẳng định được *Treponema pallidum* thực sự là tác nhân gây bệnh không [154]. Với kết quả 16S rRNA, có thể khẳng định chắc chắn các trường hợp mắc giang mai ở trẻ. Vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* khó nuôi cấy và bị giới hạn về chẩn đoán xét nghiệm bằng phương pháp PCR [12]. Do vậy, 16S rRNA là hướng đi mới cho kết quả chính xác và tăng hiệu quả chẩn đoán bệnh. Tuy nhiên, kết quả phân tích phương pháp 16S rRNA mới chỉ phát hiện được các vi khuẩn gây bệnh, trong khi đó vi rút cũng là tác nhân phổ biến gây NUT và NTSS.

Phương pháp RNA-seq cho thấy tính ưu việt trong phát hiện đồng thời các tác nhân vi rút và vi khuẩn gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh. RNA-seq xác định được tỷ lệ vi sinh vật trong mẫu máu là 52/117 mẫu tương đương 44,4%. Tỷ lệ này ở mẫu dịch não tủy là 46,4% (tương đương 85/183 mẫu). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Lu Chen và cộng sự khi nghiên cứu ở 168 sơ sinh nghi ngờ nhiễm trùng, tỷ lệ phát hiện tác nhân trong mẫu dịch não tủy là 44,8% [121], tuy nhiên tỷ lệ dương tính ở mẫu máu của nghiên cứu này cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Khi đánh giá về tính đa dạng thành phần vi sinh vật trong quần thể, nhóm nghiên cứu của Lu Chen đã chẩn đoán ba tác nhân phổ biến ở nhiễm trùng sơ sinh là *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* và *Streptococcus pneumoniae*, kết quả này hoàn

toàn tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi. Các nghiên cứu ở các nước trên thế giới như Trung Quốc, Ấn Độ, và Ai Cập đã chứng minh *K. pneumoniae* và *E.coli* gây nhiễm trùng sơ sinh và là vi khuẩn đa kháng, cụ thể vi khuẩn này kháng carbamenem [104, 133, 145, 181, 203, 240]. Thành phần vi rút khi phân tích RNA-seq cũng đa dạng, bao gồm Enterovirus, Cytomegalovirus, Human immunodeficiency virus 1, Human betaherpesvirus 5, Human alphaherpesvirus 2 và Rotavirus. Georges Pius và cộng sự đã tổng hợp số liệu và ghi nhận Herpes simplex virus (HSV), Enterovirus và Rotavirus là các tác nhân vi rút gây nhiễm trùng sơ sinh [144]. Một nghiên cứu khác thực hiện tại Việt Nam sử dụng kỹ thuật giải trình tự gene mNGS để phân tích mẫu bệnh phẩm từ 386 bệnh nhân nghi ngờ nhiễm trùng huyết, cũng chỉ ra Enterovirus, Cytomegalovirus và Rotavirus là vi rút phổ biến gây nên nhiễm trùng huyết [34]. Human immunodeficiency virus 1 là vi rút có khả năng lây nhiễm từ mẹ sang con trong quá trình sinh nở và chăm sóc [122]. Bệnh nhân tham gia nghiên cứu này có 77/183 trẻ có xét nghiệm test nhanh với HIV, tất cả đều âm tính. Phản ứng test nhanh HIV tương đối nhạy trong việc phát hiện người nhiễm. Việc phát hiện HIV-1 bằng RNA-seq ở 6 bệnh nhân cho thấy thiếu sót trong quá trình sàng lọc bệnh nhân sơ sinh. Human betaherpesvirus 5 còn được gọi là Human cytomegalovirus (HCMV) [233] có thể tấn công các loại tế bào trong cơ thể, đặc biệt là hệ thống thần kinh. Vi rút này có thể gây nên mất thính giác, ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ thần kinh và cũng là một tác nhân gây nên bệnh tự kỷ ở trẻ em. Human alphaherpesvirus 2 hay HSV-2 thuộc nhóm Human alphaherpesvirus và là vi rút lây từ mẹ sang con trong quá trình sinh nở [161]. Vi rút này có thể tấn công hệ thần kinh trung ương và gây viêm não ở trẻ sơ sinh [166].

Phương pháp 16S rRNA và RNA-seq đều sử dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới để phát hiện tác nhân gây bệnh, tuy nhiên 16S rRNA chỉ xác định được các tác nhân có nguồn gốc vi khuẩn. Hiện nay, phương pháp 16S rRNA

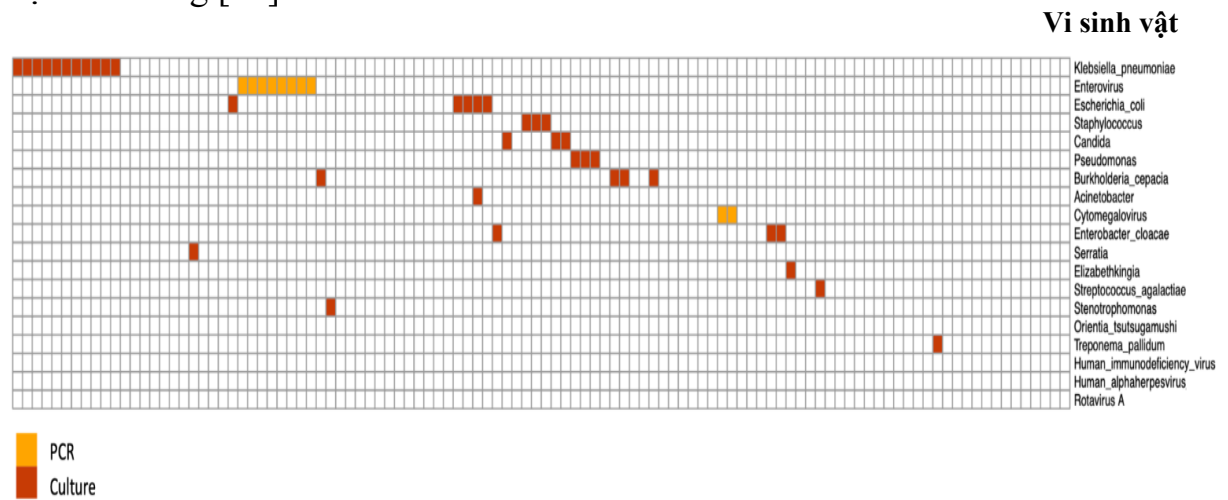
đang được ứng dụng trên thế giới trong việc phát hiện tác nhân gây bệnh trong khi RNA-seq chưa được phổ biến trong chẩn đoán lâm sàng mà chỉ thực hiện trong các nghiên cứu. Phương pháp giải trình tự 16S rRNA được ứng dụng thành công trong phát hiện tác nhân gây bệnh não úng thủy tại Uganda là *Paenibacillus* spp. [83]. Nghiên cứu sử dụng 16S rRNA đánh giá thành phần vi sinh vật và nhận thấy sự đa dạng của một số vi khuẩn như *Bacillus subtilis* và *Streptococcus agalactiae* tuy nhiên tính đa dạng của các vi khuẩn này giảm khi có sự xuất hiện tăng lên của *Paenibacillus* spp. [83]. Mặc dù vậy, bên cạnh phương pháp 16S rRNA, nghiên cứu này vẫn cần nuôi cấy và sử dụng qPCR cho *Paenibacillus* để khẳng định tác nhân.

Có thể thấy tiềm năng việc xác định và chẩn đoán căn nguyên bằng 16S rRNA và RNA-seq có nhiều điểm ưu thế hơn so với nuôi cấy và phương pháp chẩn đoán truyền thống, đặc biệt là trong trường hợp với nuôi cấy âm tính. Tuy nhiên, với các phương pháp này cần đảm bảo việc lấy mẫu vô trùng và tránh nhiễm trùng từ bên ngoài, bảo quản và thu thập mẫu nghiêm ngặt vì phương pháp phân tử có độ nhạy rất cao.

4.3. So sánh sự tương đồng trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh của các phương pháp

Trong nghiên cứu này thực tế so sánh về tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh của phương pháp nuôi cấy, giải trình tự 16S rRNA và RNA-seq, phương pháp PCR chỉ thực hiện khi có chỉ định của bác sĩ nên cỡ mẫu khác so với hai phương pháp còn lại. Đối với phương pháp nuôi cấy, tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh của cả hai nhóm NUT và NTSS là 14,8%. Tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh ở hai nhóm NUT và NTSS bằng giải trình tự 16S rRNA là 81%. Tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh ở RNA-seq là 40% nhưng có thể phát hiện được cả tác nhân vi rút và vi khuẩn. Tỷ lệ thấp nuôi cấy do kết quả nuôi cấy phụ thuộc vào việc sử dụng kháng sinh trước khi nhập viện của bệnh nhân, trong

khi đó phương pháp 16S rRNA và RNA-seq dựa trên vật chất di truyền nên ít bị ảnh hưởng [53].



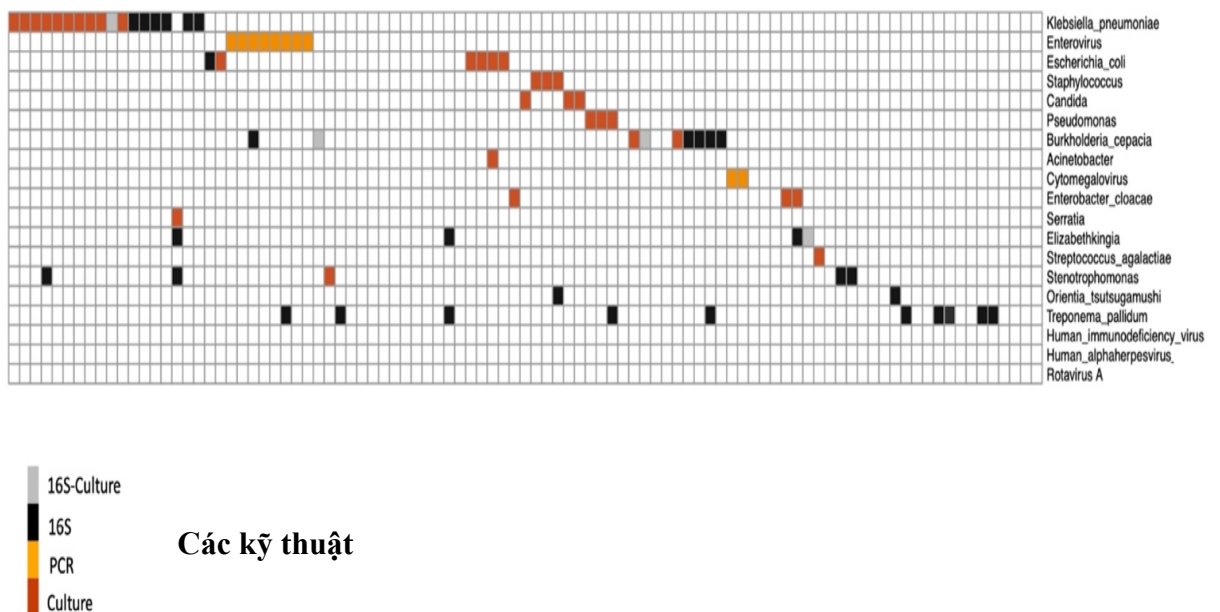
Hình 4.1. So sánh kết quả chẩn đoán tác nhân gây bệnh giữa nuôi cấy và PCR

Chú thích: Ô màu cam (PCR): kết quả của phương pháp PCR đa môi; Ô màu đỏ (Culture): kết quả nuôi cấy máu.

Nuôi cấy phát hiện tác nhân gây bệnh thực hiện trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn, vi rút chủ yếu phát hiện qua phương pháp PCR. Khi so sánh hai phương pháp PCR và nuôi cấy vi khuẩn (hình 4.1), vi khuẩn *E.coli* phát hiện được bằng cả hai phương pháp, tuy nhiên *S. pneumoniae* chỉ phát hiện bằng phương pháp PCR. Bên cạnh đó, phương pháp nuôi cấy phát hiện các vi khuẩn, còn PCR phát hiện vi rút CMV, Enterovirus và Herpatitis E. Đối với chẩn đoán tác nhân gây bệnh thì có thể phối hợp hai phương pháp để tìm ra nguyên nhân và có phác đồ điều trị hợp lý. Trong nghiên cứu về so sánh kết quả của hai phương pháp nuôi cấy và realtime PCR từ mẫu máu của bệnh nhi nhiễm trùng sơ sinh, tác giả Jeanne A. Jordan và Mary Beth Durso thuộc trường Đại học Pittsburgh, Mỹ đã xác định sự tương đồng khi phát hiện tác nhân vi khuẩn của cả hai phương pháp trên 53 mẫu dương tính và 32 mẫu âm tính [164]. Trong nghiên cứu này, 2 trong số 53 mẫu nuôi cấy máu khẳng định dương tính có kết quả âm tính với realtime PCR. Theo ý kiến của tác giả, phương pháp nuôi cấy chính xác nhưng mất nhiều thời gian để xác định kết quả do vậy ảnh hưởng đến việc điều trị kháng sinh cho bệnh nhân, phương pháp realtime PCR cho kết quả

nhánh nhưng có mặt giới hạn về thiết kế môi cho các tác nhân vi khuẩn đã biết [164]. Theo một nghiên cứu khác tại Ý, khi so sánh phương pháp nuôi cấy và phương pháp PCR đa môi SeptiFast thực hiện trên 1553 mẫu máu của bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh đã cho thấy SeptiFast có tỷ lệ phát hiện cao hơn phương pháp nuôi cấy truyền thống (tương ứng 14,6% và 10,3%) [174]. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng phương pháp PCR SeptiFast tuy có tỷ lệ phát hiện tác nhân cao và phát hiện một số tác nhân mà nuôi cấy không phát hiện được nhưng phương pháp này cũng không phát hiện được 3,3% số mẫu do giới hạn về thiết kế môi. Tác giả cũng cho rằng, phương pháp nuôi cấy bị ảnh hưởng của việc điều trị kháng sinh trước khi nhập viện nên sẽ không phát hiện được hết các tác nhân, trong khi đó phương pháp PCR lại có thể khắc phục được điều này.

Vi sinh vật

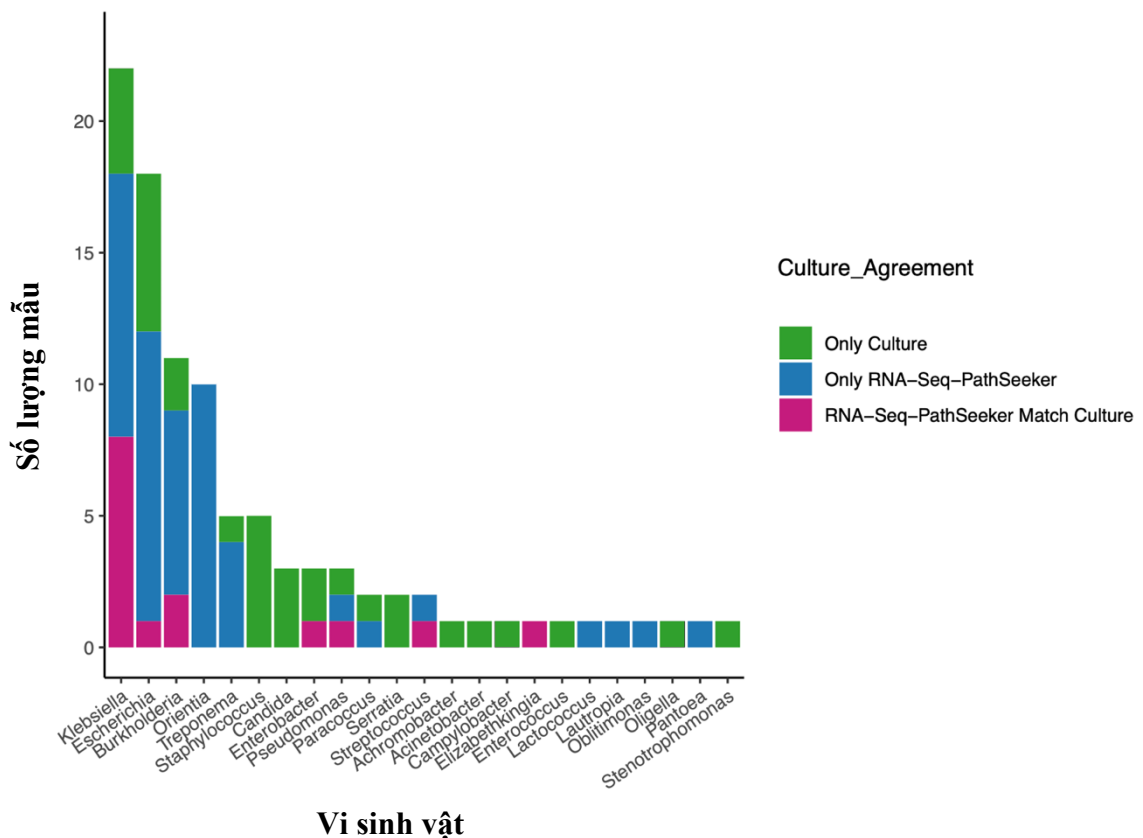


Hình 4.2. So sánh kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh bằng PCR, nuôi cấy và giải trình tự 16S rRNA

Chú thích: Ô màu đỏ (Culture): kết quả nuôi cấy máu; Ô màu cam (PCR): kết quả PCR; Ô màu đen (16S): kết quả giải trình tự 16S rRNA; Ô màu xám (16S-Culture): kết quả trùng khớp trên cùng một mẫu bệnh phẩm giữa phương pháp giải trình tự 16S rRNA và nuôi cấy.

Khi so sánh kết quả xét nghiệm chẩn đoán vi sinh vật gây bệnh từ các phương pháp nuôi cấy, PCR và 16S rRNA cho thấy một số tác nhân được phát

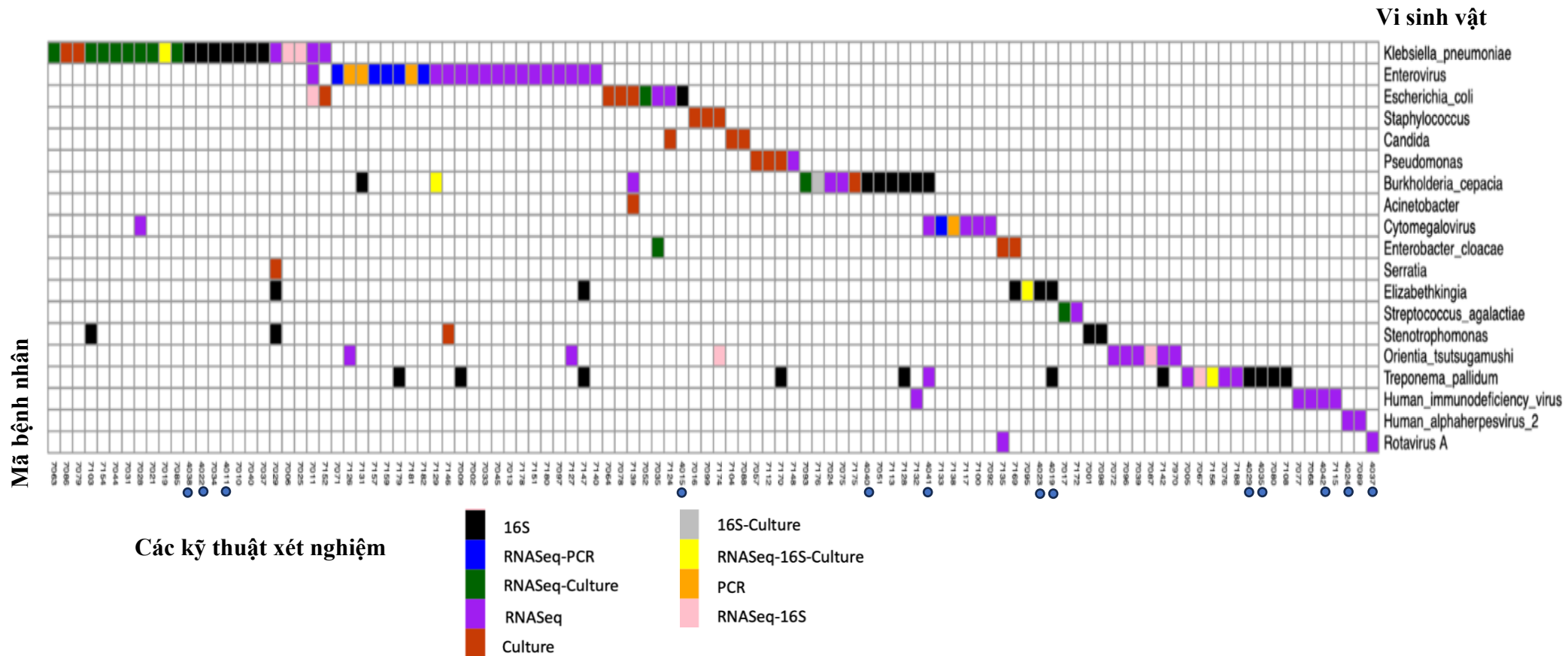
hiện bởi nhiều phương pháp, nhưng một số tác nhân chỉ xuất hiện ở phân tích 16S rRNA. Theo hình 4.2, vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* có thể phát hiện được bằng hai kỹ thuật là nuôi cấy và giải trình tự 16S rRNA. Nấm *Candida* spp. chỉ được phát hiện bằng nuôi cấy và các vi rút chỉ phát hiện bằng phương pháp PCR. Một số vi khuẩn được phát hiện bằng cả hai phương pháp nuôi cấy và giải trình tự 16S rRNA trên cùng một mẫu bệnh phẩm như vi khuẩn *Elizabethkingia*, *Burkholderia cepacia* và *Klebsiella pneumoniae*. Một số tác nhân chỉ phát hiện bằng nuôi cấy như *Serratia* và *Candida*. Phương pháp PCR phát hiện các tác nhân vi rút (Enterovirus, Cytomegalovirus) và vi khuẩn trong khi các phương pháp khác chỉ phát hiện ra vi khuẩn. Giải trình tự 16S rRNA phát hiện vi khuẩn *Treponema pallidum* và *Orientia tsutsugamushi* trong khi các phương pháp nuôi cấy và PCR khác không có kết quả.



Hình 4.3. So sánh thành phần vi khuẩn được phát hiện bằng RNA-seq và nuôi cấy

Chú thích: Màu xanh lá (Only culture): Vi sinh vật phát hiện bằng nuôi cấy; Màu xanh lam (Only RNA-Seq-Pathseeker): Vi sinh vật phát hiện bằng giải trình tự RNA; Màu hồng (RNA-Seq-Pathseeker match Culture): Vi sinh vật phát hiện bằng cả hai phương pháp RNA-seq và nuôi cấy.

Phương pháp nuôi cấy và giải trình tự RNA cùng phát hiện một số vi khuẩn như *Klebsiella*, *Escherichia*, *Burkholderia*, *Enterobacter* *Pseudomonas*, *Serratia* và *Elizabethkingia*. Bên cạnh đó, phương pháp giải trình tự RNA phát hiện một số tác nhân vi khuẩn mà phương pháp nuôi cấy không phát hiện được như *Orientia*, *Enterococcus*, *Lautropia*, *Pantticea*. So sánh thành phần vi sinh vật phát hiện bởi phương pháp nuôi cấy và RNA-seq có thể thấy *Klebsiella* là vi khuẩn có thể phát hiện được nhiều nhất bằng cả hai kỹ thuật. Có 8 trường hợp mắc *Klebsiella* phát hiện được bằng cả hai phương pháp, các trường hợp còn lại không trùng khớp. Các vi khuẩn khác như *Escherichia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* và *Elizabethkingia* có một vài bệnh nhân được xác định bằng cả hai phương pháp nhưng với tỉ lệ nhỏ. Đặc biệt, vi khuẩn *Elizabethkingia* hoàn toàn trùng khớp giữa hai phương pháp. RNA-seq phát hiện được với số lượng bệnh nhân nhiễm vi khuẩn lớn hơn so với nuôi cấy. Một số tác nhân chỉ xuất hiện ở nuôi cấy như *Staphylococcus*, *Candida*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Enterococcus* và *Stenotrophomonas*.



Hình 4.4. So sánh kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh giữa các phương pháp

Chú thích: các dải màu thể hiện kỹ thuật phát hiện tác nhân gây bệnh; các ô màu thể hiện vi sinh vật được phát hiện bằng các phương pháp xét nghiệm của từng mẫu; chấm tròn xanh ● đánh dấu mẫu của bệnh nhi não úng thủy.

RNASeq-PCR là kết quả trùng khớp trên cùng một mẫu bệnh phẩm giữa phương pháp giải trình tự RNA và PCR; RNASeq-Culture là kết quả trùng khớp trên cùng một mẫu bệnh phẩm giữa phương pháp giải trình tự RNA và nuôi cấy; 16S-Culture là kết quả trùng khớp trên cùng một mẫu bệnh phẩm giữa phương pháp giải trình tự 16S rRNA và nuôi cấy; RNASeq-16S là kết quả trùng khớp trên cùng một mẫu bệnh phẩm giữa phương pháp giải trình tự RNA và 16S rRNA; RNASeq-16S-Culture là kết quả trùng khớp trên cùng một mẫu bệnh phẩm giữa phương pháp giải trình tự RNA, 16S rRNA và nuôi cấy.

So sánh các phương pháp xét nghiệm phát hiện tác nhân nghi ngờ gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh có thể thấy 16S chỉ phát hiện tác nhân vi khuẩn, giải trình tự RNA phát hiện được cả hai nhóm vi rút và vi khuẩn trong khi nuôi cấy phát hiện được vi khuẩn và nấm. Trong hình 4.4 có 13 mẫu dịch não tủy và kết quả phát hiện tác nhân nghi ngờ não úng thủy do phân tích giải trình tự 16S rRNA (10 mẫu) và RNA (3 mẫu). Mẫu 4011, 4022 và 4038 đều có *Klebsiella pneumoniae* là tác nhân duy nhất phát hiện trong mẫu dịch não tủy. *E.coli* là tác nhân duy nhất của mẫu 4015 trong khi *Burkholderia cepaciae* là tác nhân duy nhất ở 4040 và *Elizabethkingia* trong mẫu 4023. Mẫu 4035 và 4029 có chung tác nhân là *Treponema pallidum*. Kết quả của mẫu 4042 là vi rút HIV, mẫu 4024 là Human Alphaherpes virus 2 và mẫu 4037 là Rotavirus A, các mẫu này đều phát hiện qua phương pháp giải trình tự RNA. Theo hình 4.4 cũng có thể thấy nhóm nhiễm trùng sơ sinh có một số vi sinh vật đặc trưng không có ở nhóm não úng thủy như *Enterovirus*, *Staphylococcus*, *Candida*, *Pseudomonas* và *Orientia*. Kết quả tương đồng của ba phương pháp giải trình tự 16S rRNA, RNA và nuôi cấy có các vi khuẩn sau *Klebsiella pneumoniae* (mẫu 7019), *Burkholderia cepaciae* (mẫu 7029), *Elizabethkingia* (mẫu 7095), và *Treponema pallidum* (mẫu 7156). Có duy nhất một mẫu có kết quả tương đồng giữa 16S rRNA và nuôi cấy là vi khuẩn *Burkholderia cepaciae* (mẫu 7176). So sánh thành phần vi sinh vật có tỷ lệ cao nhất được phát hiện từ các phương pháp xét nghiệm truyền thống và sử dụng kỹ thuật giải trình tự hiện đại, có thể thấy thành phần vi sinh vật gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh rất đa dạng, bao gồm cả vi khuẩn, nấm và vi rút. *Klebsiella pneumoniae* và *E.coli* được phát hiện ở hầu hết các phương pháp chẩn đoán. *Klebsiella pneumoniae* được xác định ở 24 bệnh nhân trong nghiên cứu này trong đó có 3 bệnh nhân chẩn đoán não úng thủy và 21 bệnh nhân NTSS. *Klebsiella pneumoniae* cũng là tác nhân lưu hành nhiều nhất trong cả hai nhóm bệnh. Có 9 trường hợp khẳng định nhiễm *E.coli* trong so sánh các phương pháp, một

trường hợp là bệnh nhân não úng thủy còn lại là NTSS. *Burkholderia cepacia* được phát hiện qua nuôi cấy và phân tích giải trình tự nhưng không phát hiện qua phương pháp PCR do yêu cầu phải có môi đặc hiệu. Kết quả nuôi cấy phù hợp với kết quả RNA-seq ở mẫu máu của bệnh nhân. *Burkholderia cepacia* là một trong số vi khuẩn gây nhiễm trùng sơ sinh ở các nước như Parkistan, Yemen, Ấn Độ và cả Việt Nam. Một nghiên cứu ở Parkistan cho thấy trong số 18 trẻ chẩn đoán mắc nhiễm trùng sơ sinh do *B.cepacia*, 10/18 trẻ sinh ra nhẹ cân, 15/18 trẻ là nhiễm trùng sơ sinh khởi phát muộn và 10/18 trẻ chết, vi khuẩn này đã kháng 100% với minocycline and chloramphenicol [113]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu tại Châu Phi, Ấn Độ và Parkistan cũng chỉ ra rằng *B.cepacia* liên quan đến nhiễm trùng bệnh viện [108, 115, 194]. Những nghiên cứu này đều thực hiện khi có sự xuất hiện vụ dịch liên quan đến *B.cepacia* ở các bệnh viện và khu vực chăm sóc đặc biệt. Có thể thấy, đây là điểm đáng lưu ý cho các bệnh viện nhi tại Việt Nam để phòng tránh các tình huống xấu do lây nhiễm bệnh viện như kiểm soát nhiễm trùng, thực hành lâm sàng tốt. Khi so sánh các phương pháp, có 14 bệnh nhân được khẳng định mắc *B.cepacia* với hai bệnh nhân não úng thủy và 12 bệnh nhân NTSS. *Treponema palladium* lưu hành trong cả hai nhóm bệnh với tổng số mắc là 18 bệnh nhân bao gồm bốn bệnh nhân NUT và 14 bệnh nhân NTSS. Vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* chỉ lưu hành ở nhóm bệnh NTSS với 9 trường hợp nhiễm. Trong nhóm vi rút gây bệnh, Enterovirus có số lượng ca mắc là 24, và chỉ xuất hiện ở nhóm NTSS. Điều này có thể chỉ ra vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* và Enterovirus là hai tác nhân gây nhiễm trùng sơ sinh trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn cần có các nghiên cứu sinh học phân tử sâu hơn.

4.4. Hạn chế của đề tài

Đề tài thuộc Dự án thử nghiệm nghiên cứu tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Thời gian thực hiện đề tài là từ năm 2019 đến 2020 khi dịch COVID-19 xảy ra, do vậy việc thu tuyển số lượng mẫu nhỏ và chỉ trong phạm vi của Bệnh viện Nhi Trung ương. Do vậy, cần có các nghiên cứu khác với quy mô mẫu lớn hơn, thực hiện ở các địa điểm nghiên cứu khác như các Bệnh viện Nhi trong cả nước để xác định được sự lưu hành cũng như đặc điểm sinh học phân tử của các tác nhân gây bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh.

KẾT LUẬN

Đề tài nghiên cứu trên bệnh nhi nghi ngờ mắc não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh, thực hiện tại Bệnh viện Nhi Trung ương trong giai đoạn từ tháng 10/2019 đến tháng 12/2020 đã thu được các kết quả như sau:

1. Mô tả một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhi não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh tại Bệnh viện Nhi trung ương, 2019-2020

Tỷ lệ bé trai mắc bệnh não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh cao hơn ở bé gái. Bệnh nhân đa số ở khu vực nông thôn và miền núi. Tỷ lệ tử vong ca bệnh ở não úng thủy là 7,3% và ở nhiễm trùng sơ sinh là 9,2%.

Kết quả xét nghiệm bằng phương pháp miễn dịch ở nhóm não úng thủy gồm 02 bệnh nhi dương tính với IgG/IgM vi rút Cytomegalo (CMV), 01 bệnh nhi dương tính với IgG của vi rút Herpes 1+2 (HSV), 02 bệnh nhi dương tính test nhanh với RSV A. Nhóm nhiễm trùng sơ sinh có kết quả miễn dịch: 23 bệnh nhi dương tính với CMV IgG/IgM, 17 bệnh nhi dương tính với HSV 1+2 IgG, 16 bệnh nhi dương tính với Rubella IgG, 05 bệnh nhi dương tính với *Treponema pallidum* TPHA, 05 bệnh nhi dương tính với EBV-VCS IgG và 04 bệnh nhi dương tính với *Toxoplasma* IgG.

Phương pháp PCR phát hiện các tác nhân vi rút Cytomegalovirus, Enterovirus, vi khuẩn *Escherichia coli* K1 và *Streptococcus pneumoniae* ở cả hai nhóm não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh. Herpatitis E Virus (HEV) chỉ được phát hiện ở 08 mẫu máu và dịch não tủy của bệnh nhi nhiễm trùng sơ sinh.

Tỷ lệ phát hiện tác nhân bằng phương pháp nuôi cấy là 14,8% bao gồm các tác nhân vi khuẩn: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Elizabethkingia meningoseptica* và nhóm *Staphylococcus* spp. và nấm *Candida guilliermondii*, *Candida orthopsilosis* và *Candida tropicalis*. Kết quả nuôi cấy chỉ có ở bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh.

Hai bệnh nhân có kết quả nuôi cấy máu và dịch não tủy cùng một loại vi khuẩn đó là *Elizabethkingia menigoseptica* và *Escherichia coli*.

2. Xác định một số tác nhân gây não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh bằng phương pháp giải trình tự RNA và 16S rRNA

300 mẫu bệnh phẩm máu và dịch não tủy từ 41 bệnh nhân não úng thủy và 142 bệnh nhân nhiễm trùng sơ sinh đã được phân tích và giải trình tự 16S rRNA và RNA-seq.

16S rRNA phát hiện được các vi khuẩn trong máu và dịch não tủy mà nuôi cấy vi khuẩn không phân lập được. Các chi vi khuẩn chủ yếu là *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*. Đối với nhóm não úng thủy, 37/41 mẫu dịch não tủy có kết quả giải trình tự 16S rRNA và các tác nhân nghi ngờ gây bệnh có tần suất xuất hiện cao nhất là *Klebsiella* và *Staphylococcus*. Đối với nhóm nhiễm trùng sơ sinh, các tác nhân nghi ngờ gây bệnh có tần suất xuất hiện cao là *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* và *Pseudomonas*. 16S rRNA chỉ xác định được vi khuẩn gây bệnh nhưng có tỷ lệ phát hiện tác nhân gây bệnh cao là 81%.

RNA-seq phát hiện cả tác nhân vi khuẩn và vi rút với tỷ lệ phát hiện 40%. Kết quả giải trình tự RNA cho kết quả của 05 mẫu dịch não tủy thuộc nhóm não úng thủy và 137 mẫu máu và dịch não tủy thuộc nhóm nhiễm trùng sơ sinh. Các tác nhân nghi ngờ gây não úng thủy chính bao gồm Enterovirus B, Human alphaherpesvirus 2, Rotavirus A, Human immunodeficiency virus 1 (HIV 1), Human betaherpesvirus 5 và *Treponema palladium*. Bên cạnh các tác nhân nghi ngờ gây bệnh giống với nhóm não úng thủy, các tác nhân nghi ngờ gây bệnh nhiễm trùng sơ sinh phát hiện bằng giải trình tự RNA còn có *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter cloacae*, *Orientia tsutsugamushi*, *Burkholderia cepacia* và vi rút Murid betaherpesvirus 1.

KIẾN NGHỊ

Sau quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi xin có một số kiến nghị sau:

1. Trong các nghiên cứu sau, bên cạnh việc chẩn đoán các tác nhân gây bệnh NUT và NKSS, nhóm nghiên cứu sẽ thực hiện các điều tra về sự xuất hiện các tác nhân trong môi trường cũng như nguồn lây nhiễm để có thể xây dựng mô hình dự đoán bệnh tật.
2. Xây dựng hệ thống giám sát bệnh nhi nhiễm trùng sơ sinh sau khi xuất viện, theo dõi từ 3 đến 6 tháng để kiểm tra cũng như chẩn đoán sớm trường hợp tiến triển thành não úng thủy.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Ngô Khánh Phương, Trịnh Sơn Tùng, Lê Huy Hoàng, Hoàng Thị Bích Ngọc ,Trần Thị Mai Hưng, Phạm Quang Thái, Trần Quang Trí, Trần Minh Điền, Lê Thị Hà, Trần Văn Sĩ, Tống Thị Hà, Bùi Minh Trang, Hoàng Thị Thu Hà, Đặng Đức Anh (2023), “Phát hiện một số tác nhân gây não úng thủy, nhiễm trùng sơ sinh bằng phương pháp nuôi cấy, PCR đa môi và phân tích 16S rRNA ở bệnh nhân sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương, năm 2019 – 2020”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 33, số 5 - 2023, tr.161-165.

2. Ngô Khánh Phương, Trịnh Sơn Tùng, Trần Thị Mai Hưng, Phạm Quang Thái, Trần Quang Trí, Trần Minh Điền, Lê Thị Hà, Hoàng Thị Bích Ngọc, Trần Văn Sĩ, Tống Thị Hà, Bùi Minh Trang, Hoàng Thị Thu Hà, Đặng Đức Anh (2023), “Mô tả một số đặc điểm bệnh nhi não úng thủy và nhiễm trùng sơ sinh tại bệnh viện Nhi Trung ương, năm 2019 – 2020”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 33, số 5 - 2023, tr.150-15

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Cao Thị Mai Lê (2021), *Đặc điểm dịch tễ học lâm sàng của các nhiễm trùng TORCH tại Bệnh viện Nhi trung ương (Luận văn Thạc sĩ)*, Trường Đại học Y Hà Nội.
2. Đinh Dương Tùng Anh, Đinh Văn Thúc, Chinh Bùi Lê Vĩ (2022), “Đặc điểm vi khuẩn gây bệnh và kết quả điều trị viêm phổi cộng đồng ở trẻ sơ sinh tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng năm 2019–2020”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 32 (5), 126-133.
3. Đinh Thị Thuý Hà (2006), *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và một số yếu tố liên quan đến viêm phổi ở trẻ sơ sinh tại Bệnh viện đa khoa Trung ương Thái Nguyên (Luận văn Thạc sĩ)*, Trường Đại học Y khoa Thái Nguyên.
4. Đinh Văn Thúc, Bé Thị Cúc, Đinh Dương Tùng Anh (2023), “Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của nhiễm khuẩn huyết ở trẻ sơ sinh tại Bệnh viện trẻ em Hải Phòng năm 2019-2021”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 525 (2), 170-174.
5. Đỗ Thị Hương Giang, Nguyễn Thị Quỳnh Nga (2023), “Căn nguyên vi khuẩn gây nhiễm khuẩn huyết sơ sinh tại bệnh viện Nhi Trung ương”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 530 (1B), 160-164.
6. Đường Hồng Hưng (2021), *Nghiên cứu một số căn nguyên, đặc điểm lâm sàng, chẩn đoán hình ảnh và sự phát triển sau phẫu thuật não úng thủy ở trẻ em (Luận án Tiến sĩ)*, Trường đại học Y Hà Nội.
7. Dương Quốc Trưởng, Đỗ Thái Sơn, Dương Ngọc Ngà (2022), “Kết quả điều trị nhiễm khuẩn sơ sinh tại trung tâm nhi khoa Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 512 (1), 147-151.
8. Dương Quỳnh Anh (2021), “Một số yếu tố sản khoa liên quan tử vong sơ sinh sớm ở trẻ đẻ non 28–32 tuần”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 505 (2).
9. Hà Đức Dũng (2020), “Tình trạng kháng kháng sinh của một số vi khuẩn gây nhiễm khuẩn huyết sơ sinh tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 93-98.

10. Lê Thái Thiên Trinh, Dương Thanh Long, Tiến Trương Thị Mỹ. Các yếu tố nguy cơ gây tử vong sơ sinh tại khoa Nhi bệnh viện An Giang. Kỷ yếu nghiên cứu khoa học Bệnh viện An Giang 2013.
11. Lý Thái Minh, Trương Cẩm Trinh, Hồng Đăng Thanh (2023), “Nghiên cứu một số yếu tố liên quan tử vong của trẻ sơ sinh tại các bệnh viện tuyến tỉnh Đồng Tháp năm 2020-2023”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 531 (2), 130-134.
12. Nguyễn Đăng Mạnh, Chung Phạm Văn (2020), “So sánh đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân sốt mò và sốt do Rickettsia điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Trung ương Quân đội 108”, *Tạp chí Y dược Lâm sàng 108*, 15 (1), 37-44.
13. Nguyễn Hữu Sơn (2023), *Căn nguyên và kết quả điều trị một số bệnh nhiễm khuẩn sơ sinh thường gặp tại bệnh viện sản nhi Nghệ An năm 2022 (Luận văn chuyên khoa 2)*, Trường Đại Học Y Hà Nội.
14. Nguyễn Mai An (2019), “Lựa chọn chiến lược tầm soát và dự phòng nhiễm khuẩn sơ sinh sớm do Streptococcus nhóm B”, *Tạp chí Phụ sản*, 16 (4), 31-34.
15. Nguyễn Quang Bài (1999), “Những biến chứng và cách xử lý biến chứng trong dẫn lưu não thất – ổ bụng (nhân 668 trường hợp)”, *Tạp chí Y học thực hành*, 9, 16-18.
16. Nguyễn Thanh Hà, Long Trần Đình (2006), “Nghiên cứu lâm sàng nhiễm khuẩn sơ sinh sớm và một số yếu tố liên quan tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương”, *Tạp chí Nhi khoa*, 14, 42-47.
17. Nguyễn Thị Ngọc Tú (2022), *Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị nhiễm khuẩn huyết sơ sinh đủ tháng tại Bệnh viện Nhi Trung ương (2019 – 2021) (Luận án Tiến sĩ Y học)*, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.
18. Nguyễn Thị Quỳnh Nga (2021), “Đặc Điểm lâm sàng, cận lâm sàng của viêm màng não nhiễm khuẩn ở trẻ sơ sinh”, *Tạp chí Nhi khoa*, 14 (2).
19. Nguyễn Thị Quỳnh Nga (2023), “Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị nhiễm khuẩn huyết do Staphylococcus aureus ở trẻ sơ sinh”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 170 (9), 46-55.

20. Nông Thanh Tuyền (2020), *Đặc điểm dịch tễ học lâm sàng bệnh viêm não do Herpes Simplex Virus tại bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2016-2019 (Luận án Chuyên khoa II)*, Trường Đại học Y Hà Nội.
21. Phạm Thị Thanh Mai (2003), “Bước đầu nghiên cứu một số yếu tố liên quan đến nhiễm khuẩn sớm sơ sinh”, *Nghiên cứu Y học*, 2 (13), 234-236.
22. Phạm Thị Thanh Tâm, Lê Thanh Hải, Phùng Thị Bích Thủy, Lê Ngọc Duy, Nguyễn Thị Nga, Đỗ Quang Vỹ, et al. (2021), “Tỷ lệ nhiễm một số vi khuẩn, virus ở trẻ viêm phổi tái diễn có suy hô hấp tại Bệnh viện Nhi Trung ương”, *Tạp chí Nghiên cứu và Thực hành Nhi khoa*, 5 (1), 25-30.
23. Phạm Thị Xuân Tú, Hùng Phạm Văn (2001), “Đặc điểm lâm sàng, sinh học của nhiễm khuẩn huyết ở trẻ sơ sinh”, *Tạp chí Nhi khoa*, 10, 86-89.
24. Phùng Thị Bích Thủy Nguyễn Thanh Phúc, Trần Thị Sinh, Trần Thanh Tú (2016), “Ứng dụng Kỹ thuật Real Time PCR đa môi trường chẩn đoán căn nguyên gây nhiễm trùng huyết ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương”, *Tạp chí Nhi khoa*, 9, 50-53.
25. Tạ Văn Trâm (2005), “Nghiên cứu mô hình bệnh tật và tử vong của trẻ em tại Bệnh viện đa khoa trung tâm Tiền Giang và đề xuất một số biện pháp khắc phục”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 1, 5-9.
26. Trần Diệu Linh, Vũ Bá Quyết, Yên Nguyễn Thu (2016), “Nhiễm khuẩn sơ sinh sớm ở trẻ đủ tháng sinh mổ tại Bệnh viện Phụ Sản Trung Ương”, *Tạp chí Phụ sản*, 14 (1), 120-124.
27. Trần Văn Sĩ (2020), *Kết quả điều trị não úng thủy ở trẻ em bằng nội soi phá sán não thất III kết hợp đốt đám rối mạch mạc (Luận án Chuyên khoa II)*, Trường Đại học Y Hà Nội.

TIẾNG ANH

28. Agudelo-Pérez Sergio, Fernández-Sarmiento Jaime, Rivera León Diana, Peláez Ronald Guillermo (2023), “Metagenomics by next-generation sequencing (mNGS) in the etiological characterization of neonatal and pediatric sepsis: A systematic review”, *Frontiers in Pediatrics*, 11:1011723 (30).

29. Kralik Petr, Ricchi Matteo (2017), "A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything", *Frontiers in Microbiology*, 8 (108), 1-9.
30. Russell Neal J., Seale Anna C., O'Driscoll Megan, O'Sullivan Catherine, Bianchi-Jassir Fiorella, Gonzalez-Guarin Juan, et al. (2017), "Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses", *Clin Infect Dis* 2017; 65(Suppl 2):S100-S111, 65.
31. Abbas M., El-Manzalawy Y. (2020), "Machine learning based refined differential gene expression analysis of pediatric sepsis", *BMC Med Genomics*, 13 (1), 122.
32. Albanna E. A., El-Latif R. S., Sharaf H. A., Gohar M. K., Ibrahim B. M. (2013), "Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in high risk neonates", *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 5 (1), e2013049.
33. Alcon-Giner C., Caim S., Mitra S., Ketskemety J., Wegmann U., Wain J., et al. (2017), "Optimisation of 16S rRNA gut microbiota profiling of extremely low birth weight infants", *BMC Genomics*, 18 (1), 841.
34. Anh N. T., Hong N. T. T., Nhu L. N. T., Thanh T. T., Lau C. Y., Limmathurotsakul D., et al. (2019), "Viruses in Vietnamese Patients Presenting with Community-Acquired Sepsis of Unknown Cause", *J Clin Microbiol*, 57 (9:e00386-19), 1-13.
35. Basha S., Surendran N., Pichichero M. (2014), "Immune responses in neonates", *Expert Rev Clin Immunol*, 10 (9), 1171-1184.
36. Bertaccini A., Paltrinieri S., Contaldo N. (2019), "Standard Detection Protocol: PCR and RFLP Analyses Based on 16S rRNA Gene", *Methods Mol Biol*, 1875, 83-95.
37. Bruning A. H. L., Leeflang M. M. G., Vos Jmbw, Spijker R., de Jong M. D., Wolthers K. C., et al. (2017), "Rapid Tests for Influenza, Respiratory Syncytial Virus, and Other Respiratory Viruses: A Systematic Review and Meta-analysis", *Clin Infect Dis*, 65 (6), 1026-1032.

38. Buhimschi C. S., Bhandari V., Hamar B. D., Bahtiyar M. O., Zhao G., Sfakianaki A. K., et al. (2007), "Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis", *PLoS Med*, 4 (1), e18.
39. Buhimschi I. A., Buhimschi C. S. (2010), "The role of proteomics in the diagnosis of chorioamnionitis and early-onset neonatal sepsis", *Clin Perinatol*, 37 (2), 355-374.
40. Bundy L. M., Rajnik M., Noor A. (2023), *Neonatal Meningitis*, StatPearls, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing
Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
41. Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., et al. (2010), "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data", *Nat Methods*, 7 (5), 335-336.
42. Celik I. H., Hanna M., Canpolat F. E., Mohan Pammi (2022), "Diagnosis of neonatal sepsis: the past, present and future", *Pediatr Res*, 91 (2), 337-350.
43. Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. (2007), "A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria", *J Microbiol Methods*, 69 (2), 330-339.
44. Chan K. Y., Lam H. S., Cheung H. M., Chan A. K., Li K., Fok T. F., et al. (2009), "Rapid identification and differentiation of Gram-negative and Gram-positive bacterial bloodstream infections by quantitative polymerase chain reaction in preterm infants", *Crit Care Med*, 37 (8), 2441-2447.
45. Chang S. S., Hsieh W. H., Liu T. S., Lee S. H., Wang C. H., Chou H. C., et al. (2013), "Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis - a systemic review and meta-analysis", *PloS one*, 8 (5), e62323.
46. Chatterjee S., Chatterjee U. (2011), "Overview of post-infective hydrocephalus", *Childs Nerv Syst*, 27 (10), 1693-1698.
47. Chu Y., Corey D. R. (2012), "RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation", *Nucleic Acid Ther*, 22 (4), 271-274.

48. Clarridge J. E., 3rd (2004), "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases", *Clin Microbiol Rev*, 17 (4), 840-862, table of contents.
49. Cummings P. J., Ahmed R., Durocher J. A., Jessen A., Vardi T., Obom K. M. (2013), "Pyrosequencing for microbial identification and characterization", *J Vis Exp*, (78), e50405.
50. Dewan M. C., Rattani A., Mekary R., Glancz L. J., Yunusa I., Baticulon R. E., et al. (2018), "Global hydrocephalus epidemiology and incidence: systematic review and meta-analysis", *J Neurosurg*, 130 (4), 1065-1079.
51. Di Caprio A., Coccolini E., Zagni P., Vaccina E., Lucaccioni L., Lugli L., et al. (2021), "Pneumococcal septic shock after neonatal respiratory syncytial virus bronchiolitis: A case report and literature review", *Acta Biomed*, 92 (S1), e2021111.
52. Dong Y., Speer C. P. (2015), "Late-onset neonatal sepsis: recent developments", *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 100 (3), F257-263.
53. El-Amir M. I., El-Feky M. A., Abo Elwafa D. A., Abd-Elmawgood E. A. (2019), "Rapid diagnosis of neonatal sepsis by PCR for detection of 16S rRNA gene, while blood culture and PCR results were similar in E.coli-predominant EOS cases", *Infect Drug Resist*, 12, 2703-2710.
54. Enomoto M., Morioka I., Morisawa T., Yokoyama N., Matsuo M. (2009), "A novel diagnostic tool for detecting neonatal infections using multiplex polymerase chain reaction", *Neonatology*, 96 (2), 102-108.
55. Fatmi A., Rebiahi S. A., Chabni N., Zerrouki H., Azzaoui H., Elhabiri Y., et al. (2020), "miRNA-23b as a biomarker of culture-positive neonatal sepsis", *Mol Med*, 26 (1), 94.
56. Fukuda K., Ogawa M., Taniguchi H., Saito M. (2016), "Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene", *J uoeh*, 38 (3), 223-232.
57. Gan M. Y., Lee W. L., Yap B. J., Seethor S. T. T., Greenberg R. G., Pek J. H., et al. (2022), "Contemporary Trends in Global Mortality of Sepsis Among Young Infants Less Than 90 Days: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Front Pediatr*, 10, 890767.

58. Govender K. N., Street T. L., Sanderson N. D., Eyre D. W. (2021), "Metagenomic Sequencing as a Pathogen-Agnostic Clinical Diagnostic Tool for Infectious Diseases: a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies", *J Clin Microbiol*, 59 (9), e0291620.
59. Harris P. A., Taylor R., Minor B. L., Elliott V., Fernandez M., O'Neal L., et al. (2019), "The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners", *J Biomed Inform*, 95, 103208.
60. Harris P. A., Taylor R., Thielke R., Payne J., Gonzalez N., Conde J. G. (2009), "Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support", *J Biomed Inform*, 42 (2), 377-381.
61. Isaacs A. M., Riva-Cambrin J., Yavin D., Hockley A., Pringsheim T. M., Jette N., et al. (2018), "Age-specific global epidemiology of hydrocephalus: Systematic review, metanalysis and global birth surveillance", *PloS one*, 13 (10), e0204926.
62. James Spencer L and Abate, Degu and Abate, Kalkidan Hassen and Abay, Solomon M and Abbafati, Cristiana and Abbasi, Nooshin and Abbastabar, Hedayat and Abd-Allah, Foad and Abdela, Jemal and Abdelalim, Ahmed and others (2018), "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017", *Lancet*, 392 (10159), 1789-1858.
63. Jordan J. A., Durso M. B. (2000), "Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia", *J Clin Microbiol*, 38 (7), 2574-2578.
64. Jordan J. A., Durso M. B. (2005), "Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis", *J Mol Diagn*, 7 (5), 575-581.
65. Jordan J. A., Durso M. B., Butchko A. R., Jones J. G., Brozanski B. S. (2006), "Evaluating the near-term infant for early onset sepsis: progress and challenges to consider with 16S rDNA polymerase chain reaction testing", *J Mol Diagn*, 8 (3), 357-363.

66. Kasper D. C., Altioek I., Mechtler T. P., Böhm J., Straub J., Langgartner M., et al. (2013), "Molecular detection of late-onset neonatal sepsis in premature infants using small blood volumes: proof-of-concept", *Neonatology*, 103 (4), 268-273.
67. Kim B., Oh S. Y., Kim J. S. (2017), "Placental Lesions in Meconium Aspiration Syndrome", *J Pathol Transl Med*, 51 (5), 488-498.
68. Kim B. R., Shin J., Guevarra R., Lee J. H., Kim D. W., Seol K. H., et al. (2017), "Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities", *J Microbiol Biotechnol*, 27 (12), 2089-2093.
69. Koleva M., De Jesus O. (2021), *Hydrocephalus*, StatPearls, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
70. Korber F., Zeller I., Grünstäudl M., Willinger B., Apfalter P., Hirschl A. M., et al. (2017), "SeptiFast versus blood culture in clinical routine - A report on 3 years experience", *Wien Klin Wochenschr*, 129 (11-12), 427-434.
71. Li L., Padhi A., Ranjeva S. L., Donaldson S. C., Warf B. C., Mugamba J., et al. (2011), "Association of bacteria with hydrocephalus in Ugandan infants", *J Neurosurg Pediatr*, 7 (1), 73-87.
72. Lisboa T., Waterer G., Rello J. (2010), "We should be measuring genomic bacterial load and virulence factors", *Crit Care Med*, 38 (10 Suppl), S656-662.
73. Liu C. L., Ai H. W., Wang W. P., Chen L., Hu H. B., Ye T., et al. (2014), "Comparison of 16S rRNA gene PCR and blood culture for diagnosis of neonatal sepsis", *Arch Pediatr*, 21 (2), 162-169.
74. Liu G., Liu W., Guo J. (2020), "Clinical significance of miR-181a in patients with neonatal sepsis and its regulatory role in the lipopolysaccharide-induced inflammatory response", *Exp Ther Med*, 19 (3), 1977-1983.
75. Lo Y. M., Chan K. C. (2006), "Introduction to the polymerase chain reaction", *Methods Mol Biol*, 336, 1-10.
76. Maller V. V., Gray R. I. (2016), "Noncommunicating Hydrocephalus", *Semin Ultrasound CT MR*, 37 (2), 109-119.

77. Mansfield S., Griebel M., Gutknecht M., Cook C. H. (2015), "Sepsis and cytomegalovirus: foes or conspirators?", *Med Microbiol Immunol*, 204 (3), 431-437.
78. Matsuda K., Tsuji H., Asahara T., Kado Y., Nomoto K. (2007), "Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR", *Appl Environ Microbiol*, 73 (1), 32-39.
79. McCabe K. M., Khan G., Zhang Y. H., Mason E. O., McCabe E. R. (1995), "Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: automated analysis and potential for molecular triage of sepsis", *Pediatrics*, 95 (2), 165-169.
80. Mukhopadhyay S., Puopolo K. M. (2012), "Risk assessment in neonatal early onset sepsis", *Semin Perinatol*, 36 (6), 408-415.
81. Nisar Y. B., Tshetu A., Longombe A. L., Esamai F., Marete I., Ayede A. I., et al. (2021), "Clinical signs of possible serious infection and associated mortality among young infants presenting at first-level health facilities", *PloS one*, 16 (6), e0253110.
82. Pammi M., Flores A., Leeftang M., Versalovic J. (2011), "Molecular assays in the diagnosis of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis", *Pediatrics*, 128 (4), e973-985.
83. Paulson J. N., Williams B. L., Hehnlly C., Mishra N., Sinnar S. A., Zhang L., et al. (2020), "Paenibacillus infection with frequent viral coinfection contributes to postinfectious hydrocephalus in Ugandan infants", *Sci Transl Med*, 12 (563).
84. Pavan Kumar D. V., Mohan J., Rakesh P. S., Prasad J., Joseph L. (2017), "Bacteriological profile of neonatal sepsis in a secondary care hospital in rural Tamil Nadu, Southern India", *J Family Med Prim Care*, 6 (4), 735-738.
85. Popow-Kraupp T., Aberle J. H. (2011), "Diagnosis of respiratory syncytial virus infection", *Open Microbiol J*, 5, 128-134.
86. Remick D. G., Kunkel S. L., Holbrook E. A., Hanson C. A. (1990), "Theory and applications of the polymerase chain reaction", *Am J Clin Pathol*, 93 (4 Suppl 1), S49-54.

87. Rhoades R. E., Tabor-Godwin J. M., Tsueng G., Feuer R. (2011), "Enterovirus infections of the central nervous system", *Virology*, 411 (2), 288-305.
88. Robert-Gangneux F., Guegan H. (2021), "Anti-Toxoplasma IgG assays: What performances for what purpose? A systematic review", *Parasite*, 28, 39.
89. Robinson S. (2012), "Neonatal posthemorrhagic hydrocephalus from prematurity: pathophysiology and current treatment concepts", *J Neurosurg Pediatr*, 9 (3), 242-258.
90. Rohit A., Maiti B., Shenoy S., Karunasagar I. (2016), "Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis", *Indian J Med Res*, 143 (1), 72-78.
91. Rosa-Mangeret F., Benski A. C., Golaz A., Zala P. Z., Kyokan M., Wagner N., et al. (2022), "2.5 Million Annual Deaths-Are Neonates in Low- and Middle-Income Countries Too Small to Be Seen? A Bottom-Up Overview on Neonatal Morbi-Mortality", *Trop Med Infect Dis*, 7 (5).
92. Roth Gregory A and Abate, Degu and Abate, Kalkidan Hassen and Abay, Solomon M and Abbafati, Cristiana and Abbasi, Nooshin and Abbastabar, Hedayat and Abd-Allah, Foad and Abdela, Jemal and Abdelalim, Ahmed and others (2018), "Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017", *Lancet*, 392 (10159), 1736-1788.
93. Sands K., Spiller O. B., Thomson K., Portal E. A. R., Iregbu K. C., Walsh T. R. (2022), "Early-Onset Neonatal Sepsis in Low- and Middle-Income Countries: Current Challenges and Future Opportunities", *Infect Drug Resist*, 15, 933-946.
94. Shah R., Jenda G., Lwisha V., Nsona H., Dadlani P., Swedberg E. (2018), "An integrated diagnostic device for neonatal sepsis and childhood pneumonia", *J Public Health Afr*, 9 (1), 780.
95. Simon T. D., Van Yserloo B., Nelson K., Gillespie D., Jensen R., McAllister J. P., 2nd, et al. (2014), "Use of quantitative 16S rRNA PCR to determine bacterial load does not augment conventional cerebrospinal fluid

(CSF) cultures among children undergoing treatment for CSF shunt infection”, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78 (2), 188-195.

96. Simonsen K. A., Anderson-Berry A. L., Delair S. F., Davies H. D. (2014), “Early-onset neonatal sepsis”, *Clin Microbiol Rev*, 27 (1), 21-47.

97. Suzuki S. (2019), “Association between clinical chorioamnionitis and histological funisitis at term”, *J Neonatal Perinatal Med*, 12 (1), 37-40.

98. Tsalik E. L., Jones D., Nicholson B., Waring L., Liesenfeld O., Park L. P., et al. (2010), “Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis”, *J Clin Microbiol*, 48 (1), 26-33.

99. Turhan E. E., Gürsoy T., Ovalı F. (2015), “Factors which affect mortality in neonatal sepsis”, *Turk Pediatri Ars*, 50 (3), 170-175.

100. van den Brand M., Peters R. P. H., Catsburg A., Rubenjan A., Broeke F. J., van den Dungen F. A. M., et al. (2014), “Development of a multiplex real-time PCR assay for the rapid diagnosis of neonatal late onset sepsis”, *J Microbiol Methods*, 106, 8-15.

101. Varghese A., Blaschke A. J., Korgenski E. K., Crandall H. (2023), “Neonatal Early-Onset Sepsis Due to Haemophilus Influenzae in Utah”, *Pediatr Infect Dis J*, 42 (3), e90-e92.

102. Villamor E., Norman M., Johansson S., Cnattingius S. (2021), “Maternal Obesity and Risk of Early-onset Neonatal Bacterial Sepsis: Nationwide Cohort and Sibling-controlled Studies”, *Clin Infect Dis*, 73 (9), e2656-e2664.

103. Viswanathan R., Singh A. K., Basu S., Chatterjee S., Sardar S., Isaacs D. (2012), “Multi-drug resistant gram negative bacilli causing early neonatal sepsis in India”, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 97 (3), F182-187.

104. Wekesa Y. N., Namusoke F., Sekikubo M., Mango D. W., Bwanga F. (2020), “Ceftriaxone- and ceftazidime-resistant Klebsiella species, Escherichia coli, and methicillin-resistant Staphylococcus aureus dominate caesarean surgical site infections at Mulago Hospital, Kampala, Uganda”, *SAGE Open Med*, 8, 2050312120970719.

105. Weston E. J., Pondo T., Lewis M. M., Martell-Cleary P., Morin C., Jewell B., et al. (2011), "The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008", *Pediatr Infect Dis J*, 30 (11), 937-941.
106. Wu Y. D., Chen L. H., Wu X. J., Shang S. Q., Lou J. T., Du L. Z., et al. (2008), "Gram stain-specific-probe-based real-time PCR for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis", *J Clin Microbiol*, 46 (8), 2613-2619.
107. Organization World Health. (2020, *Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions*, World Health Organization, Geneva.
108. Abdullah Muhammad, Khan Maria, Amjad Danyal, Shireen Farah (2021), "An Outbreak of Burkholderia Cepacia Septicemia in Neonatal Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital, Peshawar".
109. Adhisivam Bethou (2022), "Maternal Colonization of Group B Streptococcus and Neonatal Sepsis", *Indian Journal of Pediatrics*, 89 (12), 1171-1172.
110. Al-Matary Abdulrahman, Heena Humariya, AlSarheed Ayah S., Ouda Wafa, AlShahrani Dayel A., Wani Tariq A., et al. (2019), "Characteristics of neonatal Sepsis at a tertiary care hospital in Saudi Arabia", *Journal of Infection and Public Health*, 12 (5), 666-672.
111. Alhabbab Rowa Yousef (2018), *Treponema pallidum Hemagglutination (TPHA) Test*, Basic Serological Testing, Cham, Springer International Publishing, 35-39.
112. Ballot Daynia E, Bosman Noma, Nana Trusha, Ramdin Tanisha, Cooper Peter A (2013), "Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country", *Journal of tropical pediatrics*, 59 (6), 460-464.
113. Batool Alia, Yaqoob Asma, Anwar Zahid, Joshi Lovleen Tina, Batool Ramsha, Lone Durreshahwar, et al. (2023), "Outbreak investigation of NDM-producing Burkholderia cepacia causing neonatal sepsis in Pakistan", *Future Microbiology*, 18 (16), 1159–1169.
114. Beudeker Coco R, Vijlbrief Daniel C, van Montfrans Joris M, Rooijackers Suzan HM, Flier Michiel van der (2022), "Neonatal sepsis and

transient immunodeficiency: Potential for novel immunoglobulin therapies?”, *Frontiers in Immunology*, 13, 1016877.

115. Bharara Tanisha, Chakravarti Anita, Sharma Mukesh, Agarwal Priti (2020), “Investigation of Burkholderia cepacia complex bacteremia outbreak in a neonatal intensive care unit: a case series”, *Journal of medical case reports*, 14, 1-5.

116. Bilavsky Efraim, Watad Salmas, Levy Itzhak, Linder Nehama, Pardo Joseph, Ben-Zvi Haim, et al. (2017), “Positive IgM in Congenital CMV Infection”, *Clinical Pediatrics*, 56 (4), 371-375.

117. Briggs-Steinberg Courtney, Roth Philip (2023), “Early-Onset Sepsis in Newborns”, *Pediatrics In Review*, 44 (1), 14-22.

118. Chan G. J., Lee A. C., Baqui A. H., Tan J., Black R. E. (2013), “Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis”, *PLoS Med*, 10 (8), e1001502.

119. Chaurasia S., Sivanandan S., Agarwal R., Ellis S., Sharland M., Sankar M. J. (2019), “Neonatal sepsis in South Asia: huge burden and spiralling antimicrobial resistance”, *BMJ*, 364, k5314.

120. Chen Hsiao-Neng, Lee Meng-Luen, Yu Wai-Kit, Lin Yue-Wen, Tsao Lon-Yen (2009), “Late-onset Enterobacter cloacae sepsis in very-low-birth-weight neonates: experience in a medical center”, *Pediatrics & Neonatology*, 50 (1), 3-7.

121. Chen Lu, Zhao Yujuan, Wei Jiakai, Huang Wendi, Ma Ying, Yang Xuefeng, et al. (2022), “Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Neonatal Infectious Diseases”, *Microbiology Spectrum*, 10 (6), e01195-01122.

122. Chi Benjamin H, Mudenda Victor, Levy Jens, Sinkala Moses, Goldenberg Robert L, Stringer Jeffrey SA (2006), “Acute and chronic chorioamnionitis and the risk of perinatal human immunodeficiency virus-1 transmission”, *American journal of obstetrics and gynecology*, 194 (1), 174-181.

123. Chiu Charles Y, Miller Steven A (2019), “Clinical metagenomics”, *Nature Reviews Genetics*, 20 (6), 341-355.

124. Claassen-Weitz Shantelle, Lim Katherine YL, Mullally Christopher, Zar Heather J, Nicol Mark P (2021), "The association between bacteria colonizing the upper respiratory tract and lower respiratory tract infection in young children: a systematic review and meta-analysis", *Clinical Microbiology and Infection*, 27 (9), 1262-1270.
125. Corrales Isabel, Giménez Estela, Navarro David (2014), "Evaluation of the Architect Epstein-Barr Virus (EBV) Viral Capsid Antigen (VCA) IgG, VCA IgM, and EBV Nuclear Antigen 1 IgG Chemiluminescent Immunoassays for Detection of EBV Antibodies and Categorization of EBV Infection Status Using Immunofluorescence Assays as the Reference Method", *Clinical and Vaccine Immunology*, 21 (5), 684-688.
126. Dalben M, Varkulja G, Basso M, Krebs VLJ, Gibelli MA, Van der Heijden I, et al. (2008), "Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature", *Journal of Hospital Infection*, 70 (1), 7-14.
127. Davis Nicole M., Proctor Diana M., Holmes Susan P., Relman David A., Callahan Benjamin J. (2018), "Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data", *bioRxiv*, 221499.
128. de Vries Linda S (2019), "Viral infections and the neonatal brain", *Seminars in pediatric neurology*, 32, 100769.
129. Denisova Lia, Bel'kova N. L., Tulokhonov, II, Zaichikov E. F. (1999), "[Diversity of bacteria at various depths in the southern part of lake Baikal as detected by 16S rRNA sequencing]", *Mikrobiologiya*, 68 (4), 547-556.
130. Desouky Somaya M., Abd ElGlil Reem, Abd Almonaem Eman R., Abdelmoneim Eman Salah, AL-Tabbakh AL-Shaimaa M. (2021), "Automated Blood Culture versus Amplification of 16S rRNA Gene Method for Detection of Neonatal Septicemia", *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 30 (4), 39-45.
131. Dewan M. C., Rattani A., Mekary R., Glancz L. J., Yunusa I., Baticulon R. E., et al. (2018), "Global hydrocephalus epidemiology and incidence: systematic review and meta-analysis", *J Neurosurg*, 1-15.

132. Dimech Wayne, Panagiotopoulos Lena, Francis Barbara, Laven Nicholas, Marler Joan, Dickeson David, et al. (2008), "Evaluation of Eight Anti-Rubella Virus Immunoglobulin G Immunoassays That Report Results in International Units per Milliliter", *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (6), 1955-1960.
133. Ding Yijun, Wang Yajuan, Hsia Yingfen, Sharland Mike, Heath Paul T (2019), "Systematic review of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae causing neonatal sepsis in China", *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 18 (1), 1-8.
134. Eden Peter A. , Schmidt Thomas M. , Blakemore Richard P., Pace Norman R. (1991), "Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA-Specific DNA", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41 (2), 324-325.
135. Ellis Harold (2007), "The Spitz-Holter Valve", *Journal of Perioperative Practice*, 17 (10), 504-506.
136. Fernell E, Hagberg G, Hagberg B (1993), "Infantile hydrocephalus in preterm, low-birth-weight infants—a nationwide Swedish cohort study 1979–1988", *Acta Paediatrica*, 82 (1), 45-48.
137. Fernell E. , Hagberg B., Hagberg G., von Wendt L. (1986), "Epidemiology of Infantile Hydrocephalus in Sweden", *Acta Paediatrica*, 75 (6), 975-981.
138. Flanders Tracy M., Billingham Lori, Flibotte John, Heuer Gregory G. (2018), "Neonatal Hydrocephalus", *NeoReviews*, 19 (8), e467-e477.
139. Fleischmann Carolin, Reichert Felix, Cassini Alessandro, Horner Rosa, Harder Thomas, Markwart Robby, et al. (2021), "Global incidence and mortality of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis", *Archives of Disease in Childhood*, 106 (8), 745-752.
140. Fleischmann-Struzek C., Goldfarb D. M., Schlattmann P., Schlapbach L. J., Reinhart K., Kissoon N. (2018), "The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review", *Lancet Respir Med*, 6 (3), 223-230.

141. Fleischmann-Struzek Carolin, Goldfarb David M, Schlattmann Peter, Schlapbach Luregn J, Reinhart Konrad, Kisson Niranjan (2018), "The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review", *The Lancet Respiratory Medicine*, 6 (3), 223-230.
142. Garne Ester, Loane Maria, Addor Marie-Claude, Boyd Patricia A., Barisic Ingeborg, Dolk Helen (2010), "Congenital hydrocephalus – prevalence, prenatal diagnosis and outcome of pregnancy in four European regions", *European Journal of Paediatric Neurology*, 14 (2), 150-155.
143. Garner Julia S, Jarvis William R, Emori T Grace, Horan Teresa C, Hughes James M (1988), "CDC definitions for nosocomial infections, 1988", *American journal of infection control*, 16 (3), 128-140.
144. Georges Pius KM, Aurore Albane E, Marie-Paul B, Komba D, Ngando VK, Eteme A (2022), "Neonatal sepsis: highlights and controversies", *J Pediatr Neonatal*, 4 (1), 1-5.
145. Ghaith Doaa M, Zafer Mai Mahmoud, Said Halaa Mufeed, Elanwary Sherif, Elsaban Salwa, Al-Agamy Mohamed Hamed, et al. (2020), "Genetic diversity of carbapenem-resistant Klebsiella Pneumoniae causing neonatal sepsis in intensive care unit, Cairo, Egypt", *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39, 583-591.
146. Gilmour Leeyan S, Walls Tony (2023), "Congenital Syphilis: a Review of Global Epidemiology", *Clinical Microbiology Reviews*, e00126-00122.
147. Goswami Kavita, Sanan-Mishra Neeti (2022), *Chapter 7 - RNA-seq for revealing the function of the transcriptome* In: Singh DB, Pathak RK, Bioinformatics, Academic Press, 105-129.
148. Gunasekera GCS, Gunaratna GPS, Sathanantharajah R, Chandrasiri NS (2022), "Streptococcus pneumoniae-an uncommon cause of neonatal sepsis: two case reports", *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases*, 12 (1).
149. Guo Liyan, Han Wenxiao, Su Yan, Wang Na, Chen Xinqing, Ma Jinjin, et al. (2023), "Perinatal risk factors for neonatal early-onset sepsis: a meta-analysis of observational studies", *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 36 (2), 2259049.

150. Gupta Surya N (2015), "Late Onset Neonatal Herpes Encephalitis: A Case-Based CNS Complication and Neurological Outcome", *Open Access Library Journal*, 2 (02), 1.
151. Hadfield Brandon R, Cantey Joseph B (2021), "Neonatal bloodstream infections", *Current Opinion in Infectious Diseases*, 34 (5), 533-537.
152. He Yan, Caporaso J Gregory, Jiang Xiao-Tao, Sheng Hua-Fang, Huse Susan M, Rideout Jai Ram, et al. (2015), "Stability of operational taxonomic units: an important but neglected property for analyzing microbial diversity", *Microbiome*, 3 (1), 1-10.
153. Heath Paul T, Okike Ifeanyichukwu O (2010), "Neonatal bacterial meningitis: an update", *Paediatrics and child health*, 20 (11), 526-530.
154. Herremans T., Kortbeek L., Notermans D. W. (2010), "A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns", *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29 (5), 495-501.
155. Hochstetler Alexandra, Raskin Jeffrey, Blazer-Yost Bonnie L. (2022), "Hydrocephalus: historical analysis and considerations for treatment", *European Journal of Medical Research*, 27 (1), 168.
156. Hörner Andreas, Hörner Rosmari, Salla Adenilde, Nunes Melise Silveira, Garzon Litiérri Razia, Rampelotto Roberta Filipini, et al. (2015), "Staphylococcal scalded skin syndrome in a premature newborn caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus: case report", *Sao Paulo Medical Journal*, 133, 450-453.
157. Hsu J-F, Chu S-M, Huang Y-C, Lien R, Huang H-R, Lee C-W, et al. (2015), "Predictors of clinical and microbiological treatment failure in neonatal bloodstream infections", *Clinical Microbiology and Infection*, 21 (5), 482. e489-482. e417.
158. Hugenholtz Philip, Tyson Gene W (2008), "Metagenomics", *Nature*, 455 (7212), 481-483.
159. Isaacs Albert M, Morton Sarah U, Movassagh Mercedeh, Zhang Qiang, Hehnly Christine, Zhang Lijun, et al. (2020), "Central nervous system immune response in postinfectious hydrocephalus", *medRxiv*, 2020.2007.2030.20165332.

160. Işık Uğur, Özek M Memet (2018), “Clinical Findings of Children with Hydrocephalus”, *Pediatric Hydrocephalus*, 1.
161. James Scott H., Kimberlin David W. (2015), “Neonatal Herpes Simplex Virus Infection”, *Infectious Disease Clinics of North America*, 29 (3), 391-400.
162. Jatsho Jimba, Nishizawa Yoriko, Pelzom Dorji, Sharma Ragunath (2020), “Clinical and bacteriological profile of neonatal sepsis: a prospective hospital-based study”, *International journal of pediatrics*, 2020, 1-9.
163. Jean S. S., Lee W. S., Chen F. L., Ou T. Y., Hsueh P. R. (2014), “Elizabethkingia meningoseptica: an important emerging pathogen causing healthcare-associated infections”, *Journal of Hospital Infection*, 86 (4), 244-249.
164. Jordan Jeanne A., Durso Mary Beth (2005), “Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates Being Evaluated for Sepsis”, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 7 (5), 575-581.
165. Keseler Ingrid M, Collado-Vides Julio, Gama-Castro Socorro, Ingraham John, Paley Suzanne, Paulsen Ian T, et al. (2005), “EcoCyc: a comprehensive database resource for Escherichia coli”, *Nucleic acids research*, 33 (suppl_1), D334-D337.
166. Khandaker Gulam, Jung Jenny, Britton Philip N, King Catherine, Yin J Kevin, Jones Cheryl A (2016), “Long-term outcomes of infective encephalitis in children: a systematic review and meta-analysis”, *Developmental medicine & child neurology*, 58 (11), 1108-1115.
167. Khuroo Mohammad Sultan (2011), “Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane”, *Virus research*, 161 (1), 3-14.
168. Kimberlin David W (2002), “Meningitis in the neonate”, *Current treatment options in neurology*, 4, 239-248.
169. Lehmann Lutz Eric, Hunfeld Klaus-Peter, Steinbrucker Martina, Brade Volker, Book Malte, Seifert Harald, et al. (2010), “Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis”, *Intensive Care Medicine*, 36 (1), 49-56.

170. Liermann Kristin, Schäfler Anna, Henke Andreas, Sauerbrei Andreas (2014), "Evaluation of commercial herpes simplex virus IgG and IgM enzyme immunoassays", *Journal of Virological Methods*, 199, 29-34.
171. Limbrick David D., de Vries Linda S. (2022), "New insights into the management of post-hemorrhagic hydrocephalus", *Seminars in Perinatology*, 46 (5), 151597.
172. Lin Chein-Wei, Chiou Yee-Hsuan, Chen Ying-Yao, Huang Yung-Feng, Hsieh Kai-Sheng, Sung Ping-Kuang (1999), "Urinary tract infection in neonates", *Journal of Clinical Neuroscience*, 6 (2), 1-4.
173. Liptak Gregory S. (2007), *Hydrocephalus* In: Garfunkel LC, Kaczorowski JM, Christy C, Pediatric Clinical Advisor (Second Edition), Philadelphia, Mosby, 281-282.
174. Lucignano Barbara, Ranno Stefania, Liesenfeld Oliver, Pizzorno Beatrice, Putignani Lorenza, Bernaschi Paola, et al. (2011), "Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected Sepsis", *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (6), 2252-2258.
175. Machado J. R., Soave D. F., da Silva M. V., de Menezes L. B., Etchebehere R. M., Monteiro M. L., et al. (2014), "Neonatal sepsis and inflammatory mediators", *Mediators Inflamm*, 2014, 269681.
176. Mahich Swati, Angurana Suresh Kumar, Suthar Renu, Sundaram Venkateshan, Munda Vimal Singh, Gautam Vikas (2021), "Acinetobacter Sepsis Among Out-born Neonates Admitted to Neonatal Unit in Pediatric Emergency of a Tertiary Care Hospital in North India", *The Indian Journal of Pediatrics*, 88 (2), 127-133.
177. Malaki Majid (2015), "Klebsiella pneumoniae bacteremia presenting on a neonatal intensive care unit during the first week of life", *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 10 (01), 012-015.
178. Marguerat Samuel, Bähler Jürg (2010), "RNA-seq: from technology to biology", *Cellular and molecular life sciences*, 67, 569-579.

179. Megli Christina J., Coyne Carolyn B. (2022), "Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence", *Nature reviews microbiology*, 20 (2), 67-82.
180. Merrow A. Carlson, Luke L. Linscott, Sara M. O'Hara, Alexander J. Towbin, Michael R. Aquino, Randy R. Richardson, et al. (2017), *Neonatal Pneumonia*, Diagnostic Imaging: Pediatrics, Third Edition, Elsevier, 96-97.
181. Moftian Nazila, Rezaei-Hachesu Peyman, Arab-Zozani Morteza, Samad-Soltani Taha, Esfandiari Atefeh, Tabib Mohammad Saleh, et al. (2023), "Prevalence of gram-negative bacteria and their antibiotic resistance in neonatal sepsis in Iran: a systematic review and meta-analysis", *BMC Infectious Diseases*, 23 (1), 534.
182. Morton Sarah U., Hehnly Christine, Burgoine Kathy, Ssentongo Paddy, Ericson Jessica E., Kumar M. Senthil, et al. (2023), "Paenibacillus spp infection among infants with postinfectious hydrocephalus in Uganda: an observational case-control study", *The Lancet Microbe*, 4 (8), e601-e611.
183. Munch T. N., Rostgaard K., Rasmussen M. L., Wohlfahrt J., Juhler M., Melbye M. (2012), "Familial aggregation of congenital hydrocephalus in a nationwide cohort", *Brain*, 135 (Pt 8), 2409-2415.
184. Navgire Gauri S., Goel Neha, Sawhney Gifty, Sharma Mohit, Kaushik Prashant, Mohanta Yugal Kishore, et al. (2022), "Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach", *Biological Procedures Online*, 24 (1), 18.
185. Neu Natalie, Duchon Jennifer, Zachariah Philip (2015), "TORCH infections", *Clinics in perinatology*, 42 (1), 77-103.
186. Nguyen TQN, Skinner A, Pham T Nguyen, Cao TML, Narchi H (2023), "Symptomatic neonatal congenital infections in North Vietnam: a single-centre observational study", *Infectious Diseases and Tropical Medicine* 9:e1219.
187. Noah FN, Doya LJ, Jouni O (2022), "Perinatal risk factors and early onset of neonatal sepsis", *Int J Pediatr Res*, 8 (1), 088.
188. Noviyani Ni Made Reditya, Kardana I Made, Mahalini Dewi Sutriani, Suparyatha Ida Bagus Gede, Ariawati Ketut, Nilawati Gusti Ayu Putu, et al. (2021), "The Risk Factors of Bacterial Meningitis in Late-Onset Neonatal

Sepsis”, *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9 (B), 1224-1228.

189. Odabasi I. O., Bulbul A. (2020), “Neonatal Sepsis”, *Sisli Etfal Hastan Tip Bul*, 54 (2), 142-158.

190. Odabasi Ilkay Ozmeral, Bulbul Ali (2020), “Neonatal sepsis”, *The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital*, 54 (2), 142.

191. Odabasi Ilkay Ozmeral, Bulbul Ali (2020), “Neonatal sepsis”, *Şişli Etfal Hastanesi Tip Bülteni*, 54 (2), 142-158.

192. Oeser C., Pond M., Butcher P., Bedford Russell A., Henneke P., Laing K., et al. (2020), “PCR for the detection of pathogens in neonatal early onset sepsis”, *PLoS One*, 15 (1), e0226817.

193. Okomo Uduak, Akpalu Edem NK, Le Doare Kirsty, Roca Anna, Cousens Simon, Jarde Alexander, et al. (2019), “Aetiology of invasive bacterial infection and antimicrobial resistance in neonates in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis in line with the STROBE-NI reporting guidelines”, *The Lancet Infectious Diseases*, 19 (11), 1219-1234.

194. Okomo Uduak, Senghore Madikay, Darboe Saffiatou, Bojang Ebrima, Zaman Syed MA, Hossain Mohammad Jahangir, et al. (2020), “Investigation of sequential outbreaks of *Burkholderia cepacia* and multidrug-resistant extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* species in a West African tertiary hospital neonatal unit: a retrospective genomic analysis”, *The Lancet Microbe*, 1 (3), e119-e129.

195. Ong Leong Tung, Fan Si Wei David (2022), “The association between congenital cytomegalovirus infection and cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis”, *Journal of Paediatrics and Child Health*, 58 (12), 2156-2162.

196. Paulson Joseph N, Williams Brent L, Hehnly Christine, Mishra Nischay, Sinnar Shamim A, Zhang Lijun, et al. (2020), “The bacterial and viral complexity of postinfectious hydrocephalus in Uganda”, *Science translational medicine*, 12 (563).

197. Pesch Megan H, Schleiss Mark R (2022), “Emerging concepts in congenital cytomegalovirus”, *Pediatrics*, 150 (2), e2021055896.

198. Pourabbas Bahman, Rezaei Zahra, Mardaneh Jalal, Shahian Mozghan, Alborzi Abdolvahab (2018), "Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections among pregnant women and eye colonization of their neonates at birth time, Shiraz, Southern Iran", *BMC Infectious Diseases*, 18 (1), 1-4.
199. Priluck Aaron, Ramulu Pradeep, Dosto Niccolo, Quigley Harry, Abraham Alison (2023), "Validation of 16S rRNA Gene Sequencing of the Periocular Microbiome and Lack of Alteration by Topical Eyedrops", *Translational Vision Science & Technology*, 12 (2), 32-32.
200. Puopolo Karen M., Benitz William E., Zaoutis Theoklis E., Cummings James, Juul Sandra, Hand Ivan, et al. (2018), "Management of Neonates Born at ≥ 35 0/7 Weeks' Gestation With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis", *Pediatrics*, 142 (6).
201. Raimondi A. J. (1994), "A unifying theory for the definition and classification of hydrocephalus", *Childs Nerv Syst*, 10 (1), 2-12.
202. Rainey Frederick A., Stackebrandt Erko (2000), *rDNA Amplification: Application of 16S rDNA-Based Methods for Bacterial Identification* In: Kessler C, Nonradioactive Analysis of Biomolecules, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 396-406.
203. Ravi Vidhya, Vijay D Danis, Sujhithra A, Jayanthi S, Subramanian T Kathir, Harish N (2022), "Neonatal Sepsis: The impact of Hypervirulent Klebsiella pneumonia in a Tertiary Care Hospital", *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16 (3).
204. Rawat Shuveksha, Neeraj Kumar, Preeti Kothiyal, Prashant Mathur (2013), "A review on type, etiological factors, definition, clinical features, diagnosis management and prevention of neonatal sepsis", *Journal of scientific and innovative research*, 2 (4), 802-813.
205. Reeder Janina, Huang Mo, Kaminker Joshua S, Paulson Joseph N (2021), "MicrobiomeExplorer: an R package for the analysis and visualization of microbial communities", *Bioinformatics*, 37 (9), 1317-1318.
206. Rekate Harold L, Blitz Ari M (2016), "Hydrocephalus in children", *Handbook of clinical neurology*, 136, 1261-1273.

207. Rodriguez Beatriz Fernandez, Mascaraque Luis Rubio, Fraile Leticia Ruiz, Perez Irene Cuadrado, Kuder Krzysztof (2015), "Streptococcus Pneumoniae: The Forgotten Microorganism in Neonatal Sepsis", *Fetal and Pediatric Pathology*, 34 (3), 202-205.
208. Roth Andreas, Fischer Marga, Hamid Mohamed E, Michalke Sabine, Ludwig Wolfgang, Mauch Harald (1998), "Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences", *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (1), 139-147.
209. Sacchi Claudio T, Whitney Anne M, Mayer Leonard W, Morey Roger, Steigerwalt Arnold, Boras Ariana, et al. (2002), "Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of Bacillus anthracis", *Emerging infectious diseases*, 8 (10), 1117.
210. Salipante Stephen J, Sengupta Dhruba J, Rosenthal Christopher, Costa Gina, Spangler Jessica, Sims Elizabeth H, et al. (2013), "Rapid 16S rRNA next-generation sequencing of polymicrobial clinical samples for diagnosis of complex bacterial infections", *PloS one*, 8 (5), e65226.
211. Seña Arlene C., White Becky L., Sparling P. Frederick (2010), "Novel Treponema pallidum Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century", *Clinical Infectious Diseases*, 51 (6), 700-708.
212. Shadbolt Rachel, We Michael Lee Shee, Kohan Rolland, Porter Michelle, Athalye-Jape Gayatri, Nathan Elizabeth, et al. (2022), "Neonatal Staphylococcus Aureus Sepsis: a 20-year Western Australian experience", *Journal of Perinatology*, 42 (11), 1440-1445.
213. Shane Andi L, Sánchez Pablo J, Stoll Barbara J (2017), "Neonatal sepsis", *The Lancet*, 390 (10104), 1770-1780.
214. Shane Andi L, Stoll Barbara J (2014), "Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes", *Journal of Infection*, 68, S24-S32.
215. Shehab El-Din E. M., El-Sokkary M. M., Bassiouny M. R., Hassan R. (2015), "Epidemiology of Neonatal Sepsis and Implicated Pathogens: A Study from Egypt", *Biomed Res Int*, 2015, 509484.

216. Siddiqui Tasneem, Sahu Chinmoy, Patel Sangram Singh, Ghoshal Ujjala (2022), "Clinical and microbiological profile of patients with bloodstream infections caused by *Burkholderia cepacia* complex", *Journal of Laboratory Physicians*, 14 (03), 312-316.
217. Silasi Michelle, Cardenas Ingrid, Kwon Ja-Young, Racicot Karen, Aldo Paula, Mor Gil (2015), "Viral infections during pregnancy", *American journal of reproductive immunology*, 73 (3), 199-213.
218. Simon T. D., Riva-Cambrin J., Srivastava R., Bratton S. L., Dean J. M., Kestle J. R., et al. (2008), "Hospital care for children with hydrocephalus in the United States: utilization, charges, comorbidities, and deaths", *J Neurosurg Pediatr*, 1 (2), 131-137.
219. Sims David, Sudbery Ian, Ilott Nicholas E., Heger Andreas, Ponting Chris P. (2014), "Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses", *Nature Reviews Genetics*, 15 (2), 121-132.
220. Somayaji Ranjani, Yau Yvonne CW, Tullis Elizabeth, LiPuma John J, Ratjen Felix, Waters Valerie (2020), "Clinical outcomes associated with *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis", *Annals of the American Thoracic Society*, 17 (12), 1542-1548.
221. Steer Andrew C, Danchin Margaret H, Carapetis Jonathan R (2007), "Group A streptococcal infections in children", *Journal of Paediatrics and Child Health*, 43 (4), 203-213.
222. Stoll B. J., Hansen N. I., Sanchez P. J., Faix R. G., Poindexter B. B., Van Meurs K. P., et al. (2011), "Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues", *Pediatrics*, 127 (5), 817-826.
223. Stoll Barbara J, Hansen Nellie, Fanaroff Avroy A, Wright Linda L, Carlo Waldemar A, Ehrenkranz Richard A, et al. (2002), "Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network", *Pediatrics*, 110 (2), 285-291.
224. Stoll Barbara J, Hansen Nellie I, Sánchez Pablo J, Faix Roger G, Poindexter Brenda B, Van Meurs Krisa P, et al. (2011), "Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues", *Pediatrics*, 127 (5), 817-826.

225. Stoll Barbara J, Puopolo Karen M, Hansen Nellie I, Sánchez Pablo J, Bell Edward F, Carlo Waldemar A, et al. (2020), “Early-onset neonatal sepsis 2015 to 2017, the rise of *Escherichia coli*, and the need for novel prevention strategies”, *JAMA pediatrics*, 174 (7), e200593-e200593.
226. Vainionpää Anne, Tuomi Jenni, Kantola Saara, Anttonen Vuokko (2019), “Neonatal thrush of newborns: Oral candidiasis?”, *Clinical and Experimental Dental Research*, 5 (5), 580-582.
227. van den Brand Marre, van den Dungen Frank A. M., Bos Martine P., van Weissenbruch Mirjam M., van Furth A. Marceline, de Lange Annemieke, et al. (2018), “Evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of bacterial DNA directly in blood of preterm neonates with suspected late-onset sepsis”, *Critical Care*, 22 (1), 105.
228. Wagstaff Jadon S, Durrant Robert J, Newman Michael G, Eason Rachael, Ward Robert M, Sherwin Catherine MT, et al. (2019), “Antibiotic treatment of suspected and confirmed neonatal sepsis within 28 days of birth: a retrospective analysis”, *Frontiers in pharmacology*, 10, 1191.
229. Wang Congcong, Li Jichen, Liu Ying, Sun Qiang, Liu Zhijun (2023), “Pathogenesis of enterovirus infection in central nervous system”, *Biosafety and Health*, 5 (4), 233-239.
230. Wang Ying, Zhao Jingyi, Yao Yinhui, Yang Lan, Zhao Dan, Liu Shiquan (2021), “The Accuracy of 16S rRNA Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Meta-Analysis”, *BioMed research international*, 2021, 5550387.
231. Wang Zhong, Gerstein Mark B., Snyder Michael (2009), “RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics”, *Nature Reviews Genetics*, 10, 57-63.
232. Warf B. C., Alkire B. C., Bhai S., Hughes C., Schiff S. J., Vincent J. R., et al. (2011), “Costs and benefits of neurosurgical intervention for infant hydrocephalus in sub-Saharan Africa”, *J Neurosurg Pediatr*, 8 (5), 509-521.
233. Weller Thomas H (1971), “The Cytomegaloviruses: Ubiquitous Agents with Protean Clinical Manifestations: (Second of Two Parts)”, *New England Journal of Medicine*, 285 (5), 267-274.

234. Whitehead William E, Weiner Howard L (2022), “Infantile and childhood hydrocephalus”, *New England Journal of Medicine*, 387 (22), 2067-2073.
235. Woo P. C. Y., Lau S. K. P., Teng J. L. L., Tse H., Yuen K. Y. (2008), “Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories”, *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (10), 908-934.
236. Yadav Ashok K, Wilson CG, Prasad PL, Menon PK (2005), “Polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis”, *Indian pediatrics*, 42 (7), 681.
237. Yamada Hiroyuki, Kurooka Yusuke, Fujimoto Masafumi, Ueda Masaaki, Minato Toshinori (2022), “The Occurrence of Early-Onset Neonatal *Streptococcus pneumoniae* Infection as a Result of Intrapartum Infection”, *Cureus*, 14 (12).
238. Yi Ling, Wan Chaomin, Deng Changfei, Li Xiaohong, Deng Kui, Mu Yi, et al. (2017), “Changes in prevalence and perinatal outcomes of congenital hydrocephalus among Chinese newborns: a retrospective analysis based on the hospital-based birth defects surveillance system”, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 17 (1), 406.
239. Yu Mingzhao, Peterson Mallory R., Cherukuri Venkateswararao, Hehnly Christine, Mbabazi-Kabachelor Edith, Mulondo Ronnie, et al. (2023), “Infection diagnosis in hydrocephalus CT images: a domain enriched attention learning approach”, *Journal of Neural Engineering*, 20 (3), 036033.
240. Zhao Junhui, Zheng Beiwen, Xu Hao, Li Junfeng, Sun Tengfei, Jiang Xiawei, et al. (2022), “Emergence of a NDM-1-producing ST25 *Klebsiella pneumoniae* strain causing neonatal sepsis in China”, *Frontiers in Microbiology*, 13, 980191.

PHỤ LỤC 1. Quy trình vận chuyển và bảo quản mẫu máu và dịch não tủy

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG	Mã số: Lần ban hành: Ngày hiệu lực: / / 2015 Tổng số trang:
	QUY TRÌNH VẬN CHUYỂN VÀ BẢO QUẢN MẪU MÁU	

	Họ tên	Ký tên	Ngày
Biên soạn/ Sửa đổi	Ths Phạm Thanh Hải		 / / ...
Xem xét	PGS.TS Hoàng Thị Thu Hà		 / / ...
			 / / ...
Phê duyệt	PGS.TS Hoàng Thị Thu Hà		 / / ...

THEO DÕI LỊCH SỬ TÀI LIỆU

Lần ban hành	Ngày hiệu lực	Nội dung sửa đổi	Vị trí sửa đổi	Lần ban hành

1. Mục đích

Vận chuyển và bảo quản đúng kỹ thuật, để thực hiện xét nghiệm vi khuẩn gây bệnh

2. Phạm vi

Phạm vi áp dụng của quy trình được thực hiện tại các phòng xét nghiệm tuyến trung ương và tuyến tỉnh.

3. Phương pháp:

Mẫu máu được lấy tại các cơ sở y tế, theo qui trình chuẩn của Bộ y tế.

Huyết thanh có thể được tách tại cơ sở y tế hoặc được tách ở phòng thí nghiệm, nơi xét nghiệm mẫu

4. Trách nhiệm

4.1. Trưởng khoa:

- Phê duyệt quy trình kỹ thuật.

4.2. Trưởng phòng thí nghiệm:

- Phê duyệt quy trình kỹ thuật
- Cập nhật các thay đổi của quy trình

4.3. Cán bộ đầu mối:

- Lập kế hoạch phê duyệt phương pháp
- Lựa chọn và kiểm tra bộ mẫu cho phê duyệt phương pháp xét nghiệm
- Kiểm soát chất lượng toàn bộ qui trình
- Cập nhật các thay đổi của qui trình

4.4. Nhân viên PTN:

- Thực hiện bảo quản và vận chuyển mẫu đúng qui định
- Thực hiện tách huyết thanh
- Hoàn tất báo cáo và giấy tờ liên quan đến mẫu

5. Dụng cụ, thiết bị

- Hộp vận chuyển mẫu theo qui định của Bộ y tế, đảm bảo an toàn sinh học

- Tủ lạnh thường, âm 20 độ C
- Hộp đựng mẫu
- Tube vô trùng để đựng mẫu
- Giá đựng mẫu
- Bút viết kính không xóa được
- Găng tay, khẩu trang
- Túi đựng rác thải y tế có nhãn hiệu sinh học

6. Vận chuyển mẫu

6.1. Đóng gói mẫu

- Tất cả các mẫu bệnh phẩm phải được đóng chặt nắp và xếp thẳng đứng trong giá đựng mẫu.
- Khi vận chuyển giá đựng bệnh phẩm phải được để trong túi nilon dán kín, bên dưới có lót bông hoặc giấy thấm nước, sau đó đặt vào hộp vận chuyển mẫu có khóa an toàn, nếu không có khóa an toàn cần dùng băng dính dán xung quanh, cố định giá vào hộp vận chuyển mẫu, chèn túi lạnh xung quanh để đảm bảo nhiệt độ vận chuyển từ 2 đến 10°C.
- Dán nhãn có ký hiệu nguy hiểm sinh học bên ngoài hộp vận chuyển bệnh phẩm. Trường hợp không có nhãn nguy hiểm sinh học thì phải có ghi rõ mọi thông tin và số điện thoại liên hệ bên ngoài của hộp vận chuyển mẫu bệnh phẩm.
- Không để danh sách mẫu vào trong hộp vận chuyển mẫu.

6.2. Vận chuyển mẫu

- Vận chuyển mẫu bệnh phẩm phải tuân thủ các quy định của quốc gia và chính quyền địa phương về vận chuyển mẫu các tác nhân có khả năng gây bệnh.
- Nơi gửi mẫu nên gọi điện báo trước cho phòng xét nghiệm biết thời gian bệnh phẩm sẽ tới, để phòng xét nghiệm bố trí cán bộ tiếp nhận.
- Bệnh phẩm gửi đi phải kèm theo phiếu xét nghiệm điền đầy đủ các thông tin.

- Mẫu bệnh phẩm phải được bảo quản lạnh trong suốt quá trình vận chuyển.
- Trong quá trình vận chuyển mẫu phải buộc chặt hộp chứa mẫu bệnh phẩm vào giá chở hàng, đảm bảo gọn gàng, tránh đổ, vỡ.

7. Tiếp nhận mẫu

- Kiểm tra nhiệt độ trong hộp vận chuyển, kiểm tra tình trạng mẫu, đối chiếu thông tin trên ống đựng máu, phiếu xét nghiệm và sổ vận chuyển mẫu.
- Thông báo cho nơi gửi xét nghiệm lấy lại mẫu trong trường hợp: máu bị đông, huyết thanh đã bị tán huyết, mẫu không được vận chuyển đúng nhiệt độ, mẫu không đủ thể tích yêu cầu, mẫu được vận chuyển đến quá thời gian qui định.
- Thông báo cho nơi gửi mẫu xét nghiệm bổ sung thông tin trong trường hợp: thiếu thông tin về địa chỉ, ngày, thu thập mẫu trên phiếu xét nghiệm.
- Ký nhận vào phiếu gửi mẫu và ghi chép thông tin vào sổ nhận mẫu.

8. Bảo quản mẫu xét nghiệm

- Mẫu huyết thanh nếu xét nghiệm trong vòng 7 ngày phải bảo quản ở nhiệt độ 4 – 8°C. Nếu tiến hành xét nghiệm sau 7 ngày cần bảo quản ở nhiệt độ âm 20° C hoặc lạnh hơn. Tuy nhiên, mẫu không được tan đông quá 3 lần.
- Các ống nghiệm lưu mẫu ở nhiệt độ âm sâu phải là các ống nghiệm chuyên dụng. Phải ghi rõ thông tin về mẫu trên ống nghiệm bằng loại mực không xóa được.
- Các mẫu khi lưu phải có mã số và ghi chép trong sổ lưu mẫu theo qui định.

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG	Mã số: Lần ban hành: Ngày hiệu lực: / /2015 Tổng số trang:
	QUY TRÌNH VẬN CHUYỂN VÀ BẢO QUẢN MẪU DỊCH NÃO TỦY	

	Họ tên	Ký tên	Ngày
Biên soạn/ Sửa đổi	Ths Phạm Thanh Hải		 / / ...
Xem xét	PGS.TS Hoàng Thị Thu Hà		 / / ...
			 / / ...
Phê duyệt	PGS.TS Hoàng Thị Thu Hà		 / / ...

THEO DÕI LỊCH SỬ TÀI LIỆU

Lần ban hành	Ngày hiệu lực	Nội dung sửa đổi	Vị trí sửa đổi	Lần ban hành

1. Mục đích

Vận chuyển và bảo quản mẫu đúng kỹ thuật, để thực hiện xét nghiệm tác nhân gây bệnh

2. Phạm vi

Phạm vi áp dụng của quy trình được thực hiện tại các phòng xét nghiệm tuyến trung ương và tuyến tỉnh.

3. Phương pháp:

- Mẫu được lấy tại các cơ sở y tế, theo qui trình chuẩn của Bộ y tế.
- Mẫu xét nghiệm cần phải được lấy do các bác sĩ hoặc những người có kinh nghiệm. Dịch não tủy được dùng để chẩn đoán virus, vi khuẩn, ký sinh trùng và viêm màng não do nấm.

4. Trách nhiệm

4.1. Trưởng khoa:

- Phê duyệt quy trình kỹ thuật.

4.2. Trưởng phòng thí nghiệm:

- Phê duyệt quy trình kỹ thuật
- Cập nhật các thay đổi của quy trình

4.3. Cán bộ đầu mối:

- Lập kế hoạch phê duyệt phương pháp
- Lựa chọn và kiểm tra bộ mẫu cho phê duyệt phương pháp xét nghiệm
- Kiểm soát chất lượng toàn bộ qui trình
- Cập nhật các thay đổi của qui trình

4.4. Nhân viên PTN:

- Thực hiện bảo quản và vận chuyển mẫu đúng qui định
- Hoàn tất báo cáo và giấy tờ liên quan đến mẫu

5. Dụng cụ, thiết bị

- Hộp vận chuyển mẫu theo qui định của Bộ y tế, đảm bảo an toàn sinh học
- Tủ lạnh thường
- Hộp đựng mẫu
- Tube vô trùng để đựng mẫu
- Giá đựng mẫu
- Bút viết kính không xóa được
- Găng tay, khẩu trang
- Túi đựng rác thải y tế có nhãn hiệu sinh học

6. Vận chuyển mẫu

6.3. Đóng gói mẫu

- Tất cả các mẫu bệnh phẩm phải được đóng chặt nắp và xếp thẳng đứng trong giá đựng mẫu.
- Khi vận chuyển giá đựng bệnh phẩm phải được để trong túi nilon dán kín, bên dưới có lót bông hoặc giấy thấm nước, sau đó đặt vào hộp vận chuyển mẫu có khóa an toàn, nếu không có khóa an toàn cần dùng băng dính dán xung quanh, cố định giá vào hộp vận chuyển mẫu, chèn túi lạnh xung quanh để đảm bảo nhiệt độ vận chuyển từ 2 đến 10°C, trừ một số vi khuẩn không để lạnh.
- Dán nhãn có ký hiệu nguy hiểm sinh học bên ngoài hộp vận chuyển bệnh phẩm. Trường hợp không có nhãn nguy hiểm sinh học thì phải có ghi rõ mọi thông tin và số điện thoại liên hệ bên ngoài của hộp vận chuyển mẫu bệnh phẩm.
- Không để danh sách mẫu vào trong hộp vận chuyển mẫu.

6.4. Vận chuyển mẫu

- - Mẫu xét nghiệm nên gửi tới phòng thí nghiệm để xử lý càng sớm càng tốt.
- - Mẫu dịch não tủy cho xét nghiệm vi khuẩn được vận chuyển trong điều kiện nhiệt độ môi trường, nói chung là không cần môi trường vận chuyển. Không được để đông đá vì nhiều tác nhân gây bệnh sẽ không tồn tại trong điều kiện nhiệt độ thấp. Chẳng hạn như vi khuẩn não mô cầu sẽ bị chết nếu như để nhiệt độ lạnh.
- - Mẫu dịch não tủy cho phân lập virus không cần môi trường vận chuyển. Chúng có thể vận chuyển ở điều kiện 4 - 8oC, thời gian trong 48 giờ, hoặc - 70oC cho thời gian kéo dài hơn.
- Vận chuyển mẫu bệnh phẩm phải tuân thủ các quy định của quốc gia và chính quyền địa phương về vận chuyển mẫu các tác nhân có khả năng gây bệnh.
- Nơi gửi mẫu nên gọi điện báo trước cho phòng xét nghiệm biết thời gian bệnh phẩm sẽ tới, để phòng xét nghiệm bố trí cán bộ tiếp nhận.
- Bệnh phẩm gửi đi phải kèm theo phiếu xét nghiệm điền đầy đủ các thông tin.
- Trong quá trình vận chuyển mẫu phải buộc chặt hộp chứa mẫu bệnh phẩm vào giá chở hàng, đảm bảo gọn gàng, tránh đổ, vỡ.

9. Tiếp nhận mẫu

- Kiểm tra nhiệt độ trong hộp vận chuyển, kiểm tra tình trạng mẫu, đối chiếu thông tin trên ống đựng mẫu, phiếu xét nghiệm và sổ vận chuyển mẫu.
- Thông báo cho nơi gửi xét nghiệm lấy lại mẫu trong trường hợp: mẫu không được vận chuyển đúng nhiệt độ, mẫu không đủ thể tích yêu cầu, mẫu được vận chuyển đến quá thời gian qui định.
- Thông báo cho nơi gửi mẫu xét nghiệm bổ sung thông tin trong trường hợp: thiếu thông tin về địa chỉ, ngày, thu thập mẫu trên phiếu xét nghiệm.
- Ký nhận vào phiếu gửi mẫu và ghi chép thông tin vào sổ nhận mẫu.

10. Bảo quản mẫu xét nghiệm

- Mẫu dịch não tủy nếu không được xét nghiệm ngay cần bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh 4 - 8°C trong 48 giờ, trừ một số vi khuẩn, đối với tác nhân là virus có thể để ở - 70°C trong thời gian dài hơn
- Các ống nghiệm lưu mẫu ở nhiệt độ âm sâu phải là các ống nghiệm chuyên dụng. Phải ghi rõ thông tin về mẫu trên ống nghiệm bằng loại mực không xóa được.
- Các mẫu khi lưu phải có mã số và ghi chép trong sổ lưu mẫu theo qui định.

PHỤ LỤC 2. Các biến số nghiên cứu

Mã số	Tên biến	Định nghĩa	Loại biến/Chỉ số	Phương pháp thu thập
A. Mục tiêu 1: Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh Não úng thủy và nhiễm khuẩn sơ sinh				
A	Phân loại	Não úng thủy hay Nhiễm khuẩn khuyết	Nhị phân	Bệnh án
B. Nguồn thông tin				
B01	Tên bệnh viện	Nơi điều trị đầu tiên – Nhi TW hoặc BV khác (ghi rõ)	Phân hạng	Bệnh án, giấy chuyển viện
B02	Họ và tên bác sĩ	Tên BS điều trị	Văn bản	Bệnh án
B03	Số ĐT BS	Số ĐT của BS điều trị (dùng cho theo dõi sau này)	Định danh	Bệnh án
C. Thông tin chung về bệnh nhân				
C01	Tên	Tên gọi thường ngày	Định danh	Bệnh án
C02	Giới tính	Phân chia 02 giới nam và nữ	Nhị phân	Bệnh án/hỏi
C03	Ngày tháng năm sinh	Ngày sinh theo dương lịch	Ngày tháng	Bệnh án/hỏi

C04	Tuổi	Tính từ năm sinh ra đến thời điểm điều tra. Tính theo tháng	Rời rạc	Bệnh án/hỏi
C05	Họ và tên mẹ hoặc bố	Tên đầy đủ của mẹ hoặc bố	Định danh	Bệnh án/hỏi
C06	Địa chỉ	Địa chỉ chi tiết đến số nhà/thôn	Định danh	Bệnh án/hỏi
C07	Số ĐT liên hệ	Số ĐT của bố hoặc mẹ	Định danh	Bệnh án/hỏi
D. Triệu chứng lâm sàng				
E01	Ngày vào viện	Ngày vào viện lần này	Ngày tháng	Bệnh án/Hỏi
E02	Sốt	Sốt trên 38 độ C	Phân hạng (Có/Không/Không rõ)	Bệnh án/Hỏi
E03	Đau đầu	Bị đau đầu	Phân hạng	Bệnh án/Hỏi
E04	Co giật	Bị co giật	Phân hạng	Bệnh án/Hỏi
E05	Lơ mơ	Tình trạng lơ mơ	Phân hạng	Bệnh án/Hỏi
E06	Cứng gáy	Bị cứng gáy	Phân hạng	Bệnh án/Hỏi
E07	Thay đổi tinh thần	Tình trạng thay đổi tinh thần	Phân hạng	Bệnh án/Hỏi
E08	Nôn	Bị nôn	Phân hạng	Bệnh án/Hỏi

E09	Thóp phồng	Tình trạng có phồng thóp	Phân hạng	Bệnh án/Hỏi
E10	Điểm Glasgow	Điểm Glasgow ghi nhận được tại thời điểm nhập viện	Liên tục	Bệnh án/Hỏi
E. Kết quả xét nghiệm tại bệnh viện				
<i>E01. Xét nghiệm miễn dịch của các tác nhân phổ biến (CMV, HSV, Rubella, RSV, Toxoplasma, Treponema...)</i>				
E01.1.1	Mẫu dịch não tủy	Ngày lấy mẫu DNT	Ngày tháng	Bệnh án
E01.1.2	Mẫu dịch não tủy	Ngày nhận mẫu DNT	Ngày tháng	Bệnh án
E01.1.3	Mẫu dịch não tủy	Ngày xét nghiệm DNT	Ngày tháng	Bệnh án
E01.1.4	Mẫu dịch não tủy	Kết quả miễn dịch DNT	Danh mục	Bệnh án
E01.2.1	Huyết thanh 1	Ngày lấy mẫu máu	Ngày tháng	Bệnh án
E01.2.2	Huyết thanh 1	Ngày nhận mẫu máu	Ngày tháng	Bệnh án
E01.2.3	Huyết thanh 1	Ngày xét nghiệm	Ngày tháng	Bệnh án
E01.2.4	Huyết thanh 1	Kết quả miễn dịch xét nghiệm máu	Danh mục	Bệnh án
E01.3.1	Mẫu phân	Ngày lấy mẫu phân	Ngày tháng	Bệnh án

E01.3.2	Mẫu phân	Ngày nhận mẫu phân	Ngày tháng	Bệnh án
E01.3.3	Mẫu phân	Ngày xét nghiệm	Ngày tháng	Bệnh án
E01.3.4	Mẫu phân	Kết quả miễn dịch mẫu phân	Danh mục	Bệnh án
E02	<i>Kết quả chẩn đoán hình ảnh</i>	<i>Kết quả chẩn đoán hình ảnh ghi nhận được khi làm xét nghiệm tại bệnh viện</i>	<i>Định tính</i>	<i>Bệnh án</i>
<i>E03. Xét nghiệm vi khuẩn học</i>				
E03.1.1	Nhuộm Gram	Ngày nhuộm gram	Ngày tháng	Bệnh án
E03.1.2	Nhuộm Gram	Tên vi khuẩn phát hiện được (nếu có)	Định tính	Bệnh án
E03.2.1	Phản ứng ngưng kết hạt Latex	Ngày làm phản ứng ngưng kết hạt Latex	Ngày tháng	Bệnh án
E03.2.2	Phản ứng ngưng kết hạt Latex	Tên vi khuẩn phát hiện được (nếu có)	Định tính	Bệnh án
E03.3.1	Nuôi cấy	Ngày nhuộm gram	Ngày tháng	Bệnh án
E03.3.2	Nuôi cấy	Tên vi khuẩn phát hiện được (nếu có)	Định tính	Bệnh án
<i>E04. Xét nghiệm sinh học phân tử</i>				

E04.1	Có làm xét nghiệm PCR	Có làm xét nghiệm PCR không hay không rõ	Danh mục	Bệnh án
E04.2	Ngày nhận mẫu	Ngày nhận mẫu	Ngày tháng	Bệnh án
E04.3	Kết quả PCR	Kết quả PCR dương tính hay âm tính	Nhi phân	Bệnh án
E04.4	Tên vi khuẩn/ vi rút	Tên vi khuẩn/ vi rút phát hiện được	Danh mục	Bệnh án

F. Thông tin điều tra viên

F01	Họ và tên	Họ tên người điều tra	Định tính	Phiếu hỏi
F02	Chức vụ	Chức vụ của người điều tra	Định tính	Phiếu hỏi
F03	Ngày điều tra	Ngày tiến hành điều tra	Ngày tháng	Phiếu hỏi
F04	Ngày hoàn tất	Ngày hoàn tất điều tra	Ngày tháng	Phiếu hỏi

G. Phần dành cho PTN vi khuẩn của Viện VSDT TU

G01	Có làm xét nghiệm PCR	Có làm xét nghiệm PCR không hay không rõ	Danh mục	Bệnh án/Hỏi
G02	Ngày nhận mẫu	Ngày nhận mẫu	Ngày tháng	Bệnh án/Hỏi

G03	Ngày xét nghiệm	Ngày làm xét nghiệm	Ngày tháng	Bệnh án/Hỏi
G04.1	Kết quả PCR	Kết quả PCR dương tính hay âm tính	Nhị phân	Bệnh án/Hỏi
G04.2	Tên vi khuẩn	Tên loại vi khuẩn định danh được	Danh mục	Bệnh án/Hỏi
G04.3	Typ huyết thanh	Typ huyết thanh (nếu có)	Định tính	Bệnh án/Hỏi
G04.4	Họ tên	Họ và tên kỹ thuật viên	Định tính	Bệnh án/Hỏi
H. Phần dành cho PTN Đại học Bang Pennsylvania				
<i>H01. Giải trình tự 16S rRNA</i>				
H01.1	Loại mẫu	Mẫu dịch não tủy/mẫu máu	Danh mục	Số nhận mẫu
H01.2	Kết quả giải trình tự 16S rRNA	Kết quả về sự đa dạng của quần thể vi sinh vật trong các mẫu bệnh phẩm, về sự biệt của vi sinh vật trong mẫu bệnh phẩm và sự xuất hiện của vi sinh vật chiếm ưu thế	Danh mục	
H01.2.1	Sự đa dạng sinh vật (%)	Alpha diversity (Shannon index)	Đơn vị phân loại chức năng (OTU)	

H01.2.2	Sự khác biệt về phân bố vi sinh vật (%)	Beta diversity (PCoA)	Đơn vị phân loại chức năng (OTU)	
H01.2.3	Tần xuất hiện của chủng vi sinh vật	Sự xuất hiện của các vi sinh vật có trong mẫu máu và dịch não tủy	Danh mục	Tỷ lệ tương đồng >97% khi so sánh với Genbank
<i>H02. Giải trình tự RNA</i>				
H02.1	Loại mẫu	Mẫu dịch não tủy/mẫu máu	Danh mục	Số nhận mẫu
H02.2	Kết quả giải trình tự RNA	Sự xuất hiện của các vi sinh vật có trong mẫu máu và dịch não tủy	Danh mục	Tỷ lệ tương đồng >97% khi so sánh với Genbank

PHỤ LỤC 3. Portra package

```
>install.packages(path_to_tar_gz_file, repos = NULL, type="source")
```

Once installed:

```
> inputTaxaCountMatrix <- MRcounts(countObject, norm=FALSE) or  
exprs(countObject) if data is ExpressionSet object  
> gids <- genGids( fData(countObject)[,c("Kingdom", "Phylum", "Class",  
"Order", "Family", "Genus", "Species")], cols=seq(6) )  
> out <- portra50::iter.clust.dataset(  
    mat = inputTaxaCountMatrix,  
    tau=colSums(inputTaxaCountMatrix),  
    category = gids,  
    clust.merge.mod="M",  
    ncore=4 ) #number of cores
```

Output

1. out\$mat contains the matrix count data.
2. If you are interested in the k^{th} cluster's members, `unlist(out$mems[k])` gives all the taxa clustered into the cluster.
3. If you want to find what is the dominant member of the k^{th} cluster, do :

```
>library(matrixStats)  
> fi <- unlist(out$mems[k])  
> dominant <- fi[ which.max( rowSums( inputTaxaCountMatrix ) ) ]
```

PHỤ LỤC 4. Các biểu mẫu

4.1 Phiếu cung cấp thông tin và thỏa thuận tham gia nghiên cứu

BẢN THÔNG TIN DÀNH CHO ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU VÀ CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Phiếu dành cho: bố/mẹ/người giám hộ của bệnh nhân mắc não úng thủy

Tài liệu này được thông báo đầy đủ đến những người tham gia nghiên cứu, không có trang hay phần nào trong tài liệu này được bỏ qua. Những nội dung trong tài liệu này cần phải được giải thích rõ bằng lời với những người tham gia nghiên cứu.

Tên nghiên cứu: “Nghiên cứu tiền khả thi về đặc điểm của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng huyết sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương”.

Phiên bản: 1.0

Ngày: 20/05/2019

Đơn vị chủ trì: Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, số 1 Yecxanh, Hà Nội, Việt Nam

Nghiên cứu viên chính: GS.TS Đặng Đức Anh, Viện trưởng Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương; số 1 Yecxanh, Hai Bà Trưng, Hà Nội.

Điện thoại: 0243.821.3241, Email: dda@nihe.org.vn

Con của anh/chị được mời tham gia nghiên cứu “***Nghiên cứu tiền khả thi về đặc điểm của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng huyết sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương***” do đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn của nghiên cứu. Đây là hoạt động do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương phối hợp với Đại học Bang Pennsylvania, Hoa Kỳ thực hiện.

Trước khi quyết định đồng ý hay không đồng ý cho con/người được anh/chị giám hộ tham gia nghiên cứu, anh/chị nên đọc kỹ và hiểu rõ mục đích của nghiên cứu, những lợi ích, nguy cơ có thể xảy ra khi con của anh/chị tham gia vào nghiên cứu này. Tài liệu này sẽ cung cấp các thông tin chi tiết về nghiên cứu để giúp anh/chị có thể tự đưa ra quyết định cho phép hoặc con của anh/chị tham gia nghiên cứu hay không. Anh/chị sẽ được đọc bản cung cấp thông tin này và ký vào bản chấp thuận nếu cho phép hoặc con của anh/chị tham gia nghiên cứu. Anh/chị cũng được đặt các câu hỏi mà mình chưa rõ cho các nghiên cứu viên. Anh/chị cũng có thể thảo luận với gia đình, bạn bè, người thân của mình trước khi quyết định cho con của anh/chị tham gia nghiên cứu.

I. THÔNG TIN VỀ NGHIÊN CỨU

1. Mục đích tiến hành nghiên cứu

Chúng tôi đang tiến hành nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh não úng thủy ở trẻ nhỏ. Đây là một bệnh nghiêm trọng khiến cho đứa trẻ có đầu to hơn bình thường khi có quá nhiều chất lỏng (thường được gọi là dịch não tủy) trong đầu của đứa trẻ. Nếu tình trạng này không được điều trị hợp lý sẽ có thể dẫn tới các hậu quả lâu dài đối với sự phát triển của đứa trẻ sau này.

Bệnh não úng thủy đôi khi gây ra bởi việc nhiễm trùng với một loại tác nhân nào đó như vi khuẩn hoặc vi rút, nhưng trong nhiều trường hợp không xác định được nguyên

nhân. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định loại tác nhân cụ thể (vi khuẩn, vi rút) gây bệnh não úng thủy ở trẻ nhỏ ở Việt Nam. Ngoài con anh/chị, sẽ có khoảng 200 trẻ khác tham gia nghiên cứu này.

Sẽ không có lợi ích trực tiếp đối với anh/chị hay con của anh/chị khi tham gia nghiên cứu này. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này sẽ giúp xác định được các tác nhân gây bệnh, xây dựng mô hình dự báo và cung cấp thông tin cho việc thiết kế các nghiên cứu khác giúp chẩn đoán sớm, chính xác tác nhân gây bệnh và giúp định hướng, nâng cao hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân khác trong tương lai.

2. Các bước tiến hành

Con của anh/chị được mời tham gia nghiên cứu vì đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn của nghiên cứu.

Nếu anh/chị đồng ý cho con của anh/chị tham gia nghiên cứu, chúng tôi sẽ xem bệnh án của con anh/chị đồng thời hỏi anh/chị một số câu hỏi liên quan đến các đặc điểm về thói quen, lối sống, tiền sử tiếp xúc với các tác nhân gây bệnh, lịch sử tiêm chủng... để có thêm thông tin giúp đưa ra một mô hình dự báo cho việc chẩn đoán và điều trị cho các bệnh nhân trong tương lai được chính xác và hiệu quả hơn.

Ngoài ra, chúng tôi sẽ tiến hành thu thập mẫu máu, mẫu phân và dịch não tủy từ con của anh/chị. Tất cả các loại mẫu trên sẽ được thu thập theo quy trình chuẩn của bệnh viện bởi các cán bộ y tế của bệnh viện được đào tạo kỹ càng. Đối với mẫu dịch não tủy, có hai trường hợp đối với con của anh/chị:

1) Có chỉ định phẫu thuật của bác sĩ điều trị để xử trí tình trạng bệnh của cháu thì chúng tôi sẽ lấy mẫu dịch não tủy trong quá trình phẫu thuật (thông thường thì dịch não tủy quá nhiều gây đầu to ở trẻ sẽ được loại bỏ khi phẫu thuật, chúng tôi sẽ lấy lại các mẫu bỏ đi này để làm xét nghiệm);

2) Tình trạng não úng thủy của con anh/chị chưa có chỉ định phẫu thuật từ bác sĩ điều trị. Đối với trường hợp này, thủ thuật chọc dịch não tủy (sử dụng kim sạch được tiệt trùng và chọc vào tủy của trẻ để lấy mẫu) thường được áp dụng để lấy mẫu xét nghiệm tại bệnh viện. Chúng tôi sẽ không yêu cầu lấy riêng mẫu dịch não tủy cho nghiên cứu này mà sẽ chia sẻ mẫu dịch não tủy do bệnh viện lấy cho các xét nghiệm thường quy của bệnh viện.

Ngoài các quy trình thu thập thông tin và mẫu trên, con của anh/chị vẫn sẽ được điều trị thông thường theo chỉ định của bác sĩ tại bệnh viện.

3. Các nguy cơ và bất lợi

Việc tham gia nghiên cứu này sẽ không làm gia tăng nguy cơ hay bất lợi gì đối với con của anh/chị so với chăm sóc y tế thông thường tại bệnh viện cho bệnh nhân mắc bệnh não úng thủy. Việc lấy mẫu máu, phân và dịch não tủy là các hoạt động thường quy của bệnh viện giúp cho chẩn đoán lâm sàng của bác sĩ điều trị; do đó, con của anh/chị vẫn có thể được đề nghị lấy các mẫu này bởi bệnh viện cho dù có hay không tham gia nghiên cứu của chúng tôi.

4. Quyền lợi của người tham gia nghiên cứu

Tất cả các xét nghiệm nghiên cứu tiến hành cho con của anh/chị đều miễn phí. Tuy nhiên, anh/chị sẽ không được chi trả chi phí nào khi tham gia nghiên cứu này. Các kết quả xét nghiệm, mặc dù không được trả ngay để phục vụ cho quá trình ra quyết định điều trị của bác sĩ, cũng sẽ được chúng tôi gửi tới bệnh viện sớm nhất có thể.

3. Bồi thường/điều trị khi có tổn thương liên quan đến nghiên cứu:

Việc tham gia nghiên cứu không làm tăng các nguy cơ/ rủi ro so với chăm sóc y tế thông thường tại bệnh viện. Tuy nhiên, nếu có tổn hại sức khỏe được xác định là gây ra bởi nghiên cứu, con của anh/chị sẽ được chăm sóc y tế miễn phí cho những tổn hại sức khỏe đó.

4. Người liên hệ:

Nếu có bất cứ câu hỏi nào trong quá trình tham gia nghiên cứu, anh/chị có thể liên hệ: GS.TS Đặng Đức Anh, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương; số 1 Yecxanh, Hai Bà Trưng, Hà Nội. Điện thoại: 0243.821.3241, Email: dda@nihe.org.vn.

Hoặc Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Thư ký Hội đồng: PGS.TS Nguyễn Thị Thùy Dương, SĐT: 098 5019101.

Tại Bệnh viện Nhi Trung ương: PGS.TS Trần Minh Điển, Phó giám đốc Bệnh viện Nhi Trung ương. Số điện thoại: 0982222888. Email: dientm@nhp.org.vn

5. Sự tự nguyện tham gia

Trước khi quyết định cho con của mình tham gia hay không, chúng tôi khuyến khích anh/chị đưa ra các câu hỏi về nghiên cứu và các quy trình nghiên cứu. Anh/chị hoàn toàn có quyền quyết định có tham gia hay cho con của mình tham gia nghiên cứu hay không. Anh/chị có thể quyết định tham gia tất cả các hoạt động của nghiên cứu, hoặc một số hoạt động cụ thể hoặc có quyền từ chối tham gia nghiên cứu. Ngoài ra, anh/chị cũng có thể quyết định cho con của mình rút khỏi nghiên cứu bất kỳ lúc nào và sẽ không có ảnh hưởng nào với vấn đề chăm sóc sức khỏe và sử dụng dịch vụ y tế của anh/chị và các thành viên khác trong gia đình. Nếu anh/chị quyết định cho con của mình rút khỏi nghiên cứu sau khi đã tham gia nghiên cứu, anh/chị có thể quyết định cho nghiên cứu giữ lại hay hủy bỏ số liệu hay mẫu đã thu thập.

6. Tính bảo mật

Con của anh/chị sẽ được cấp một mã số nghiên cứu, mã số này sẽ được sử dụng thay cho tên của con anh/chị trong các tài liệu nghiên cứu và số liệu phân tích.

Thông tin điện tử sẽ được bảo mật và sẽ không giúp xác định các thông tin cá nhân của anh/chị hoặc con của anh/chị. Thông tin của con củ anh/chị sẽ được bảo mật tuyệt đối và sẽ không được chia sẻ với ai ngoài thành viên nhóm nghiên cứu. Kết quả của nghiên cứu sẽ được công bố vì những mục đích có lợi cộng đồng và khoa học. Chúng tôi sẽ công bố kết quả nghiên cứu trên các tạp chí khoa học hay qua các bài trình bày tại các hội thảo. Tuy nhiên, thông tin cá nhân của con anh/chị sẽ không xuất hiện trên bất kỳ ấn phẩm hay bài trình bày nào.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tiến hành xem xét bộ gen/ vật liệu di truyền của các tác nhân gây bệnh, trong đó có thể giải mã bộ gen/vật liệu di truyền từ con của anh/chị. Tuy nhiên, việc mã hoá/loại bỏ các thông tin nhận dạng của con anh/chị trong quá trình phân tích sẽ giúp bảo vệ các thông tin này và không ai có thể xác định được đó là con của anh/chị.

Chúng tôi cũng sẽ sử dụng thông tin về địa chỉ của hộ gia đình (chỉ chi tiết đến cấp độ làng, xã mà không nêu địa chỉ cụ thể của gia đình anh/chị) để lập mô hình dự báo. Các thông tin nhận dạng của con anh/chị cũng sẽ được mã hoá và bảo mật khi phân tích các thông tin địa lý như vậy.

Chúng tôi sẽ lưu giữ các biểu mẫu nghiên cứu có chứa thông tin cá nhân của con của anh/chị ở nơi bảo mật. Chỉ những người làm việc trong nghiên cứu được phép xem các biểu mẫu này.

II. CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tôi đã đọc và hiểu thông tin trên đây, đã có cơ hội xem xét và đặt câu hỏi về thông tin liên quan đến nội dung trong nghiên cứu “*Nghiên cứu tiên khả thi về đặc điểm của bệnh nhân não ung thủy và nhiễm trùng huyết sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương*”. Tôi đã nói chuyện trực tiếp với nghiên cứu viên và được trả lời thỏa đáng tất cả các câu hỏi. Tôi nhận một bản sao của tài liệu này.

Tôi tự nguyện đồng ý tham gia nghiên cứu với các nội dung sau:

☐ Có	☐ Không	Đồng ý tham gia nghiên cứu này
☐ Có	☐ Không	Đồng ý để nghiên cứu thu thập thông tin từ hồ sơ bệnh án của con tôi/người được tôi giám hộ, đồng thời cung cấp các thông tin theo bộ câu hỏi
☐ Có	☐ Không	Đồng ý cung cấp mẫu phân, mẫu máu, dịch não tủy để làm xét nghiệm
☐ Có	☐ Không	Đồng ý cho nghiên cứu được lưu giữ các thông tin, mẫu phân, mẫu máu, dịch não tủy của con tôi/người được tôi giám hộ để sử dụng cho các nghiên cứu trong tương lai
☐ Có	☐ Không	Đồng ý cho nghiên cứu sử dụng thông tin về hệ gen hay vật liệu di truyền (nếu có) của con tôi/người được tôi giám hộ

Họ và tên của trẻ: _____

Bố/mẹ/người giám hộ ký ở đây:

_____	_____	_____	____/____/____
Ký tên	Họ và tên	Mối quan hệ với trẻ	Ngày ký

Nếu người người bảo hộ không tự đọc được, cần có người làm chứng độc lập với cán bộ nghiên cứu có mặt và ký vào đây:

Tôi đã có mặt trong suốt quá trình lấy chấp thuận tham gia của người tham gia. Phiếu này đã được đọc chính xác cho người tham gia và tất cả các câu hỏi của người tham gia đã được trả lời và họ đã đồng ý tham gia vào nghiên cứu này.

_____	_____	____/____/____
Chữ ký người làm chứng	Họ và tên	Ngày ký

Xác nhận của nghiên cứu viên/người lấy chấp thuận:

Tôi, người ký ở dưới đây, đã giải thích đầy đủ các thông tin về nghiên cứu cho người có tên như trên và sẽ gửi lại cho họ một bản chấp thuận tham gia nghiên cứu đã được ký và ghi ngày.

_____	_____	____/____/____
Chữ ký của Nghiên cứu viên	Họ tên	Ngày ký

BẢN THÔNG TIN DÀNH CHO ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU VÀ CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Phiếu dành cho: bố/mẹ/người giám hộ của bệnh nhân mắc nhiễm khuẩn huyết sơ sinh

Tài liệu này được thông báo đầy đủ đến những người tham gia nghiên cứu, không có trang hay phần nào trong tài liệu này được bỏ qua. Những nội dung trong tài liệu này cần phải được giải thích rõ bằng lời với những người tham gia nghiên cứu.

Tên nghiên cứu: “Nghiên cứu tiền khả thi về đặc điểm của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng huyết sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương”.

Phiên bản: 1.0

Ngày: 20/05/2019

Đơn vị chủ trì: Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, số 1 Yecxanh, Hà Nội, Việt Nam
Nghiên cứu viên chính: GS.TS Đặng Đức Anh, Viện trưởng Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương; số 1 Yecxanh, Hai Bà Trưng, Hà Nội.
Điện thoại: 0243.821.3241, **Email:** dda@nihe.org.vn

Con của anh/chị được mời tham gia nghiên cứu “***Nghiên cứu tiền khả thi về đặc điểm của bệnh nhân não úng thủy và nhiễm trùng huyết sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương***” do đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn của nghiên cứu. Đây là hoạt động do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương phối hợp với Đại học Bang Pennsylvania, Hoa Kỳ thực hiện.

Trước khi quyết định đồng ý hay không đồng ý cho con/người được anh/chị giám hộ tham gia nghiên cứu, anh/chị nên đọc kỹ và hiểu rõ mục đích của nghiên cứu, những lợi ích, nguy cơ có thể xảy ra khi con của anh/chị tham gia vào nghiên cứu này. Tài liệu này sẽ cung cấp các thông tin chi tiết về nghiên cứu để giúp anh/chị có thể tự đưa ra quyết định cho phép hoặc con của anh/chị tham gia nghiên cứu hay không. Anh/chị sẽ được đọc bản cung cấp thông tin này và ký vào bản chấp thuận nếu cho phép hoặc con của anh/chị tham gia nghiên cứu. Anh/chị cũng được đặt các câu hỏi mà mình chưa rõ cho các nghiên cứu viên. Anh/chị cũng có thể thảo luận với gia đình, bạn bè, người thân của mình trước khi quyết định cho con của anh/chị tham gia nghiên cứu.

I. THÔNG TIN VỀ NGHIÊN CỨU

1. Mục đích tiến hành nghiên cứu

Chúng tôi đang tiến hành nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh não úng thủy ở trẻ nhỏ. Đây là một bệnh nghiêm trọng khiến cho đứa trẻ có đầu to hơn bình thường khi có quá nhiều chất lỏng (thường được gọi là dịch não tủy) trong đầu của đứa trẻ. Nếu tình trạng này không được điều trị hợp lý sẽ có thể dẫn tới các hậu quả lâu dài đối với sự phát triển của đứa trẻ sau này.

Bệnh não úng thủy đôi khi gây ra bởi việc nhiễm trùng với một loại tác nhân nào đó như vi khuẩn hoặc vi rút (có thể trên bệnh nhân mắc nhiễm khuẩn huyết), nhưng trong nhiều trường hợp không xác định được nguyên nhân. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định loại tác nhân cụ thể (vi khuẩn, vi rút) gây bệnh não úng thủy ở trẻ nhỏ ở Việt Nam. Ngoài con anh/chị, sẽ có khoảng 200 trẻ khác tham gia nghiên cứu này.

Sẽ không có lợi ích trực tiếp đối với anh/chị hay con của anh/chị khi tham gia nghiên cứu này. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này sẽ giúp xác định được các tác nhân

gây bệnh, xây dựng mô hình dự báo và cung cấp thông tin cho việc thiết kế các nghiên cứu khác giúp chẩn đoán sớm, chính xác tác nhân gây bệnh và giúp định hướng, nâng cao hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân khác trong tương lai.

2. Các bước tiến hành

Con của anh/chị được mời tham gia nghiên cứu vì đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn của nghiên cứu.

Nếu anh/chị đồng ý cho con của anh/chị tham gia nghiên cứu, chúng tôi sẽ xem bệnh án của con anh/chị đồng thời hỏi anh/chị một số câu hỏi liên quan đến các đặc điểm về thói quen, lối sống, tiền sử tiếp xúc với các tác nhân gây bệnh, lịch sử tiêm chủng... để có thêm thông tin giúp đưa ra một mô hình dự báo cho việc chẩn đoán và điều trị cho các bệnh nhân trong tương lai được chính xác và hiệu quả hơn.

Ngoài ra, chúng tôi sẽ tiến hành thu thập mẫu máu, mẫu phân và dịch não tủy từ con của anh/chị. Tất cả các loại mẫu trên sẽ được thu thập theo quy trình chuẩn của bệnh viện bởi các cán bộ y tế của bệnh viện được đào tạo kỹ càng. Thủ thuật chọc dịch não tủy (sử dụng kim sạch được tiệt trùng và chọc vào tủy của trẻ để lấy mẫu) thường được áp dụng để lấy mẫu xét nghiệm tại bệnh viện. Chúng tôi sẽ không yêu cầu lấy riêng mẫu dịch não tủy cho nghiên cứu này mà sẽ chia sẻ mẫu dịch não tủy do bệnh viện lấy cho các xét nghiệm thường quy của bệnh viện.

Ngoài các quy trình thu thập thông tin và mẫu trên, con của anh/chị vẫn sẽ được điều trị thông thường theo chỉ định của bác sĩ tại bệnh viện.

3. Các nguy cơ và bất lợi

Việc tham gia nghiên cứu này sẽ không làm gia tăng nguy cơ hay bất lợi gì đối với con của anh/chị so với chăm sóc y tế thông thường tại bệnh viện cho bệnh nhân mắc nhiễm khuẩn huyết. Việc lấy mẫu máu, phân và dịch não tủy là các hoạt động thường quy của bệnh viện giúp cho chẩn đoán lâm sàng của bác sĩ điều trị; do đó, con của anh/chị vẫn có thể được đề nghị lấy các mẫu này bởi bệnh viện cho dù có hay không tham gia nghiên cứu của chúng tôi.

4. Quyền lợi của người tham gia nghiên cứu

Tất cả các xét nghiệm nghiên cứu tiến hành cho con của anh/chị đều miễn phí. Tuy nhiên, anh/chị sẽ không được chi trả chi phí nào khi tham gia nghiên cứu này. Các kết quả xét nghiệm, mặc dù không được trả ngay để phục vụ cho quá trình ra quyết định điều trị của bác sĩ, cũng sẽ được chúng tôi gửi tới bệnh viện sớm nhất có thể.

3. Bồi thường/điều trị khi có tổn thương liên quan đến nghiên cứu:

Việc tham gia nghiên cứu không làm tăng các nguy cơ/ rủi ro so với chăm sóc y tế thông thường tại bệnh viện. Tuy nhiên, nếu có tổn hại sức khỏe được xác định là gây ra bởi nghiên cứu, con của anh/chị sẽ được chăm sóc y tế miễn phí cho những tổn hại sức khỏe đó.

4. Người liên hệ:

Nếu có bất cứ câu hỏi nào trong quá trình tham gia nghiên cứu, anh/chị có thể liên hệ: GS.TS Đặng Đức Anh, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương; số 1 Yecxanh, Hai Bà Trưng, Hà Nội. Điện thoại: 0243.821.3241, Email: dda@nihe.org.vn

[Hoặc Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Thư ký Hội đồng: PGS.TS Nguyễn Thị Thùy Dương, SĐT: 098 5019101.](#)

5. Sự tự nguyện tham gia

Trước khi quyết định cho con của mình tham gia hay không, chúng tôi khuyến khích anh/chị đưa ra các câu hỏi về nghiên cứu và các quy trình nghiên cứu. Anh/chị hoàn toàn có quyền quyết định có tham gia hay cho con của mình tham gia nghiên cứu hay không. Anh/chị có thể quyết định tham gia tất cả các hoạt động của nghiên cứu, hoặc một số hoạt động cụ thể hoặc có quyền từ chối tham gia nghiên cứu. Ngoài ra, anh/chị cũng có thể quyết định cho con của mình rút khỏi nghiên cứu bất kỳ lúc nào và sẽ không có ảnh hưởng nào với vấn đề chăm sóc sức khỏe và sử dụng dịch vụ y tế của anh/chị và các thành viên khác trong gia đình. Nếu anh/chị quyết định cho con của mình rút khỏi nghiên cứu sau khi đã tham gia nghiên cứu, anh/chị có thể quyết định cho nghiên cứu giữ lại hay hủy bỏ số liệu hay mẫu đã thu thập.

6. Tính bảo mật

Con của anh/chị sẽ được cấp một mã số nghiên cứu, mã số này sẽ được sử dụng thay cho tên của con anh/chị trong các tài liệu nghiên cứu và số liệu phân tích.

Thông tin điện tử sẽ được bảo mật và sẽ không giúp xác định các thông tin cá nhân của anh/chị hoặc con của anh/chị. Thông tin của con của anh/chị sẽ được bảo mật tuyệt đối và sẽ không được chia sẻ với ai ngoài thành viên nhóm nghiên cứu. Kết quả của nghiên cứu sẽ được công bố vì những mục đích có lợi cộng đồng và khoa học. Chúng tôi sẽ công bố kết quả nghiên cứu trên các tạp chí khoa học hay qua các bài trình bày tại các hội thảo. Tuy nhiên, thông tin cá nhân của con anh/chị sẽ không xuất hiện trên bất kỳ ấn phẩm hay bài trình bày nào.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tiến hành xem xét bộ gen/ vật liệu di truyền của các tác nhân gây bệnh, trong đó có thể giải mã bộ gen/vật liệu di truyền từ con của anh/chị. Tuy nhiên, việc mã hoá/loại bỏ các thông tin nhận dạng của con anh/chị trong quá trình phân tích sẽ giúp bảo vệ các thông tin này và không ai có thể xác định được đó là con của anh/chị.

Chúng tôi cũng sẽ sử dụng thông tin về địa chỉ của hộ gia đình (chỉ chi tiết đến cấp độ làng, xã mà không nêu địa chỉ cụ thể của gia đình anh/chị) để lập mô hình dự báo. Các thông tin nhận dạng của con anh/chị cũng sẽ được mã hoá và bảo mật khi phân tích các thông tin địa lý như vậy.

Chúng tôi sẽ lưu giữ các biểu mẫu nghiên cứu có chứa thông tin cá nhân của con của anh/chị ở nơi bảo mật. Chỉ những người làm việc trong nghiên cứu được phép xem các biểu mẫu này.

II. CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tôi đã đọc và hiểu thông tin trên đây, đã có cơ hội xem xét và đặt câu hỏi về thông tin liên quan đến nội dung trong nghiên cứu “*Nghiên cứu tiên khả thi về đặc điểm của bệnh nhân não ung thủy và nhiễm trùng huyết sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương*”. Tôi đã nói chuyện trực tiếp với nghiên cứu viên và được trả lời thỏa đáng tất cả các câu hỏi. Tôi nhận một bản sao của tài liệu này.

Tôi tự nguyện đồng ý tham gia nghiên cứu với các nội dung sau:

☐ Có	☐ Không	Đồng ý tham gia nghiên cứu này
☐ Có	☐ Không	Đồng ý để nghiên cứu thu thập thông tin từ hồ sơ bệnh án của con tôi/người được tôi giám hộ, đồng thời cung cấp các thông tin theo bộ câu hỏi
☐ Có	☐ Không	Đồng ý cung cấp mẫu phân, mẫu máu, dịch não tủy để làm xét nghiệm
☐ Có	☐ Không	Đồng ý cho nghiên cứu được lưu giữ các thông tin, mẫu phân, mẫu máu, dịch não tủy của con tôi/người được tôi giám hộ để sử dụng cho các nghiên cứu trong tương lai
☐ Có	☐ Không	Đồng ý cho nghiên cứu sử dụng thông tin về hệ gen hay vật liệu di truyền (nếu có) của con tôi/người được tôi giám hộ

Họ và tên của trẻ: _____

Bố/mẹ/người giám hộ ký ở đây:

_____	_____	_____	____/____/____
Ký tên	Họ và tên	Mối quan hệ với trẻ	Ngày ký

Nếu người người bảo hộ không tự đọc được, cần có người làm chứng độc lập với cán bộ nghiên cứu có mặt và ký vào đây:

Tôi đã có mặt trong suốt quá trình lấy chấp thuận tham gia của người tham gia. Phiếu này đã được đọc chính xác cho người tham gia và tất cả các câu hỏi của người tham gia đã được trả lời và họ đã đồng ý tham gia vào nghiên cứu này.

_____	_____	____/____/____
Chữ ký người làm chứng	Họ và tên	Ngày ký

Xác nhận của nghiên cứu viên/người lấy chấp thuận:

Tôi, người ký ở dưới đây, đã giải thích đầy đủ các thông tin về nghiên cứu cho người có tên như trên và sẽ gửi lại cho họ một bản chấp thuận tham gia nghiên cứu đã được ký và ghi ngày.

_____	_____	____/____/____
Chữ ký của Nghiên cứu viên	Họ tên	Ngày ký

4.2 Phiếu thu thập thông tin

Phiếu thu thập thông tin bệnh nhân

Mã số bệnh án :

Mã số ca giám sát:

A. PHÂN LOẠI CA BỆNH	
Điền ✓ vào ô nghi ngờ/ có kết quả xét nghiệm	
☐ Có thể là não úng thủy:	
☐ Có thể là nhiễm khuẩn huyết	
B. NGUỒN THÔNG TIN	
1. Tên bệnh viện: ☐ Bệnh viện Nhi TƯ – Hà Nội	
☐ Bệnh viện khác chuyển đến.....	
2. Họ tên bác sỹ: điện thoại:.....	
C. THÔNG TIN CHUNG VỀ BỆNH NHÂN	
1. Họ tên: 2. Giới tính: ☐ Nam / ☐ Nữ	
3. Sinh ngày: ____/____/____ Tháng tuổi ____ Cân nặng khi sinh _____	
4. Họ tên mẹ hoặc bố:	
5. Địa chỉ: Số nhà..... Phố..... Thôn.....	
Xã..... Huyện..... Tỉnh/Tp.....	
6. Điện thoại:	
D. TIỀN SỬ	
1. Tiền sử tiêm vắc xin của mẹ: (Nguồn thông tin: ☐ Hỏi / ☐ Phiếu/ sổ tiêm chủng)	
1. Vắc xin VNNB: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR Số liều: ____ Ngày tiêm liều cuối: ____/____/____	
2. Vắc xin Hib: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR Số liều: ____ Ngày tiêm liều cuối: ____/____/____	
3. Vắc xin Phế cầu: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR Số liều: ____ Ngày tiêm liều cuối: ____/____/____	
4. Vắc xin Meningo: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR Số liều: ____ Ngày tiêm liều cuối: ____/____/____	
2. Tiền sử vắc xin của con	
1. Vắc xin Hib: Có Ko KR Số liều: ____ Ngày tiêm liều cuối: ____/____/____	
3. \Tiền sử tiếp xúc:	
Có đi đâu trong vòng 2 tuần trước khi bị bệnh? ☐ Có (Nơi đến:.....) ☐ Ko ☐ KR	
Xung quanh có trường hợp nghi viêm não màng não? ☐ Có (Ai:.....) ☐ Ko ☐ KR	
E. TRIỆU CHỨNG LÂM SÀNG	
1. Ngày vào viện: ____/____/____ Ngày xuất hiện bệnh (xuất hiện triệu chứng): ____/____/____	
1. Sốt (>38°C): ☐ Có ☐ Ko ☐ KR 2. Đau đầu: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR	
3. Co giật: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR 4. Lơ mơ: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR	
5. Cứng gáy: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR 6. Thay đổi tinh thần: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR	

7. Nôn: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR	8. Thóp phồng: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR			
9. Điểm Glasgow: ___ ___ điểm				
2. Kết quả: ☐ Hồi phục/cải thiện ☐ Gia đình xin về ☐ Chuyển viện ☐ Tử vong ☐ Không rõ Nếu tử vong, ngày tử vong: ____/____/____ Nguyên nhân:.....				
3. Di chứng: ☐ Có ☐ Ko ☐ KR Ghi rõ di chứng (nếu có):				
F. KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM TẠI BỆNH VIỆN				
1. Xét nghiệm tìm IgM kháng vi rút Viêm não Nhật Bản				
Loại bệnh phẩm	Ngày lấy mẫu	Ngày nhận mẫu	Ngày xét nghiệm	IgM VNNB
Dịch não tủy	____/____/____	____/____/____	____/____/____	☐ Dương tính / ☐ Âm tính/ ☐ Không rõ
Huyết thanh 1	____/____/____	____/____/____	____/____/____	☐ Dương tính / ☐ Âm tính/ ☐ Không rõ
Huyết thanh 2	____/____/____	____/____/____	____/____/____	☐ Dương tính / ☐ Âm tính/ ☐ Không rõ
2. Kết quả chẩn đoán hình ảnh:				
3. Xét nghiệm vi khuẩn học : Điền kết quả nếu có				
	Nhuộm Gram	Phản ứng ngưng kết hạt Latex	Nuôi cấy (xác định vi khuẩn)	Điền √ nếu (+) Loại vi khuẩn khác, ghi
Ngày xét nghiệm	____/____/____	____/____/____	____/____/____	
<i>H. influenza type B</i>				
<i>S. pneumoniae</i>				
<i>N. meningitidis</i>				
rõ:.....(☐ Phản ứng ngưng kết hạt Latex ☐ Nuôi cấy)				
G. Họ tên người điều tra (ký, ghi rõ họ tên).....				
Chức vụ người điều tra:				
Ngày điều tra: ____/____/____ Ngày hoàn tất: ____/____/____				

Phần dành cho PTN vi khuẩn hô hấp của Viện VSDT Trung ương

Mã số PTN:

Kết quả xét nghiệm PCR vi khuẩn học (☐ Viện VSDT TƯ / ☐ Pasteur Tp Hồ Chí Minh)

1. Có làm xét nghiệm PCR? ☐ Có ☐ Ko ☐ KR

2. Ngày nhận mẫu: ____/____/____

3. Ngày làm xét nghiệm: ____/____/____

4. Kết quả PCR: ☐ Dương tính ☐ Âm tính

Tên vi khuẩn: ☐ *H. influenzae* ☐ *S. pneumoniae* ☐ *N. meningitidis*

Týp huyết thanh (nếu có) _____

Kỹ thuật viên (ký, ghi rõ họ tên)

4.3 Sổ theo dõi và cấp mã số cho bệnh nhân tham gia nghiên cứu

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

Nghiên cứu P3H

**SỔ THEO DÕI BỆNH NHÂN VÀ CẤP MÃ SỐ
TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG**

[illegible]

PHỤ LỤC 5. Giấy chứng nhận của hội đồng đạo đức

PHỤ LỤC 6. Danh sách chạy mẫu giải trình tự RNA-seq theo các lần chạy

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
4003	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,007	0,35	M	W		1	1
4010	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,092	4,6	M	W		1	
4042	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,05	2,5	M	W		1	1,2
7007	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	1,274	63,7	M	R		1	2,4
7009	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,087	4,35	M	P		1	2,2
7035	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	57,8	2890	M	W		1	3,1
7051	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,195	9,75	M	W		1	5,6
7061	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,05	2,5	M	W		1	2,6
7067	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,089	4,45	M	W		1	7,6
7077	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,06	3	M	W		1	1
7094	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,154	7,7	M	R		1	5,3
7113	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,082	4,1	M	W		1	1
7121	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,602	30,1	M	R		1	3
7126	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,231	11,55	M	W		1	7,6
7131	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,184	9,2	M	P		1	8,1
7139	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,042	2,1	M	W		1	1
7141	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,023	1,15	M	W		1	1,1
7143	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,038	1,9	M	Y		1	5,6
7162	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,058	2,9	M	Y		1	1
7165	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,337	16,85	M	W		1	7,2
7176	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,077	3,85	M	W		1	1
7177	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,219	10,95	M	W		1	2,5
7181	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,025	1,25	M	W		1	1
Water	Vietnam	04/10/2021	Batch_1	CSF	RNA	0,000	0					1

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
4009	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,039	1,95	M	P		1	1
4017	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,259	12,95	M	W		1	6,9
4027	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,028	1,4	M	W		1	1
4041	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,03	1,5	M	P		1	1
4044	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,033	1,65	M	W		1	1
7002	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,009	0,45	M	W		1	1
7012	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,085	4,25	M	Y		1	1
7014	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,056	2,8	M	W		1	1
7015	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,048	2,4	M	W		1	1
7016	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,058	2,9	M	P		1	1
7025	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,071	3,55	M	W		1	2,8
7037	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0	0	M	W		1	
7040	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	18,552	927,6	M	W		1	2,6
7054	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	3,115	155,75	M	P		1	2,4
7056	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1,1
7068	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,057	2,85	M	W		1	1
7070	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,015	0,75	M	W		1	1
7075	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	2,121	106,05	M	W		1	
7125	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,025	1,25	M	Y		1	1
7133	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,063	3,15	M	W		1	1
7157	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,04	2	M	W		1	1,4
7185	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,008	0,4	M	W		1	1
7186	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,012	0,6	M	W		1	1
Water	Vietnam	05/10/2021	Batch_2	CSF	RNA	0,000	0					1
4021	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,007	0,35	M	Y		1	1
4025	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1,2

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
4033	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,031	1,55	M	W		1	7,6
7005	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,017	0,85	M	W		1	8
7027	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,004	0,2	M	P		1	1
7032	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,012	0,6	M	W		1	4,8
7045	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,02	1	M	W		1	3,9
7052	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,01	0,5	M	W		1	1
7053	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA		0	M	W		1	
7057	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,005	0,25	M	W		1	1
7060	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,019	0,95	M	Y		1	5,4
7085	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,029	1,45	M	W		1	3,4
7086	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1
7092	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,029	1,45	M	W		1	7,5
7099	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,008	0,4	M	W		1	1
7104	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1
7119	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,008	0,4	M	W		1	1
7130	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1
7132	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,017	0,85	M	W		1	1,2
7136	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,005	0,25	M	W		1	3,1
7140	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,037	1,85	M	W		1	7,5
7159	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,033	1,65	M	W		1	3,2
7160	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,094	4,7	M	Y		1	4,7
Water	Vietnam	06/10/2021	Batch_3	CSF	RNA	0,000	0					1
4008	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,049	2,45	M	Y		1	6,7
4014	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,013	0,65	M	W		1	1
4023	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,004	0,2	M	P		1	1
4024	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,012	0,6	M	W		1	2,1

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
4030	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
4032	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,007	0,35	M	W		1	1
4034	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
7001	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,005	0,25	M	W		1	1
7003	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1,2
7029	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,034	1,7	M	W		1	6,4
7049	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,009	0,45	M	W		1	1
7050	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,015	0,75	M	W		1	4,9
7072	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,068	3,4	M	Y		1	6,2
7090	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1
7095	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	1,06	53	M	Y		1	5,3
7098	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,027	1,35	M	W		1	2
7100	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,011	0,55	M	W		1	4,9
7109	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,016	0,8	M	W		1	1,2
7138	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,008	0,4	M	W		1	1
7146	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,008	0,4	M	W		1	4,5
7149	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,02	1	M	W		1	1
7153	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,001	0,05	M	W		1	1
7173	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,021	1,05	M	W		1	8,4
Water	Vietnam	07/10/2021	Batch_4	CSF	RNA	0,000	0					1
4011	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1
4022	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,048	2,4	M	P		1	8,4
7006	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,01	0,5	M	W		1	1
7010	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1,1
7034	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1,9
7038	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,337	16,85	M	W		1	1,6

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
7041	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	6,609	330,45	M	W		1	4,9
7043	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,084	4,2	M	W		1	8,8
7047	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,227	11,35	M	W		1	8
7062	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,033	1,65	M	W		1	8
7066	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1
7078	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	2,273	113,65	M	R		1	3,1
7083	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,037	1,85	M	W		1	7,3
7103	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,155	7,75	M	W		1	7
7105	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1
7106	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,043	2,15	M	W		1	3,1
7114	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,018	0,9	M	W		1	2,4
7123	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1
7124	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,035	1,75	M	P		1	3,1
7127	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,144	7,2	M	W		1	7,4
7155	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,039	1,95	M	W		1	4,2
7156	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA		0	M	W		1	
7161	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
Water	Vietnam	12/10/2021	Batch_5	CSF	RNA	0,000	0					1
4004	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1
4012	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0	0	M	W		1	
4038	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,215	10,75	M	W		1	5
7008	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,001	0,05	M	W		1	
7018	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0	0	M	P		1	
7019	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	6,801	340,05	M	W		1	1,8
7023	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,007	0,35	M	W		0	1,2
7039	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
7055	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,014	0,7	M	P		1	8,2
7069	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0	0	M	W		1	1
7076	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,007	0,35	M	W		1	1
7081	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,013	0,65	M	W		1	1
7087	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,011	0,55	M	W		1	7,7
7088	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,004	0,2	M	Y		1	
7097	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,062	3,1	M	P		1	3,3
7107	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,008	0,4	M	W		1	1
7115	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,009	0,45	M	W		1	5,3
7118	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,01	0,5	M	W		1	1,3
7122	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,018	0,9	M	W		0	1
7129	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,12	6	M	W		1	3,7
7134	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,006	0,3	M	Y		1	1
7150	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,135	6,75	M	P		1	6,5
7189	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,001	0,05	M	W		1	
Water	Vietnam	13/10/2021	Batch_6	CSF	RNA	0,000	0					1
4016	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1
4019	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
4029	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,066	3,3	M	W		1	3,8
4035	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,013	0,65	M	R		1	2,5
7030	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1
7042	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
7063	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,005	0,25	M	W		1	1
7073	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
7080	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1
7093	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
7101	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1
7102	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,167	8,35	M	P		1	4,2
7108	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1
7112	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0	0	M	W		1	
7120	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,001	0,05	M	W		1	
7128	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,005	0,25	M	Y		1	1
7135	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,072	3,6	M	W		1	3
7142	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,012	0,6	M	W		1	7,9
7147	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,011	0,55	M	P		1	2,1
7152	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,001	0,05	M	W		1	
7169	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,009	0,45	M	W		1	5,5
7170	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	3
7179	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,03	1,5	M	W		0	2
Water	Vietnam	14/10/2021	Batch_7	CSF	RNA	0,000	0					1
4015	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,002	0,1	M	W		1	1
4039	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,015	0,75	M	W		1	7,4
4040	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	3,165	158,25	M	W		1	3,4
7011	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	8,754	437,7	M	W		1	
7013	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,108	5,4	M	W		1	5,6
7020	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,058	2,9	M	Y		1	3,9
7021	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,007	0,35	M	W		1	1,2
7024	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,012	0,6	M	W		1	1,7
7036	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1
7048	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,01	0,5	M	W		1	1
7058	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,001	0,05	M	W		1	
7074	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,004	0,2	M	Y		1	1

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
7084	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,002	0,1	M	Y		1	1
7089	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,078	3,9	M	W		1	7,9
7096	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,021	1,05	M	W		1	4,6
7117	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1
7145	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,046	2,3	M	Y		1	2,6
7163	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,011	0,55	M	W		1	2,4
7168	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,005	0,25	M	W		1	1
7172	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,24	12	M	P		1	2,9
7175	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,01	0,5	M	Y		1	1
7180	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,033	1,65	M	W		1	1,5
7182	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,012	0,6	M	P		1	2,4
water	Vietnam	15/10/2021	Batch_8	CSF	RNA	0,000						1
4002	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,022	1,1	M	P		1	4,6
4005	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,003	0,15	M	W		1	1
4018	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,005	0,25	M	W		1	1
4020	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,004	0,2	M	Y		1	1
4026	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,006	0,3	M	W		1	1
4036	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	1,728	86,4	M	W		1	3,4
4037	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,024	1,2	M	W		1	1
4043	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
7026	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,016	0,8	M	W		1	1
7031	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,031	1,55	M	W		1	1
7033	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,371	18,55	M	W		1	5,9
7065	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,521	26,05	M	R		1	4
7071	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,695	34,75	M	W		1	5,1
7110	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,019	0,95	M	Y		1	1

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
7137	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,11	5,5	M	R		1	4,8
7144	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,105	5,25	M	R		1	6,8
7148	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,029	1,45	M	W		1	3,7
7151	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,032	1,6	M	W		1	1
7154	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,004	0,2	M	W		1	1
7166	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,061	3,05	M	W		1	1
7167	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,007	0,35	M	W		1	1
7171	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,007	0,35	M	W		1	1
7184	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,207	10,35	M	Y		1	2,7
water	Vietnam	01/11/2021	Batch_9	CSF	RNA	0,000						1
4001	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,169	16,9	M	P		1	7,5
4006	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,054	5,4	M	W		1	4,8
4028	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,044	4,4	M	Y		1	1
7017	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,138	13,8	M	W		1	7,7
7022	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,036	3,6	M	W		1	1
7028	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,002	0,2	M	W		1	1,1
7044	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,131	13,1	M	W		1	4,5
7046	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,014	1,4	M	W		1	1
7059	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,01	1	M	W		1	1
7064	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,012	1,2	M	W		1	1
7079	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,011	1,1	M	W		1	7,7
7111	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,158	15,8	M	P		1	2,8
7116	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,002	0,2	M	W		1	1,6
7158	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,011	1,1	M	W		1	1
7164	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,01	1	M	W		1	1
7174	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,115	11,5	M	Y		1	1,9

Study ID	Study	Date of Extraction	Extraction Batch	Sample Type	Nucleic Acid	Quant	Yield (ng)	Mixed	Color	Clot	Aliquot	RIN
7178	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,171	17,1	M	W		1	6,8
7187	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,031	3,1	M	W		1	6,3
7188	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,062	6,2	M	Y		1	8,3
water	Vietnam	08/11/2021	Batch_10	CSF	RNA	0,000	0					

PHỤ LỤC 7. Kết quả phân tích 16S rRNA