

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
Viện Công nghệ sinh học
18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật:

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO KIT PHÁT HIỆN NHANH, CHÍNH
XÁC CÁC VI SINH VẬT ĐỘC HẠI
GÂY Ô NHIỄM KHÔNG KHÍ VÀ NƯỚC**

TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao

Hà Nội, 9-2004

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
Viện Công nghệ sinh học
18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật:

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO KIT PHÁT HIỆN NHANH, CHÍNH
XÁC CÁC VI SINH VẬT ĐỘC HẠI
GÂY Ô NHIỄM KHÔNG KHÍ VÀ NƯỚC

TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao

Cơ quan chủ trì Đề tài KC.04.10

Chủ nhiệm Đề tài KC.04.10



Đại tá. Phạm Sơn Dương
Hà Nội, 9-2004

Bản thảo viết xong 9/2004

Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước, mã số KC.04.10

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

PGS TS Nguyễn Thị Ngọc Dao

PGS TS Ngô Đình Bình

TS Nguyễn Ngọc Dũng

TS Trương Nam Hải

TS Nguyễn Thanh Hoà

TS Đinh Duy Kháng

TS Phạm Thuý Hồng

CN Nguyễn Minh Anh

CN Hồ Thị Kim Anh

CN Bùi Hoàng Anh

CN Trịnh Quý Bôn

CN Nguyễn Xuân Cảnh

CN Dương Văn Cường

CN Nguyễn Quỳnh Châu

CN Nguyễn Thị Ngọc Diệp

ThS Phạm Thanh Hà

Ths Đỗ Thị Huyền

CN Phạm Minh Hương

CN Nguyễn Tiến Minh

CN Nguyễn Thị Bích Nga

KS Nguyễn Ánh Nguyệt

CN Dương Hồng Quân

ThS Trần Kiến Quốc

ThS Hà Thị Quyến

CN Bạch Thị Như Quỳnh

CN Trần Ngọc Tân

TC Nguyễn Thị Thi

CN Phạm Minh Tuấn

KS Nguyễn Đình Tuấn

KS Phạm Kiều Thuý

CN Dương Cẩm Thuý

Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

BÀI TÓM TẮT

Bệnh than, dịch hạch, tả, thương hàn, kiết lỵ là những bệnh nhiễm trùng cấp tính do các tác nhân *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Shigella* gây ra. Các bệnh này thường xảy ra trong các đàn gia súc, động vật rồi lây lan sang người thành dịch với tỷ lệ tử vong cao. Các bệnh này, nhất là bệnh than, dịch hạch đã được sử dụng như là vũ khí sinh học nguy hiểm nhất trong lịch sử chiến tranh, đặc biệt là những năm gần đây những chủng vi khuẩn gây bệnh than đã được cải biến gen, được dùng như một thứ vũ khí thế hệ mới gọi là vũ khí gen (vũ khí ADN) trong khủng bố sinh học gây hoảng loạn trong cộng đồng dân cư trên thế giới. So với các vũ khí thông thường, vũ khí sinh học không những rất khó phát hiện, có thể gây dịch bệnh chết người hàng loạt, trên diện rộng, mà còn gây thiệt hại nặng về kinh tế (gây dịch hại đối với cây trồng nông lâm nghiệp và môi trường). Theo các chuyên gia vũ khí, để có hiệu quả sát thương cho dân cư trên diện tích 1 km², nếu dùng vũ khí thông thường cần chi tới 2000 US\$, vũ khí hoá học, vũ khí hạt nhân cần 600 - 800, trong khi đó vũ khí sinh học chỉ cần 1 US\$.

Để phát hiện tác nhân gây bệnh trên, đã có nhiều phương pháp được nghiên cứu, phát triển và áp dụng. Các phương pháp kinh điển như vi khuẩn học, miễn dịch học, miễn dịch huỳnh quang, ngưng kết hồng cầu cho đến phương pháp khá phổ biến như ELISA. Tuy nhiên, những phương pháp này thường tốn thời gian, công sức và đòi hỏi kỹ thuật phức tạp. Hơn nữa, phải tiếp xúc trực tiếp với mầm bệnh nên nguy cơ lây nhiễm cao cho kỹ thuật viên.

Ngày nay, với sự phát triển của sinh học phân tử, nhiều phương pháp đã được phát triển và áp dụng có hiệu quả trong việc phát hiện các tác nhân gây bệnh, trong đó, phương pháp phân tử dựa trên phản ứng PCR được áp dụng phổ biến nhất, vì phương pháp này cho phép phát hiện gen hoặc hệ gen ngay cả khi chưa biểu hiện kiểu hình và đặc tính gây bệnh của chúng. PCR là phản ứng thao tác trực tiếp trên chất liệu di truyền và có khả năng nhân lên bất cứ đoạn gen nào trong thời gian ngắn. Kỹ thuật này có độ nhạy và đặc hiệu cao, thao tác lại tương đối đơn giản. Đặc biệt là PCR có thể thao tác trên các gen vi khuẩn đã chết nên phương pháp này đã được ứng dụng ngày càng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới.

Việt Nam cũng là một trong những điểm nóng trên thế giới về một số loại dịch bệnh do vi khuẩn gây nên. Để góp phần nhanh chóng phát hiện các vi khuẩn gây bệnh, đề tài **“Nghiên cứu chế tạo KIT phát hiện nhanh, chính xác các vi sinh vật độc hại gây ô nhiễm không khí và nước”** đã được thực hiện.

Với những nhiệm vụ đặt ra, đề tài đã thực hiện được các nội dung sau:

1. Đã thiết kế chế tạo được hai bộ thu thập mẫu vi khuẩn từ nước và không khí.
2. Đã chế tạo được 5 bộ Kit PCR (mỗi bộ 2 Kit) dùng để phát hiện nhanh các vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây bệnh than, *Yersinia pestis* gây bệnh dịch hạch, *Vibrio cholerae* gây bệnh tả, *Salmonella typhi* gây bệnh thương hàn, *Shigella* gây bệnh lỵ. Ngoài ra đề tài cũng đã chế tạo được 2 bộ Kit huyết thanh miễn dịch để phát hiện vi khuẩn *Bacillus anthracis* và *Vibrio cholerae*.
3. Đã xây dựng được 5 quy trình sản xuất và sử dụng cho các bộ Kit này.
4. Đã kiểm tra độ nhạy của 5 bộ Kit; Bộ Kit phân tử có thể phát hiện được vi khuẩn với lượng ADN của chúng là 0,07-1pg, ngưỡng phát hiện là 10^{-10} tế bào; thời gian xác định mẫu khoảng 6-8h.
5. Đã sử dụng 5 bộ Kit này trong Phòng thí nghiệm để phát hiện các vi khuẩn gây bệnh, kết quả cho thấy các bộ Kit có khả năng phát hiện các vi khuẩn nhanh và đặc hiệu.
6. Đề tài cũng góp phần đào tạo được 2 thạc sĩ, 7 cử nhân; 4 sinh viên, 2 học viên cao học đang làm khoá luận tốt nghiệp, 1 nghiên cứu sinh đang làm luận văn; 12 bài báo đã được công bố, đăng ký được 3 trình tự gen quan trọng của *Vibrio cholerae* trong ngân hàng gen.
7. Đóng góp mới của đề tài: Lần đầu tiên ở Việt Nam đã chế tạo được các bộ Kit phân tử dùng để phát hiện vi khuẩn gây bệnh than, bệnh dịch hạch, bệnh tả, bệnh thương hàn, bệnh lỵ. Đã chế tạo được bộ thu mẫu vi sinh vật từ nước và không khí.

MỤC LỤC

Danh mục các chữ viết tắt	1
Lời mở đầu.....	2
Chương 1. tổng quan tài liệu	4
1.1. Tình hình bệnh dịch trên thế giới và ở Việt Nam	4
1.1.1. Bệnh than	4
1.1.2. Bệnh dịch hạch.....	5
1.1.3. Bệnh tả.....	7
1.1.4. Bệnh thương hàn.....	8
1.1.5. Bệnh lỵ.....	9
1.2. Tổng quan về các vi khuẩn gây bệnh	10
1.2.1. Vi khuẩn <i>Bacillus anthracis</i> gây bệnh than	10
1.2.2. Vi khuẩn <i>Yersinia pestis</i> gây bệnh dịch hạch.....	13
1.2.3. Vi khuẩn <i>Vibrio cholerae</i> gây bệnh tả	15
1.2.4. Vi khuẩn <i>Salmonella typhi</i> gây bệnh thương hàn	16
1.2.5. Vi khuẩn gây bệnh lỵ	17
1.3. Giới thiệu một số phương pháp chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh.....	18
1.4. Phương pháp luận trong việc sử dụng kỹ thuật PCR để chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh.....	20
1.4.1. Nguyên lý của phản ứng PCR	20
1.4.2. Sử dụng kỹ thuật PCR để chẩn đoán một số vi khuẩn gây bệnh.	21
Phát hiện vi khuẩn gây bệnh than <i>Bacillus anthracis</i>	21
Phát hiện vi khuẩn gây bệnh dịch hạch <i>Yersinia</i>	21
Phát hiện vi khuẩn gây bệnh tả <i>Vibrio Cholerae</i>	22
Phát hiện vi khuẩn gây bệnh thương hàn <i>S. typhi</i>	22
Phát hiện vi khuẩn gây bệnh lỵ <i>Shigella</i>	23
Chương 2. vật liệu và phương pháp nghiên cứu.....	23
2.1. Sinh phẩm	24

2.1.1. Vi sinh vật.....	24
2.1.2. Các cặp môi.....	24
2.1.2. Các Kit tách chiết.....	26
2.2. Dụng cụ và hoá chất.....	26
2.2.1. Dụng cụ.....	26
2.2.2. Hoá chất.....	26
2.2.3. Môi trường	27
2.3. Các phương pháp nghiên cứu.....	27
2.3.1. Phương pháp tách chiết ADN từ vi khuẩn	27
Tách chiết ADN từ vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	28
Tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn <i>Yersinia pestis</i>	28
Tách chiết ADN plasmid từ vi khuẩn <i>Vibrio cholerae</i>	29
Tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn <i>Yersinia pestis</i>	29
Tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn <i>S. typhi</i>	30
Tách chiết ADN vi khuẩn tổng số của <i>Shigella</i> spp.	30
2.3.2. Phương pháp PCR để xác định gen trong vi khuẩn.....	31
Xác định các gen của <i>Bacillus anthracis</i>	31
Xác định các gen <i>pla</i> của <i>Yersinia pestis</i>	31
Xác định các gen của <i>Vibrio Cholerae</i>	31
Xác định gen <i>vipR</i> của <i>Salmonella typhi</i>	32
Xác định các gen của <i>Shigella</i>	32
2.3.3. Phương pháp tạo Kit phát hiện các vi khuẩn gây bệnh	32
2.3.4. Phương pháp xác định độ nhạy của Kit.....	33
2.3.5. Phương pháp thu mẫu vi khuẩn từ nước và không khí	33
2.3.6. Một số phương pháp khác.....	33
Chương 3. Kết quả và thảo luận.....	33
3.1. Tách chiết ADN từ vi khuẩn.....	33
3.1.1. Tách chiết ADN từ vi khuẩn <i>Yersinia pestis</i>	33

Tách chiết ADN tổng số	33
Tách chiết ADN plasmid.....	34
3.1.2. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn <i>Vibrio cholerae</i>	35
3.1.3. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn <i>S. typhi</i>	36
3.1.4. Tách chiết ADN vi khuẩn từ mẫu nước tự nhiên	36
③2. Xác định các gen đặc hiệu cho vi khuẩn bằng phương pháp PCR	37
3.2.1. Xác định các gen <i>virA</i> , <i>capA</i> , <i>pag</i> từ vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	37
3.2.2. Xác định gen <i>pla</i> từ vi khuẩn <i>Y. Pestis</i>	39
3.2.3. Xác định các gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ <i>Vibrio cholerae</i>	41
3.2.4. Xác định gen <i>vipR</i> từ vi khuẩn <i>S. typhi</i>	42
3.2.5. Xác định các gen từ vi khuẩn <i>Shigella</i>	44
③3. Xây dựng quy trình chế tạo và sử dụng Kit phát hiện vi khuẩn	48
3.3.1. Quy trình chế tạo Kit.....	48
3.3.2. Quy trình sử dụng các bộ Kit.....	49
Quy trình sử dụng BacKit để phát hiện <i>Bacillus anthracis</i>	49
Quy trình sử dụng YerKit để phát hiện <i>Yersinia pestis</i>	50
Quy trình sử dụng VibKit để phát hiện <i>Vibrio cholerae</i>	51
Quy trình sử dụng SalKit để phát hiện <i>Salmonella typhi</i>	51
Quy trình sử dụng ShiKit để phát hiện <i>Shigella</i> spp.	52
③4. Đánh giá độ nhạy của các bộ Kit	52
3.4.1. Đánh giá độ nhạy của KitBac	53
3.4.2. Đánh giá độ nhạy của YerKit	54
3.4.3. Đánh giá độ nhạy của VibKit	55
3.4.4. Đánh giá độ nhạy của SalKit	55
3.4.5. Đánh giá độ nhạy của ShiKit	55
3.5.1. Chế tạo các thiết bị thu vi khuẩn.....	56
3.5.2. Xây dựng quy trình phát hiện vi khuẩn gây bệnh từ nước và không khí	58

3.6. Sử dụng các bộ Kit để phát hiện vi khuẩn gây bệnh trong phòng thí nghiệm.....	60
3.7. Một số kết quả khác đã đạt được của đề tài.....	62
3.7.1. Phân lập và phân loại <i>Bacillus anthracis</i>	62
3.7.2. Tách dòng và đọc trình tự đoạn ADN của gen <i>pla</i> ở <i>Y. Pestis</i>	62
3.7.3. Xác định trình tự gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ vi khuẩn tả <i>Vibrio Cholerae</i>	62
3.7.4. Đào tạo và các công trình đã công bố	62
3.7.5. Kinh phí.....	62
Chương 4. kết luận	63
Tài liệu tham khảo	64
Phụ lục 1: Phân lập và phân loại <i>Bacillus anthracis</i>	72
Phụ lục 2: Dòng hoá và giải trình trình tự gen <i>pla</i> của <i>Y. Pestis</i>	75
Phụ lục 3. Kết quả xác định trình tự gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ vi khuẩn tả <i>Vibrio cholerae</i>	81

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ADN: Axit Deoxyribonucleic

ARN: Axit Ribonucleic

Amp: Ampicillin

BSA: Bovine Serum Albumin (Albumin huyết thanh bò)

Bp : Cặp Bazơ

dNTP: Deroxyribonucleotide 5'-triphosphates

EDTA : Ethylen Diamine Tetra acetic Acid

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Phản ứng hấp phụ miễn dịch đánh dấu enzym)

EtBt : Ethidium Bromide

E. coli: *Escherichia Coli*

IHA: Indirect Hemagglutination Assay (Phản ứng ngưng kết hồng cầu thụ động)

Kit: Bộ sinh phẩm

LB : Môi trường Lauria Betani

PCR : Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi trùng hợp)

SDS : Sodium Dodecyl Sulphate

TAE : Tris- Acetate- EDTA

Taq : Polymerase của *Thermus aquaticus*

TE: Tris- EDTA

X- gal : 5- Bromo- 4- Chloro- 3- Indolyl- β -D-Galactopyranoside

v/p : vòng /phút

WHO : Tổ chức Y tế thế giới

Yop: *Yersinia* outer protein

LỜI MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, những vụ dịch bệnh do các loại vi sinh vật độc hại gây ra ngày càng tăng. Nguy hiểm nhất phải kể đến những căn bệnh do vi khuẩn gây ra như bệnh than, bệnh dịch hạch, bệnh tả, bệnh thương hàn, bệnh lỵ. Trong đó:

Tác nhân gây bệnh than là trực khuẩn *Bacillus anthracis* (Ba). Có hai plasmid liên quan đến tác nhân gây bệnh của *B. anthracis*, pXO1 và pXO2. pXO1 chứa các gen mã hoá độc tố ngoại bào bộ ba bao gồm các thành phần: kháng nguyên bảo vệ PA, nhân tố gây phù EF và nhân tố gây tử vong LF. Các thành phần này nếu đứng riêng rẽ sẽ không gây độc. Hiệu quả gây độc là do sự hoạt động kết hợp của PA với hai thành phần kia (EF, LF), PA kết hợp với EF gây phù sưng, còn nếu kết hợp với LF sẽ gây chết cho cơ thể bị nhiễm. Các gen của pXO2 mã hoá tổng hợp protein trong sinh tổng hợp vỏ màng nhầy axit poly-D-glutamic.

Bệnh dịch hạch là một bệnh nhiễm trùng cấp tính do vi khuẩn *Yersinia pestis* gây ra. Yếu tố độc lực gây bệnh chính của 3 loài vi khuẩn thuộc họ *Yersinia* này là các plasmid đảm nhiệm. Loại plasmid pCD1 là plasmid độc lực có trong cả 3 loài vi khuẩn *Yersinia*, chúng sử dụng loại plasmid này trong quá trình tiến triển gây bệnh. Hai loại plasmid pMT1 và pPCP1 là sở hữu riêng của vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis* mà hai loài vi khuẩn *Yersinia enterocolitica* và *Yersinia pseudotuberculosis* không có.

Vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* là một trong số vi khuẩn đường ruột nguy hiểm nhất thường gây bệnh ở người. Hệ gen của *Vibrio cholerae* có 3 gen quan trọng mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza. Trong đó gen mã hoá độc tố tả Enterotoxin là gen quan trọng nhất trong 3 gen bởi vì độc tố tả Enterotoxin là nguyên nhân chính gây ra bệnh tả ở người

Bệnh thương hàn chủ yếu là do vi khuẩn *Salmonella typhi* gây ra. Loại vi khuẩn này chỉ sống trên cơ thể người. Trong cơ thể, khi *S. typhi* bị dung giải bởi hệ thống miễn dịch, chúng có thể giải phóng nội độc tố. Nội độc tố này kích thích thần kinh giao cảm ở bụng làm tổn thương mảng Peyer và gây xuất huyết đường tiêu hoá.

Shigella gây bệnh lỵ cho người và các loài linh trưởng khác. Độc tố Shiga là sản phẩm của tế bào vi khuẩn *Shigella* và là tác nhân gây bệnh.

Những căn bệnh này không những ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự khoẻ con người mà còn có khả năng lây lan thành những vụ đại dịch gây thiệt hại lớn cho nền kinh tế quốc

dân. Đặc biệt khi mà chúng được các đối tượng khủng bố sử dụng như là một loại vũ khí sinh học có khả năng giết người hàng loạt. Việc nghiên cứu để tạo ra phương pháp phát hiện nhanh và chính xác các loại vi sinh vật gây bệnh trong môi trường là một yêu cầu cấp thiết nhằm tìm ra biện pháp đối phó kịp thời khi có dịch bệnh xảy ra. Trước tình hình đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài: ***“Nghiên cứu chế tạo KIT phát hiện nhanh, chính xác các vi sinh vật độc hại gây ô nhiễm không khí và nước”*** dựa trên kỹ thuật PCR.

Mục tiêu của đề tài:

- Chế tạo được 10 bộ sinh phẩm (Kit) phục vụ phát hiện nhanh các vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây bệnh than, *Yersinia pestis* gây bệnh dịch hạch, *Vibrio cholerae* gây bệnh tả, *Salmonella typhi* gây bệnh thương hàn, *Shigella* gây bệnh lỵ.
- Xây dựng 5 quy trình sản xuất 5 bộ Kít phát hiện nhanh vi sinh vật gây bệnh.

Để thực hiện được mục tiêu đề ra, cần thực hiện những nội dung sau đây:

1. Thiết kế thiết bị thu mẫu vi sinh vật gây bệnh từ nước và không khí.
2. Thiết kế các cặp mồi đặc hiệu sử dụng trong việc chẩn đoán 5 loại vi sinh vật gây bệnh.
3. Xây dựng phương pháp giám định phân tử dựa trên kỹ thuật PCR đối với các vi sinh vật gây bệnh than, dịch hạch, tả, thương hàn, kiết lỵ phân lập tại Việt Nam.
4. Kiểm tra độ nhạy của phương pháp, xây dựng và tiêu chuẩn hoá Kít chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tình hình bệnh dịch trên thế giới và ở Việt Nam

1.1.1. Bệnh than

Bệnh than xuất hiện từ thời cổ đại với nhiều tên gọi khác nhau, trận dịch than đầu tiên được ghi trong quyển Geneis xảy ra vào năm 1491 trước công nguyên đã giết chết rất nhiều súc vật của người Ai Cập. Người ta cũng tìm thấy các ghi nhận về bệnh than trên súc vật và người trong các cổ thư của người Hindu, Hy Lạp và La Mã. Vào thế kỷ thứ XVII, một trận dịch than đã lan tràn ở châu Âu giết chết nhiều người và súc vật. Năm 1789 ở vùng Trelbinsk dịch bệnh lan tràn và lần đầu tiên bác sỹ Andrepski đã gọi tên bệnh là bệnh than. Tác nhân gây bệnh *Bacillus anthracis* đã được A. Pallender (Đức) phát hiện năm 1849, K. Daven (Pháp) năm 1850. Sau đó các nhà khoa học khác đã nghiên cứu kỹ hơn: R. Cohn (1872); L. Pasteur (1877); L. S. Xenkovski (1883). Một vụ dịch bệnh than thể phổi ở người xảy ra ở Sverdlovsk, Liên xô, nay là Ekatarinbua, Nga tháng Tư năm 1979 làm chết 66 người. Chính quyền địa phương thông báo bệnh dịch do người ăn phải thịt nhiễm khuẩn than, nhưng các chính phủ phương Tây cho rằng đó là do sự rò rỉ bào tử *B. anthracis* từ một đơn vị nghiên cứu vũ khí vi trùng gần đó. Sau đó vài năm một vụ dịch xảy ra ở Paraguay. Năm 1989, ở miền Bắc xứ Wales xảy ra một trận dịch than lớn trên súc vật. Người ta đã phải giết 4.492 gia súc nhiễm bệnh và áp dụng các biện pháp sát trùng chất thải, nhà cửa, thiết bị, đường xá, đất đai bằng formalin. Gần đây, một vụ dịch bệnh than xảy ra ở Pháp năm 1997. Mới đây nhất, vụ khủng bố bệnh than tại Mỹ sâu 11/9 làm 4 người chết và 17 người mắc bệnh đã làm cho cả thế giới hoang mang. Quốc hội Mỹ đã quyết định chi nhiều tỷ đô la cho nghiên cứu phòng chống bệnh này[1].

Ở Việt Nam, bệnh than cũng đã xuất hiện từ lâu nhưng không được các nhà dịch tễ thông báo. Theo thống kê của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương: năm 1997 có 30 người bị mắc bệnh than, năm 1998 -59 người, năm 1999 - 58 người. Riêng năm 2000 có 27 người bị mắc bệnh than, trong đó 12 ca ở Cao Bằng, 11 ca ở Lai Châu, 4 ca ở Đồng Nai. Không có ca nào bị chết. Hầu hết các ca mắc bệnh đều tập trung ở các tỉnh vùng núi phía Bắc. Đối với các trường hợp mắc bệnh than ở nước ta, hầu hết đều phát sinh từ do tiếp xúc với động vật ăn cỏ như trâu bò, những người thuộc da, chế biến xương, thịt súc vật, ăn thịt súc vật nhiễm bệnh không được nấu chín.

Đối với động vật cũng như đối với người, bệnh than thể hiện trong 4 thể lâm sàng [2, 27,, 29]:

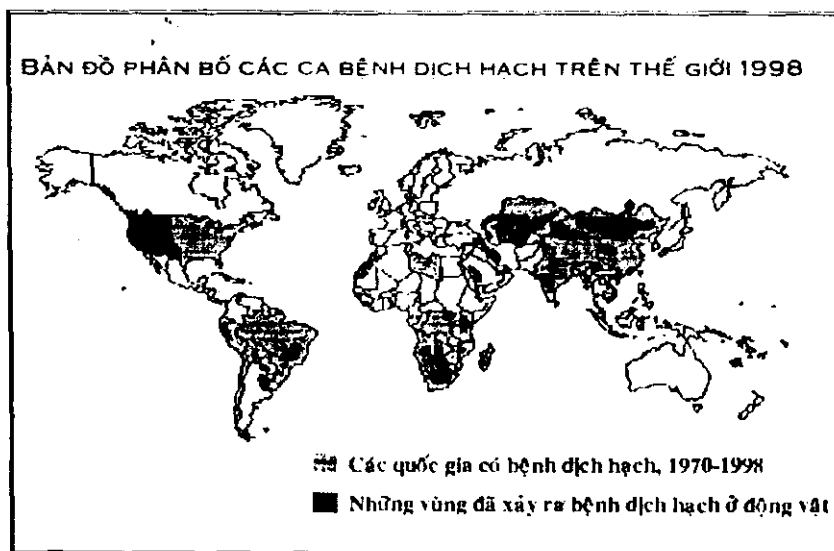
- Bệnh than thể da
- Bệnh than đường hô hấp
- Bệnh than đường tiêu hoá
- Bệnh than thể màng não.



Hình 1. Bệnh than thể da phát triển vùng cổ một bệnh nhân

1.1.2. Bệnh dịch hạch

Trong 15 năm gần đây theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) có 20 nước báo cáo, tổng số có 16312 trường hợp người mắc dịch hạch, như vậy trung bình hàng năm có 1088 trường hợp (còn một số nước có dịch hạch nhưng không báo cáo hoặc báo cáo thiếu). Dịch hạch có số người mắc cao nhất vào năm 1991, 1992, 1993. Châu Phi bị dịch hạch nhiều nhất, kế đến là châu Á; châu Mỹ có nhiều ổ dịch thiên nhiên, nhiều vùng dịch xảy ra rải rác, có thời kỳ yên lặng đôi lúc trên 10, 20 năm [39].



Hình 2: Sơ đồ phân bố các vùng được thông báo có dịch hạch trên thế giới năm 1998

Trong năm 1994 vụ dịch lớn xảy ra ở Ấn Độ, sau gần 30 năm yên lặng, với 2500 trường hợp mắc và nghi ngờ dịch hạch, có 54 trường hợp tử vong [39]. Gần như đồng thời với Ấn Độ, Mozambic cũng ghi nhận được dịch hạch thể hạch, sau 15 năm vắng lặng, có tỷ lệ chết cao, nhưng không làm chấn động thế giới như Ấn Độ, điều đó có lẽ do ở Ấn Độ các phương tiện truyền thông đại chúng phát triển và giao lưu với thế giới rộng hơn.

Năm 1998 đã có 12 quốc gia báo cáo chính thức cho WHO với 2464 bệnh nhân, tử vong 209 ca. Năm 1999 có 14 quốc gia báo cáo; số mắc 2603, tử vong 212 ca [39].

Châu Phi: Năm 1998 dịch hạch được báo cáo tại 4 nước (Madagasca, Mozambic, Uganda và Zimbabwe) với tổng số mắc là 2341 ca, tử vong 182 ca, tương đương 95,0% và 87,1% số mắc bệnh và chết trên toàn cầu. Năm 1999 có 5 nước báo cáo (Madagasca, Malawi, Mozambic, Namibia và Cộng hoà Tanzania) với 2344 ca mắc 196 ca tử vong do dịch hạch tương ứng với 94,8% và 90,1% tỷ lệ mắc, chết toàn cầu [39].

Châu Mỹ: năm 1994, 4 quốc gia (Brazil, Ecuador, Peru và Mỹ) ghi nhận tổng số 28 ca mắc bệnh dịch hạch, tử vong 14. Năm 1999, dịch hạch xảy ra tại 3 nước Brazil, Peru và Mỹ với 37 trường hợp bị mắc và bị chết 1 người.

Châu Á: Năm 1998, 2 nước Mông Cổ và Việt Nam ghi nhận 95 bệnh nhân dịch hạch (13 tử vong), tương đương với 3,9%, 6,2% tổng số các trường hợp mắc, chết trên toàn thế giới. Năm 1999 có 4 nước (Trung Quốc, Cadactan, Mông Cổ và Việt Nam) ghi nhận 222 ca dịch hạch và 15 tử vong, chiếm 8,5% và 7,1% tổng số mắc và chết trên toàn thế giới.

Vì vậy không thể nói rằng dịch hạch sẽ được loại trừ trong một thời gian gần, cũng không thể buông lỏng sự giám sát dịch hạch. Năm 1995 ở Madagasca cũng bắt đầu nghiên cứu phòng chống dịch hạch toàn diện và tổ chức một mạng lưới nghiên cứu vấn đề này trong các Viện Pasteur. Ở Trung Quốc mặc dù tình trạng dịch hạch đã được khống chế triệt để, nhưng hệ thống giám sát phòng chống chủ động dịch hạch vẫn được tiếp tục đẩy mạnh nghiên cứu và giám sát chặt chẽ [9].

Dịch hạch có ở Việt Nam trên 100 năm, có khả năng từ Hồng Kông xâm nhập đến từ năm 1898 tại Nha Trang, trong hoàn cảnh của vụ đại dịch thế giới lần thứ III

[18], và lưu hành liên tục cho đến nay. Lịch sử dịch hạch ở Việt Nam có những thời kỳ bùng phát rầm rộ và liên tục, lại có những thời kỳ lắng dịu, nhưng thực sự chưa bao giờ loại trừ được. Có thể chia tiến trình bệnh dịch hạch ở Việt Nam làm 4 thời kỳ dịch tễ học:

- Thời kỳ xâm nhập và tạo lây lan nội địa 1898-1922.
- Thời kỳ lắng dịu và trở thành dịch lưu hành địa phương 1923-1960.
- Thời kỳ bùng phát, lan tràn, lưu hành trên diện rộng 1961-1990.
- Thời kỳ thu hẹp, chỉ còn lưu hành tại 1 số ổ dịch dai dẳng 1991-2000.

Diễn tiến dịch phần nào được khống chế, với số mắc, số chết có chiều hướng giảm và phạm vi dịch thu hẹp dần. Trong 2 năm 2000-2002 chỉ còn 2 tỉnh Gia Lai và Đắc Lắc ghi nhận có dịch ở một số ổ dai dẳng. Tỉnh Gia Lai vẫn còn dịch còn tản phát ở: Huyện Đak Đoa, Chư path, Mang Giang và thành phố Pleiku. Tỉnh Đắc Lắc: Huyện Ea Hleo [4].

Tại Gia Lai và Đắc Lắc sau khi xuất hiện từ năm 1964, dịch liên tục xảy ra hàng năm, tỷ lệ mắc ở mức độ rất cao so với cả nước (1965-1970, 1976-1988)[18]. Đặc biệt, các năm 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001 dịch liên tiếp xảy ra ở Gia Lai (Azunpa, Chư Sê, Mang Giang, Chư Path và ngay cả ở thành phố Pleiku) và Đắc Lắc (Ea Hleo) với con số mắc có lúc lên tới hàng trăm người (ở Gia Lai: 1996 có 202 ca, 1997 có 91 ca; ở Đắc Lắc: 1997 có 108 ca, 1999 có 156 ca) và cho đến nay vẫn còn hàng chục ca bệnh được phát hiện hàng năm (năm 2000:8 ca ; năm 2001:12 ca) và vẫn còn có tử vong[4].

1.1.3. Bệnh tả

Vibrio Cholerae được Robert Koch phân lập thành công đầu tiên từ dịch tháo thụt ruột của một bệnh nhân và chứng minh là tác nhân gây bệnh tả vào năm 1883 trong một vụ dịch lớn tại Ai Cập.

Từ khi *Vibrio Cholerae* được phân lập vào năm 1883 đến nay đã xảy ra 7 vụ đại dịch với các triệu chứng lâm sàng rất nặng và tử vong cao. Vụ đại dịch thứ nhất xảy ra vào năm 1817, bắt đầu phát dịch từ các vùng châu thổ sông Hằng và lan tới nhiều nơi ở Châu Á và Trung Đông. Vụ đại dịch thứ hai xảy ra vào những năm đầu của thập kỷ 30, thế kỷ 19. Dịch khởi phát từ Trung Quốc rồi lan rộng ra các nước thế giới. Vụ đại dịch

thứ ba xảy ra vào khoảng những năm 1847-1850 xuất hiện ở Luân Đôn, sau đó lan sang nước Mỹ. Vụ đại dịch thứ tư vào những năm đầu thập kỷ 70, thế kỷ 19, dịch khởi phát ở New Orlands. Vụ đại dịch thứ năm bắt đầu xảy ra ở Ai Cập vào năm 1883, sau đó lan nhanh sang các nước Châu Á Thái Bình Dương và châu Mĩ. Vụ đại dịch thứ sáu xảy ra từ năm 1899 đến năm 1923, khởi phát ở các nước vùng Trung Đông vào những năm đầu thế kỷ 20, lan sang bán đảo Balkan, gây dịch lớn ở Ai Cập, miền Nam và Đông Nam Châu Á. Từ vụ dịch tả thứ 1 đến vụ dịch tả thứ 6 do tác nhân chính là vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* týp sinh học cổ điển [65]. Vụ đại dịch thứ bảy bắt đầu năm 1961, xuất hiện đầu tiên ở Indônêsiã, lan rất nhanh tới các nước vùng Đông Nam Châu Á với tác nhân chính là vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* týp sinh học *ElTor*.

Theo số liệu của quân đội Pháp: đợt dịch tả từ 1862-1865 làm chết 13% tổng số quân Pháp. Năm 1926, dịch tả lại bùng phát, có 7.604 người mắc, tỷ lệ tử vong 68,8%. Năm 1927, dịch tả từ Campuchia lây qua đường sông và đường bộ đến Việt Nam, lan ra miền Trung và miền Bắc, có 23.054 người mắc, tỷ lệ tử vong 72%. Nửa đầu thế kỷ 20, dịch tả ở Việt Nam do phẩy khuẩn tả týp sinh học cổ điển gây ra. Năm 1950 -1975, tình hình dịch tả ở Việt Nam có những nét đổi khác. Năm 1964, miền Nam bùng nổ một vụ dịch tả lớn kéo dài trong 5 tháng, lan ra 35/45 tỉnh, có 28.009 người mắc, tỷ lệ tử vong 41%, tác nhân gây bệnh là *ElTor* và ở miền Bắc từ 1950-1975 không có vụ dịch nào xảy ra dưới dạng lưu hành và phát dịch. Ở miền Bắc, năm 1976, dịch tả xảy ra ở 10 tỉnh, ngày nay bệnh tả vẫn đe dọa miền Bắc.

1.1.4. Bệnh thương hàn

Bệnh này thường tập trung ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như châu Phi, Ấn độ, Paskistan, Đông Nam Á và miền Nam Mỹ [67]. Theo Tổ chức Y tế thế giới (1999), hàng năm có khoảng 21 triệu trường hợp bệnh xảy ra và đã cướp đi sinh mạng cả khoảng 700.000 người. Đa số các trường hợp bệnh và tử vong xảy ra ở các nước đang phát triển, đặc biệt là châu Á với số trường hợp mắc hàng năm tại các nước trong vùng là 1000 ca trên 100000 dân. Sự lây truyền qua đường phân- miệng thông thường là do uống nước hay ăn phải thức ăn có nhiễm mầm bệnh. Bệnh có thể xảy ra ở những nơi điều kiện vệ sinh thiếu thốn, đặc biệt ở những nơi có điều kiện ăn ở, vệ sinh môi trường, nguồn cung cấp nước và xử lý nguồn nước thải kém. Bản thân những người

mang mầm bệnh lại chính là một mầm bệnh có thể lây lan sang người khác. Ngoài ra, ruồi nhặng cũng là nguyên nhân đáng chú ý khi chúng là phương tiện mang mầm bệnh làm ô nhiễm thực phẩm.

Khi nuốt phải thức ăn hay nước uống có nhiễm vi khuẩn thương hàn, phần vi khuẩn sẽ xuống đến ruột non để gây bệnh. Bệnh sốt thương hàn khó được chẩn đoán sớm vì giai đoạn đầu tiên của nhiễm trùng không có triệu chứng. Độ nặng của nhiễm trùng thương hàn rất đa dạng, phụ thuộc chủ yếu ở số lượng vi khuẩn nuốt vào. Nếu bệnh nhân nuốt phải số lượng ít vi khuẩn có thể không biểu hiện bệnh, ngược lại nuốt nhiều vi khuẩn bệnh sẽ nặng thêm và có thể tử vong. Thời gian từ khi nhiễm vi khuẩn đến khi khởi bệnh khoảng 1-2 tuần, tuy nhiên có thể chỉ 3 ngày hay kéo dài đến 3 tháng tùy thuộc số lượng vi khuẩn nuốt phải. Sau khi qua niêm mạc ruột, vi khuẩn bị chặn lại ở hạch mạc treo ruột. Ở đó *S. typhi* có thể nhân lên và một phần vi khuẩn bị dung giải, giải phóng ra nội độc tố. Nội độc tố này kích thích thần kinh giao cảm ở bụng gây tổn thương mảng Peyer, xuất huyết đường tiêu hoá. Các dấu hiệu khởi đầu thường gặp là sốt tăng dần, nhức đầu, mệt mỏi, ăn kém, khó chịu vùng bụng, tiêu phân lỏng ở trẻ nhỏ, táo bón ở trẻ lớn và người lớn. Các triệu chứng tiếp theo là mạch chậm, gan to hay lách to, họng đỏ và khô, tắc ruột từng đoạn. Biến chứng nguy hiểm nhất và cũng là nguyên nhân của hầu hết các trường hợp tử vong do thương hàn là thủng và xuất huyết ruột non [69,70]. Khoảng 4% bệnh nhân sốt thương hàn bị chảy máu ruột non, gây phân đen và 2% bị thủng ruột gây viêm màng bụng, sốc. Các biến chứng nguy hiểm khác có thể gặp của bệnh sốt thương hàn bao gồm: nhiễm độc máu, viêm gan, viêm màng não, viêm thận, viêm xương tủy, viêm cơ tim, viêm phổi và viêm tinh hoàn. Những người mang mầm bệnh mạn tính dễ bị ung thư đường mật và ung thư tại các vị trí khác như ung thư đại tràng, tụy và phổi. Bất kể phương pháp điều trị hay yếu tố nguy cơ nào, tỷ lệ tử vong chung khoảng 4% và có thể tăng lên đến 10% ở các nước đang phát triển. Những bệnh nhân thương hàn sau khi phục hồi không đủ miễn dịch để chống lại bệnh nếu họ lại nuốt phải một số lượng lớn vi khuẩn *S. typhi*.

1.1.5. Bệnh lỵ

Shigella gây bệnh lỵ cho người và động vật linh trưởng khác. Chúng không gây bệnh cho các động vật khác nhưng đôi khi có thể gây bệnh ở chó. Các động vật phòng thí nghiệm như chuột, thỏ, lợn có thể bị lây nhiễm qua con đường ăn uống nhưng chỉ xảy ra sau khi bị đói và cho uống thuốc chống axit và làm giảm nhu động ruột.

Ở người, vùng bị tổn thương bởi trực khuẩn lỵ thường chỉ giới hạn ở vùng trực tràng và đại tràng, trừ một số trường hợp ở đoạn cuối ruột non. Đặc trưng là sự viêm cấp tính thành ruột, vi khuẩn ít khi xâm nhiễm sâu qua lớp màng propria, hiếm khi có sự lây nhiễm vào máu.

Nhiễm do *S. sonnei* hiếm khi vượt qua giai đoạn viêm phát thành ruột, trừ lây nhiễm với *S. dysenteriae* típ 1 hay với các chủng *S. flexneri* thường gây viêm loét.

Trên toàn thế giới, theo báo cáo của Tổ chức sức khỏe thế giới (WHO), bệnh do vi khuẩn *Shigella* gây ra cái chết cho khoảng 600.000 người mỗi năm, chủ yếu là ở các nước đang phát triển. Sự lây nhiễm xảy ra thông qua thức ăn và nguồn nước sinh hoạt bị ô nhiễm. *S. dysenteriae* phổ biến ở các vùng đông đúc dân cư và thường gây thành dịch lớn trong khi *S. flexneri* chỉ phổ biến ở một số địa phương nhỏ. Còn *S. sonnei* lại hay gây bệnh ở các nước đang phát triển.

1.2. Tổng quan về các vi khuẩn gây bệnh

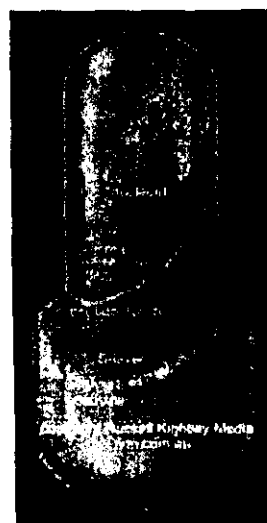
1.2.1. Vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây bệnh than

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của Ba được xác định sau một đêm nuôi cấy trên môi trường thạch huyết, khuẩn lạc khá lớn, 0,3 — 0,5 cm đường kính, màu khuẩn lạc trắng đến trắng ghi, khuẩn lạc dính. *B. anthracis* là vi khuẩn Gram dương. Tế bào sinh dưỡng hình que, không chuyển động, dài từ 3-5 μm , rộng 1,0-1,2 μm . Chuỗi tế bào dài được hình thành trong in vitro, một vài đôi tế bào được quan sát thấy trong in vivo. Nội bào tử hình elip, nằm ở trung tâm tế bào. Bào tử nang không phồng. Bào tử được hình thành vào thời kì cuối của pha sinh trưởng logarit (Hình 3).



Hình 3. Hình thái tế bào và bào tử của *B. anthracis*

Một đặc điểm quan trọng của *B. anthracis* gây độc là vỏ nhầy (capsul) (Hình 4). Vỏ nhầy có khả năng chống thực bào và dịch diệt vi khuẩn của cơ thể. Trong cơ thể, vi khuẩn bệnh than tạo nên vỏ nhầy, vỏ nhầy không được tạo ra trên môi trường thức ăn (MPA, MPB). Còn bào tử không được tạo ra trong cơ thể sống, nó chỉ được tạo ra khi cơ thể có đủ oxy và trên môi trường không đủ dinh dưỡng, thậm chí trong nước cất. Bào tử có hình elip và được hình thành ở nhiệt độ từ 12-42°C. Vỏ nhầy này có chức năng bảo vệ và làm tăng độc tính của vi khuẩn than. Vỏ nhầy có thể xuất hiện khi nuôi cấy trong môi trường thạch huyết ngựa hoặc trên môi trường dinh dưỡng chứa 0,7 % NaCO₃ ở 37 °C trong điều kiện yếm khí.



Hình 4. Sơ đồ cấu tạo tế bào *B. anthracis*

Bên trong lớp vỏ nhầy là thành tế bào gồm 5 lớp, trong đó lớp vỏ cứng peptidoglycan đóng vai trò quan trọng. *B. anthracis* không có nhân thật, mà là chất nhân nucleoid trong protoplasma, mang nhiều nhiễm sắc thể. Trong tế bào chất có các plasmids. Số lượng của plasmids phụ thuộc vào từng loài phụ (subspecies) và độ độc của từng chủng. Các chủng không có vỏ nhầy thường là không độc.

Đặc điểm hình thái và các tính chất sinh lý, sinh hoá, nuôi cấy của 4 loài thuộc chi *Bacillus* rất giống nhau, cho nên từ lâu đã gây nhiều tranh cãi trong phân loại chúng. Chúng phân bố rộng rãi trong đất, nước, không khí. Nhóm này gồm *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* và *B. mycoides*. Trong khi *B. cereus sensu stricto* là vi khuẩn phân bố rộng khắp, có thể tìm thấy trong các sản phẩm sữa, lương thực và thực phẩm bị hỏng và có thể gây độc cho người sử dụng, thì *B. thuringiensis* lại tổng hợp protein độc diệt côn trùng đặc hiệu và được dùng rộng rãi trong phòng trừ dịch hại. *B. mycoides* lại là vi khuẩn hoại sinh có thể phân biệt được bằng hình thái dạng rẽ của khuẩn lạc. *B. anthracis* là tác nhân gây bệnh than ở người và động vật. Xét về sự phân bố, hoạt tính gây bệnh và các đặc điểm hình thái, bốn loài này được coi là các taxa khác nhau. Nhưng những nghiên cứu gần đây cho thấy cả bốn loài này đều có những tính chất chung và chúng được coi là những dưới loài của một loài đơn - *B. cereus sensu lato*. Kết quả phân tích so sánh các trình tự 16S rRNA của các đại diện của bốn loài phụ này cho thấy chúng hoàn toàn như nhau. Tuy nhiên, theo phân loại của Gordon và cộng sự, *B. thuringiensis* khác với *B. cereus*, *B. mycoides* và *B. anthracis* ở

chỗ chúng có khả năng sinh các thể vùi tinh thể trong quá trình hình thành bào tử. Và bằng phương pháp huyết thanh có thể dễ dàng phân biệt được chúng.

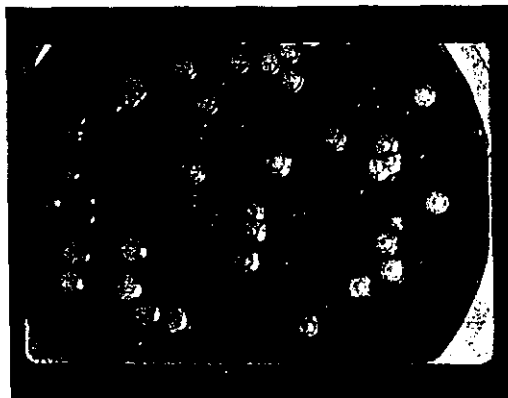
Bào tử của chúng khá bền vững trong điều kiện môi trường khắc nghiệt nên việc kiểm soát chúng trong công nghiệp chế biến thực phẩm, ngăn ngừa bệnh dịch rất tốn kém. *Bacillus* gây bệnh than cho người và động vật là một trong những vi sinh vật quan trọng trong lịch sử nghiên cứu vi sinh vật học (Bảng 1).

Bảng 1. So sánh các loài trong chi *Bacillus* thuộc nhóm *B. cereus* [1]

Đặc điểm	<i>B. cereus</i> (Bc)	<i>B. thuringensis</i> (Bt)	<i>B. mycoïdes</i> (Bm)	<i>B. anthracis</i> (Ba)
Hình que				
- Rộng (μ)	1,0 — 1,2	1,0 — 1,2	1,0 — 1,2	1,0 — 1,2
- Dài (μ)	3 - 5	3 - 5	3 - 5	3 - 5
Phản ứng Gram	+	+	+	+
Thể cầu trong nguyên sinh chất	+	+	+	+
không nhuộm màu				
Bào tử hình elip	+	+	+	+
Bào tử nang không phồng	+	+	+	+
Tinh thể	-	+	-	-
Tiên mao	+	+	-	-
Phát triển yếm khí	+	+	+	+
Phản ứng V-P	+	+	+	+
Phát triển trong 0,001% lysozyme	+	+	+	+
7% NaCl ở môi trường pH 5,7	+	+	+	+
Tạo axit ở môi trường có glucose	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-
Thủy phân tinh bột	+	+	+	+
Sử dụng citrate	+	+	+	+
Khử Nitrat thành Nitrit	+	+	+	+
Khử amin của phenilalanin	-	-	-	-

1.2.2. Vi khuẩn *Yersinia pestis* gây bệnh dịch hạch

Vi khuẩn *Y. pestis* thuộc họ *Enterobacteriaceae*, tế bào có hình bầu dục dạng trực khuẩn nhỏ hai đầu tròn, kích thước $0,5 \times 0,8 \times 1-2 \mu\text{m}$. Bắt màu Gram (-), đậm ở 2 cực. Vi khuẩn *Y. pestis* có nhiều loại hình thể khác nhau (đa hình thái), không sinh nha bào, có thể có vỏ khi nuôi cấy trên môi trường thích hợp ở nhiệt độ 37°C hoặc khi tiêm truyền cho động vật thí nghiệm. Không có vỏ khi nuôi cấy ở 28°C [19].



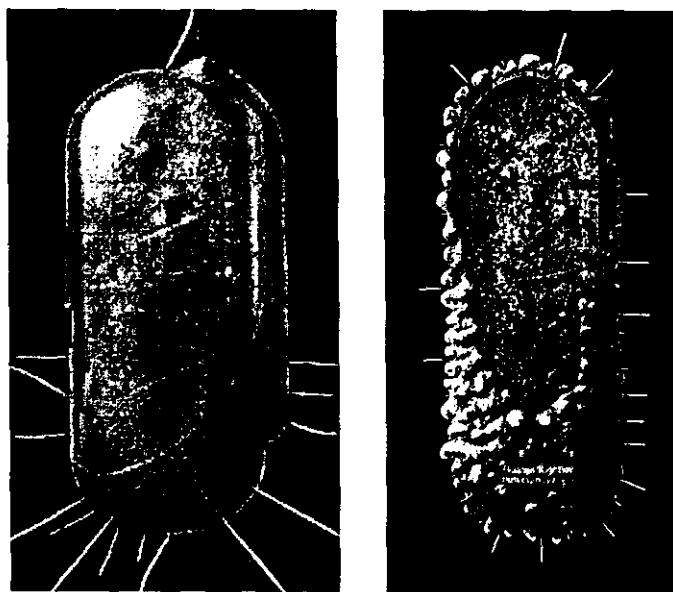
Hình 4: Hình dạng khuẩn lạc *Yersinia pestis* nuôi cấy trên môi trường thạch máu cừu sau 72h, có hình dạng như "quả trứng rán" [44]

Y. pestis mọc trên các môi trường nuôi cấy thông thường, nhưng chậm. Sau khi ủ ở 30°C hoặc 37°C trong 24 giờ, khuẩn lạc nhỏ ($0,1 \text{ mm}$). Đây là đặc điểm có giá trị để phân biệt *Y. pestis* với các *Enterobacteriaceae* khác [55]. Sau 48 giờ ở nhiệt độ 28°C , đường kính khuẩn lạc khoảng $1-1,5 \text{ mm}$, bờ trải mỏng ra và không đều, bề mặt nhẵn hoặc xù xì, trung tâm lõm tạo nên hình ảnh nửa chiếc vỏ trái cây úp xuống dạng R (Rough forms). Chỉ ở dạng R thì vi khuẩn dịch hạch mới có độc lực. Trong điều kiện nhất định chúng có thể biến dị từ dạng R sang dạng S (Smooth forms) hoặc trung gian giữa dạng R và S là dạng O (Oline), lúc gần dạng R là dạng OR, lúc gần dạng S là dạng OS [20]. Trong môi trường canh thang vi khuẩn *Y. pestis* mọc có hình ảnh rất đặc biệt. Sau 24-48 giờ môi trường trong suốt, còn vi khuẩn thì thành những hạt nhỏ lơ lửng rồi sau đó lắng xuống đáy ống nghiệm mọc theo lối ngưng kết, Grand đã viết: '*Tất cả các giống vi khuẩn nào đục môi trường thì không phải là vi khuẩn dịch hạch*' [21]. Vi khuẩn *Y. pestis* không có khả năng di động, đây là dấu hiệu chính để phân biệt với các loại vi khuẩn gần cận nhất như vi khuẩn giả lao mà chúng có khả năng di động.

Dưới kính hiển vi điện tử, tế bào vi khuẩn dịch hạch có dạng hình que hai đầu tròn lại. Thành tế bào có 4 lớp bề dày chừng $180-240 \text{ \AA}$, màng ngoài của thành tế bào có 2 lớp. Bề dày mỗi lớp $30-35 \text{ \AA}$, không có màng cơ sở (màng đáy) là đại diện của

thành tế bào vi khuẩn dịch hạch. Màng sinh chất dính liền với thành tế bào có cấu trúc và kích thước tương tự màng ngoài (Hình 5). Theo Nguyễn Văn Mẫn và cs. (1982) thành tế bào vi khuẩn dịch hạch ngấm tia điện tử mạnh và có độ dày khoảng 500Å, tách biệt rõ ràng với màng nguyên sinh chất bên trong, bề ngoài bao phủ một lớp niêm dịch rất mỏng với cấu tạo Lipopolysaccarid và Lipoprotein và thành tế bào là lớp màng đôi với khoảng cách là 200Å và nằm cách lớp thành tế bào 100Å [13]. Cấu trúc bên trong của tế bào vi khuẩn dịch hạch gồm: nguyên sinh chất, chất nhân và cấu trúc phụ. Trong nguyên sinh chất có các hạt ribosom hấp thu tia điện tử mạnh. Những hạt ribosom này phân bố đều khắp trong nguyên sinh chất và xen kẽ với chất nhân. Theo các tác giả khác, trong nguyên sinh chất của tế bào vi khuẩn dịch hạch có chứa 3, 4 merosom. Ribosom của vi khuẩn dịch hạch có các loại sau: 60S khi phân ly cho hai mảnh nhỏ 40S và 20S; loại 70S có dạng bầu dục nhỏ đều đặn (210 x 170Å) với một rãnh phân chia ribosom thành hai phần không đều nhau, loại 50S có dạng elip một nửa với ba răng cưa trên mặt phẳng (170 x 160Å) và tiểu phần 50S có dạng ovan, đường kính trung bình 160Å. Protein của Ribosom 70S đã phát hiện thấy 40 thành phần trong đó có 9 protit có tính chất axit còn 31 có tính bazơ. Trọng lượng các phân tử protein nằm trong khoảng 70.000 - 75000 Da. Thành phần cấu tạo còn có tất cả các amino acid thường có của protein globulin.

Hình 1: Mô phỏng cấu trúc vi khuẩn *Yersinia pestis*



Chất nhân của tế bào *Yersinia pestis* thường gặp ở những vi khuẩn đã phát triển ở giai đoạn cao, còn những vi khuẩn ở giai đoạn đầu, chất nhân xen kẽ với chất nguyên

sinh không tách biệt rõ rệt. Chất nhân quan sát được gồm những cấu trúc sợi cuộn với nhau thành búi, nằm chính giữa vi khuẩn, từ những búi đó có những sợi mảnh vài chục Å chạy ra nguyên sinh chất và liên hệ chặt chẽ với nguyên sinh chất (Hình 5). Những cấu trúc phụ thường gặp là những bó sợi có đường kính ngang mỗi sợi là 200 Å và nằm theo chiều dài vi khuẩn, đặc biệt ở những tế bào đã thoái hoá thì hình ảnh những bó sợi này vẫn còn lại [13]. Theo Cooker (1956) có thể đó là những khởi đầu của sự thoái hoá của vi khuẩn. Ngoài ra cũng còn quan sát thấy những hạt hoặc những đám kiểu hoa hồng nằm rải rác trong nguyên sinh chất. Chúng hấp thu tia điện tử mạnh và chất glucogen được tổng hợp trong quá trình phát triển, được gọi là chất dự trữ của vi khuẩn.

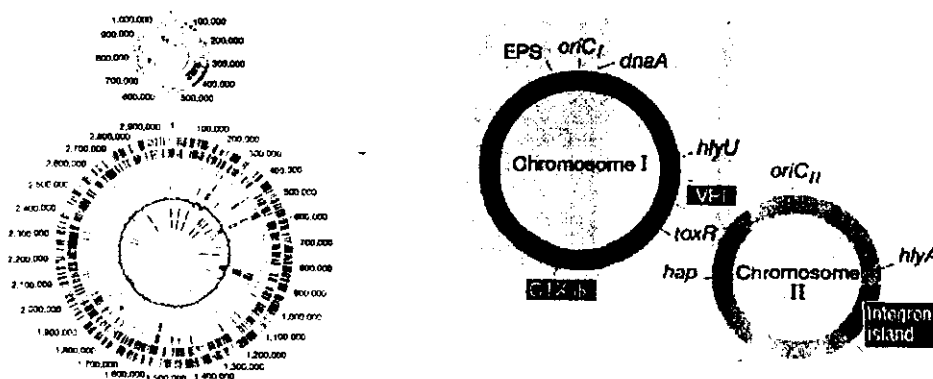
1.2.3. Vi khuẩn *Vibrio cholerae* gây bệnh tả

Vibrio cholerae thuộc họ *Vibrionaceae*, chúng bắt màu gram (-), có hình que hơi cong, kích thước khoảng $(0.3-0.6) \times (1-5) \mu m$, không sinh bào tử, di động mạnh, có tiên mao ở một đầu [59]. Tế bào vi khuẩn có hình cong như dấu phẩy, do vậy được gọi là phẩy khuẩn tả (*Vibrio Comma*) (hình 6).



Hình 6. Vi khuẩn tả *Vibrio cholerae*

Genom của *Vibrio Cholerae* gồm có 2 nhiễm sắc thể (NST) dạng vòng với kích thước tương ứng là 2961149 cặp bazơ (NST I) và 1072314 cặp bazơ (NST II). Cả 2 NST chứa 3885 khung đọc mở (open reading frame, ORF). Sơ đồ cấu trúc genom và cấu trúc NST của vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* được thể hiện trong hình 7.



Hình 7. Genome và cấu trúc NST của *Vibrio cholerae*

NST lớn I chứa nhiều gen cần thiết cho việc thực hiện chức năng tế bào (sự nhân đôi ADN, sự phân chia tế bào, sự phiên mã, dịch mã và sinh tổng hợp thành tế bào) hơn NST nhỏ II. NST lớn I mang hầu hết các locus gen liên quan đến tính gây độc như yếu tố quyết định tính độc của tác nhân gây bệnh là độc tố gây bệnh tả (Enterotoxin), được mã hoá bởi hệ gen của một virus, đã được gắn vào bên trong hệ gen của *Vibrio Cholerae* trên NST I.

Tất cả các gen nằm trên NST II được xếp vào 16 nhóm dựa theo sự chia nhỏ các chức năng của tế bào, những gen quan trọng trên NST II là các gen liên quan đến sự vận chuyển đường, ion kim loại, các ion âm, cơ chế chuyển hoá đường và năng lượng, sự truyền tín hiệu và cơ chế sửa chữa ADN [66].

1.2.4. Vi khuẩn *Salmonella typhi* gây bệnh thương hàn

Salmonella là loại vi khuẩn Gram âm, thuộc họ *Enterobacteriaceae*. Chúng thường có dạng hình que với kích thước chiều dài khoảng 2-5 μm và chiều rộng khoảng 0,7- 1,5 μm (Hình 8). *Salmonella* có thể sống theo cả hai phương thức hiếu khí và kỵ khí. Do đó, vi khuẩn này có thể tồn tại ở nhiều điều kiện sống khác nhau, đặc biệt thích hợp là trên các nguồn thức ăn [67]. Trong *Salmonella*, *S. typhi* là loài vi khuẩn gây ra bệnh sốt thương hàn.



Hình 8: Ảnh hiển vi điện tử vi khuẩn *S. typhi*

1.2.5. Vi khuẩn gây bệnh lỵ

Chi *Shigella* thuộc Họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae*. Trong phân loại vi khuẩn chúng thuộc Lớp Proteobacteria, nhóm gamma và bao gồm 4 loài: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* và *S. sonnei*.

Các chủng của mỗi loài được phân biệt khác nhau theo định típ huyết thanh. Loài *S. dysenteriae* có 10 típ huyết thanh, mỗi típ có một kháng nguyên riêng biệt. Có ít phản ứng chéo giữa các loài hay trong cùng một loài. *S. flexneri* có 8 típ huyết thanh và 9 nhóm dưới típ. Về kháng nguyên các típ có quan hệ với nhau, nhưng mỗi típ có một kháng nguyên đặc trưng khác nhau về chất lượng. Cơ sở hoá miễn dịch và di truyền của cấu trúc kháng nguyên phức tạp của loài đã được Petrovskaja và Bondarenko tập hợp vào năm 1997. Trừ *S. flexneri* Típ 6, kháng nguyên O chứa nhóm các kháng nguyên 3, 4 được coi là cấu trúc bậc 1 chủ yếu. Các kháng nguyên đặc trưng Típ I, II, III, IV và các nhóm kháng nguyên 7, 8 là sự chuyển pha của các kháng nguyên 3, 4 tạo nên trong quá trình hợp nhất các nhánh phụ thứ cấp α -glycogyl. Kháng nguyên đặc trưng Típ III và nhóm kháng nguyên 6 khác các nhóm kháng nguyên trên ở chỗ chứa các nhóm axetyl. Tuy vậy, các kháng nguyên này cũng được hình thành như là kết quả của sự chuyển giai đoạn của kháng nguyên 3, 4. Kháng nguyên lớp oligosaccharide O của Típ VI không giống với kháng nguyên O của *S. flexneri* và không chứa các thể xác định hoá miễn dịch của các kháng nguyên 3, 4. Vì thế, về miễn dịch học các chủng của Típ VI hình như được coi là một loài loài.

S. boydii có 15 típ và mỗi típ có một kháng nguyên khác nhau về chất lượng. Có thể có các phản ứng chéo với kháng huyết thanh đối với các loài *Shigella* khác nhưng hiếm khi nhầm lẫn trong chuẩn đoán. Típ 10 và 11 có chung một kháng nguyên, mặc dù mỗi kiểu có một kháng nguyên đặc hiệu.

S. sonnei chỉ có một típ duy nhất, tồn tại trong 2 “pha” I và II; mỗi một pha có kháng nguyên riêng biệt. Pha II được xem như là sự biến dị tổn thất, nhưng vẫn có thể phân lập tế bào từ bệnh nhân, thường trong giai đoạn phục hồi cho đến khi chấm dứt. Có thể sử dụng kháng huyết thanh chứa agglutinin cho cả 2 pha để xác định mầm bệnh.

Bên cạnh các típ huyết thanh đã được thừa nhận, Ewing và cộng sự (1958) đã miêu tả một số típ tạm thời. Các típ này có thể được bổ sung vào sơ đồ kiểm định huyết thanh trong tương lai, nhưng hiện tại chưa được thừa nhận và kháng huyết thanh để xác định chúng chỉ có thể có ở các phòng kiểm nghiệm (reference labo). Các serovar

tạm thời đang được xem xét hiện nay bao gồm *S. dysenteriae* 3873-50, 2000-53, 3341-55 và *S. boydii* 3615-53, 2710-54 và 1621-54.

Đến nay, có nhiều ý kiến cho rằng phải chăng *E. coli* là một loài thuộc Chi *Shigella*. Sở dĩ như vậy, trước hết bởi lai ADN tổng số không cho phép phân biệt sự khác nhau với loài *E. coli*. Về sinh hóa, loài *E. coli* xâm nhiễm tế bào ruột (EIEC) rất giống với vi khuẩn nhóm *Shigella*. Về huyết thanh học, một số EIEC có liên quan tới *Shigella*, ví dụ EIEC, tít huyết thanh 0124 cũng làm kết tủa kháng huyết thanh của *S. dysenteriae* tít 3. Gần đây, các phân tích trình tự gene 16S rRNA cũng đã cho thấy độ tương đồng của *E. coli* với các loài *Shigella* rất cao, cụ thể với loài *S. sonnei* và *S. flexneri* độ tương đồng đạt tới 99,5 %, với *S. boydii* là 99,3 % và với *S. dysenteriae* là 90 %. Vì vậy, năm 1973 Brenner. D. J và cộng sự đã đề nghị xếp *E. coli* vào cùng một chi với các loài *Shigella* chứ không phải thuộc chi *Escherichiae* nữa. Điều này đã được Rong Fu Wang và cộng sự ủng hộ (1997) sau khi dùng chương trình MEGA phân tích trình tự gene 16S rRNA của các loài này. Đặc điểm này cần phải được chú ý tới trong quá trình nghiên cứu tạo KIT xác định nhanh vi khuẩn *Shigella*.

Độc tố Shiga là sản phẩm của tế bào vi khuẩn *Shigella* và là tác nhân gây bệnh. Về hóa học, độc tố Shiga là một protein, gồm tiểu phần A (32 KDa) có vai trò của một enzym và một phức hệ các tiểu phần B (7,6 KDa) đóng vai trò liên kết với thụ thể. Tiểu phần A bao gồm 2 chuỗi polypeptide A1 (27 KDa) và polypeptide A2 (5 KDa) liên kết với nhau qua một cầu disulfide. Chức năng của tiểu phần A là làm ngừng hoạt động tổng hợp protein của tế bào chủ bằng cách làm bất hoạt thể ribozoom 60S. Tiểu phần B đóng vai trò nhận biết glucolipid Gb3 trên bề mặt tế bào chủ. Các protein này được mã hóa bởi các gen *stxA* và *stxB*. Các gen này khu trú trên nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn.

1.3. Giới thiệu một số phương pháp chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh

Trong lịch sử nghiên cứu sinh học có rất nhiều các phương pháp khác nhau đã được đưa ra để xác định vi khuẩn. Tuy nhiên mỗi phương pháp đều có những ưu, nhược điểm riêng và phát hiện được vi khuẩn ở những mức độ khác nhau. Đối với mỗi loài vi khuẩn để xác định có thể sử dụng phương pháp chung hay phương pháp riêng đặc trưng cho loài vi khuẩn đó.

- Phương pháp nhuộm tiêu bản: Dùng các phương pháp và thuốc nhuộm khác nhau để xác định vi khuẩn

- Phương pháp nuôi cấy và định loại

- Phương pháp dùng thực khuẩn thể Gamma

- Phương pháp xét nghiệm của Widal: là phương pháp cổ điển nhất, được một số nước ưa chuộng sử dụng vào thế kỷ trước. Đây là phương pháp thử nghiệm thô dùng để phát hiện kháng thể có kháng nguyên ngưng kết với tế bào vi khuẩn trong ống nghiệm nhưng ngày nay người ta đã chứng minh phương pháp này không có độ tin cậy cao đặc biệt khi sử dụng để phát hiện bệnh nhân trong vùng bị bệnh. Năm 2000, Chart H và cộng sự đã đưa ra kết luận chỉ nên sử dụng phương pháp Widal đối với kháng nguyên O và kháng nguyên H, không nên sử dụng cho kháng nguyên Vi [74]

- Phản ứng ngưng kết hồng cầu thụ động (IHA): Trong các phản ứng huyết thanh có hồng cầu, hồng cầu đóng vai trò là vật mang thụ động kháng nguyên và kháng thể, tức hồng cầu có khả năng hấp phụ tích cực lên bề mặt của nó những hợp chất hoá học khác, như các protein lipopolysaccharid (LPS). Việc gắn lên hồng cầu các kháng nguyên hoặc kháng thể của vi khuẩn khác nhau và việc sử dụng chúng trong nghiên cứu huyết thanh học để phát hiện kháng thể hoặc kháng nguyên đặc hiệu gọi là phản ứng ngưng kết hồng cầu thụ động. WHO đã tiêu chuẩn hoá phản ứng này và khuyến cáo nên dùng để chẩn đoán bệnh ở người, để nghiên cứu huyết thanh dịch tễ học và dịch hạch ở động vật [5,44].

- Phản ứng ngưng kết hạt Latex (Latex Agglutination test): Suzuki và cộng sự đã gắn kháng nguyên F1 trên các hạt latex polystyrene. Phản ứng này về độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương với phản ứng ngưng kết hồng cầu và có những ưu điểm là kháng nguyên gắn trên hạt bền vững được ít nhất là 12 tháng và cách sản xuất cũng dễ hơn so với hồng cầu cừu [58].

- Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang: Có thể chẩn đoán nhanh bằng phương pháp huỳnh quang trực tiếp với kháng thể kháng F1 được gắn fluorescein isothiocyanat. Phương pháp này đòi hỏi phải có kính hiển vi huỳnh quang. Tính đặc hiệu của phương pháp này cao. Nguyên tắc là dùng kháng thể F1 gắn với chất phát quang, tạo thành phức hợp dùng để phát hiện kháng nguyên F1 của vi khuẩn [5].

- Kỹ thuật ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Phản ứng ELISA có độ nhạy cao và đặc biệt có thể phát hiện được lớp kháng thể IgA, IgM nên có thể phát

hiện được bệnh sớm đảm bảo điều trị bệnh kịp thời, vì kháng thể IgM, IgA xuất hiện sớm trong đáp ứng miễn dịch so với các lớp kháng thể khác. Phản ứng ELISA với kháng nguyên LPS được áp dụng với nhiều loại vi khuẩn [15,35,43,72,73].

1.4. Phương pháp luận trong việc sử dụng kỹ thuật PCR để chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh.

1.4.1. Nguyên lý của phản ứng PCR

Phương pháp PCR (Polymeraza Chain Reaction) do Karl Mullis và cộng sự phát minh năm 1985 được sử dụng rộng rãi nhất. Thực chất đây là một phương pháp tạo dòng *in vitro*, không cần sự hiện diện của tế bào.

Tất cả các ADN polymeraza khi hoạt động tổng hợp một chuỗi ADN mới từ chuỗi khuôn trước đó, đều cần sự hiện diện của những môi chuyên biệt. Môi là những đoạn ADN ngắn (17-30 bp), có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của chuỗi ADN làm khuôn, và ADN polymeraza sẽ nối dài môi để hình thành chuỗi mới. Phương pháp PCR đã được hình thành dựa vào đặc tính đó của các ADN polymeraza và sự tham gia của môi. Nếu cung cấp hai môi chuyên biệt bắt cặp bổ sung với hai đầu của một trình tự chuỗi xoắn kép ADN, đoạn ADN giới hạn giữa hai vị trí mà cặp môi bám vào sẽ được tổng hợp nhờ phản ứng PCR. Điều đó có nghĩa là để thực hiện nhân một đoạn ADN xác định, cần có thông tin tối thiểu về trình tự nucleotit, đủ để tạo các môi bổ sung chuyên biệt; các môi này bao gồm một môi xuôi (forward primer) và một môi ngược (reverse primer), hoạt động để nhân lên đoạn ADN dài ngắn khác nhau. Từ "xuôi" và "ngược" phải hiểu là xuôi và ngược được biểu thị so với chiều phiên mã của gen (5' -->3').

Do có những ưu điểm tuyệt đối trong nghiên cứu sinh học phân tử, kỹ thuật PCR được nhanh chóng áp dụng rộng rãi để chẩn đoán (diagnosis), giám định (identification) các bệnh về vi khuẩn, virus, các bệnh ký sinh trùng với kết quả rất chính xác. Mặt khác, sự phân tích thành phần và trật tự nucleotit trên phân tử ADN trong hệ gen còn có giá trị rất lớn trong phân loại (taxonomy), nghiên cứu phả hệ (phylogenetic analysis) và lịch sử tiến hoá quần thể (evolutionary history) các loài sinh vật.

1.4.2. Sử dụng kỹ thuật PCR để chẩn đoán một số vi khuẩn gây bệnh.

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh than *Bacillus anthracis*

Tác nhân gây bệnh than là trực khuẩn *Bacillus anthracis* (Ba). *B. anthracis* là vi khuẩn hình que, Gram dương, sinh bào tử, hô hấp hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc. Trong cơ thể động vật bị nhiễm bệnh, tế bào có cấu tạo vỏ màng nhầy (capsule). Có hai plasmid liên quan đến tác nhân gây bệnh của *B. anthracis*, pXO1 và pXO2. pXO1 chứa các gen mã hoá độc tố ngoại bào bộ ba bao gồm các thành phần: kháng nguyên bảo vệ PA, nhân tố gây phù EF và nhân tố gây tử vong LF. Các thành phần này nếu đứng riêng rẽ sẽ không gây độc. Hiệu quả gây độc là do sự hoạt động kết hợp của PA với hai thành phần kia (EF, LF), PA kết hợp với EF gây phù thũng, còn nếu kết hợp với LF sẽ gây chết cho cơ thể bị nhiễm. Các gen của pXO2 mã hoá tổng hợp protein trong sinh tổng hợp vỏ màng nhầy axit poly-D-glutamic. Các protein này đều được mã hoá bởi các gen khác nhau, do vậy nếu xác định được sự có mặt của các gen đó trong hệ gen của vi khuẩn bằng các cặp mồi đặc hiệu ta có thể khẳng định rằng vi khuẩn đó là *B. Anthracis*. Để phát hiện *B. anthracis* ta có thể sử dụng một trong 2 cặp mồi đặc hiệu cho gen mã hoá vùng VNTR (sản phẩm PCR có kích thước 167bp) và gen mã hóa kháng nguyên bảo vệ (sản phẩm PCR có kích thước 596bp). Để xác định *B. anthracis* đó có độc hay không ta dùng cặp mồi cho gen mã hóa protein gây độc (sản phẩm PCR có kích thước 846bp) của *B. anthracis*, việc phát hiện gen được thực hiện bằng phản ứng PCR và điện di trên gel agarose 2%.

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh dịch hạch *Yersinia*

Cả 3 loài đều chứa loại plasmid có tên gọi là *pCD1*. Đây là loại plasmid có kích thước trung bình, hệ gen của plasmid này chứa 70.509 cặp nucleotit, với khoảng 60 cấu trúc gen, trong đó có trên 80% đã biết chức năng của sản phẩm. Plasmid *pCD1* còn được gọi là **plasmid LCR** (low Ca^{++} response) do chúng có đặc tính phản ứng tạo độc lực mạnh khi nồng độ canxi trong môi trường thấp hoặc không có canxi. Lúc đó, các gen *LCR* (có tất cả 47 gen chịu trách nhiệm sản xuất các sản phẩm protein tham gia quá trình phản ứng này) sẽ được hoạt hóa và tổng hợp các loại protein độc lực gọi là *kháng nguyên V* (V antigen), mà gần đây người ta còn gọi là yếu tố độc lực *LcrV*. Một hệ thống gen khác chịu trách nhiệm tạo ra sản phẩm có vai trò làm yếu tố độc lực của *Yersinia* là hệ thống phức hợp gen *Yop* (*Yersinia* outer protein). *Yop* là các cấu trúc gen nằm rải rác phân bố trên vòng ADN hệ gen của plasmid *pCD1*, bao gồm một số

gen được ký hiệu *YopA*, *B*, *C*... Như vậy, yếu tố độc lực của cả 3 loài vi khuẩn *Yersinia* gây bệnh ở người và động vật đều do hai hệ thống phức hợp gen *LCR* và *Yop* chịu trách nhiệm. Hai hệ thống cấu trúc gen này đều định vị trên plasmit pCD1. Do có chứa plasmit gây bệnh này, nên cả 3 loài *Yersinia*, đều có một số đặc tính gây bệnh chung do sản phẩm của hai hệ thống gen *LCR* và *Yop* chịu trách nhiệm gây ra. Về thành phần nucleotit và axit amin, các gen tương ứng trong cả hai hệ thống của cả 3 loài có khoảng 80—90% tương đồng, thậm chí một số gen gần như có thành phần nucleotit và axit amin đồng nhất (trên 95%). Về góc độ chẩn đoán, rõ ràng nếu phát hiện được một số gen chọn lọc trong hai hệ thống này, sẽ giúp chúng ta nhanh chóng xác định sự có mặt của plasmit pCD1 đặc trưng cho riêng của 3 loài gây bệnh *Yersinia* mà các loài vi khuẩn đường ruột khác không có. Để phát hiện *Yersinia* sử dụng cặp mồi PLAF-PLAR, đoạn ADN nhân lên bằng PCR có độ lớn 0,48 kb (480bp). Sản phẩm PCR được phát hiện khi điện di trên thạch (gel) agarosa 0.8-2%.

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh tả *Vibrio cholerae*

Genom của *Vibrio Cholerae* gồm có 2 nhiễm sắc thể (NST) dạng vòng với kích thước tương ứng là 2961149 cặp bazơ (NST I) và 1072314 cặp bazơ (NST II). Cả 2 NST chứa 3885 khung đọc mở (open reading frame, ORF). NST I mang hầu hết các locus gen liên quan đến tính gây độc như yếu tố quyết định tính độc của tác nhân gây bệnh là độc tố gây bệnh tả (Enterotoxin). Để phát hiện vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* sử dụng ADN dùng làm khuôn để khuếch đại gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza. Gen mã hoá Enterotoxin của vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu TOXM2, TOXP1, gen mã hoá Malate dehydrogenaza được khuếch đại với cặp mồi MALATP3, MALATM6, gen mã hoá Hemolysin được khuếch đại với cặp mồi HLYA1, HLYA2. Theo lý thuyết sản phẩm PCR của gen mã hoá Enterotoxin có chiều dài khoảng 1300 cặp bazơ, gen mã hoá Hemolysin có chiều dài khoảng 1100 cặp bazơ và gen mã hoá Malate dehydrogenaza có chiều dài khoảng 1400 cặp bazơ. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh thương hàn *S. typhi*

Có rất nhiều công trình nghiên cứu sử dụng phương pháp này vào chẩn đoán *S. typhi* dựa trên nhiều gen khác nhau như gen mã hoá cho flagellin H:d, gen mã hoá cho ARN 5S, gen mã hoá cho protein tham gia vào tạo kháng nguyên vỏ (Vi). Các công trình đã cho thấy: phương pháp dựa vào vùng gen mã hoá cho protein tạo kháng nguyên Vi mới

có đủ độ nhạy và tính đặc hiệu cho phát hiện *S. typhi*. Người ta nhận thấy rằng phương pháp này có thể phát hiện *S. typhi* ở mức độ tế bào đơn trong thời gian từ 1-2 ngày. *S. typhi* có chứa 3 kháng nguyên bề mặt đó là kháng nguyên O, kháng nguyên roi (H:d) và kháng nguyên vỏ (Vi). Trong đó kháng nguyên O và kháng nguyên H này không đặc hiệu cho *S. typhi* mà chúng có ở rất nhiều chủng *Salmonella* khác như *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* / Kháng nguyên Vi chỉ có ở một số ít chủng như *S. typhi*, *S. paratyphi C*, *S. dublin* nên chúng đặc hiệu cho *S. typhi* tốt hơn. Trình tự ADN tham gia vào quá trình hình thành kháng nguyên Vi bao gồm 5 đoạn gen khác nhau (*vipR*, *vipA*, *vipB*, *orf4* *vifC*) gọi là vùng *ViaB*. Gen *vipA*, *vipB* và *vipC* mã hoá cho enzym phụ thuộc NAD và NADP⁺ để tổng hợp chuỗi đường nucleotit cho polysaccharit Vi. Những nghiên cứu trước đây cho thấy chỉ vùng gen *vipR* có tính đặc hiệu cao cho *S. typhi*. Vì vậy, trong đề tài này, chúng tôi tiến hành chọn gen *vipR* với chiều dài 595bp để sử dụng làm gen đích trong phương pháp chẩn đoán nhờ kỹ thuật PCR.

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh lỵ *Shigella*

Độc tố Shiga là sản phẩm của tế bào vi khuẩn *Shigella* và là tác nhân gây bệnh. Về hóa học, độc tố Shiga là một protein, gồm tiểu phần A (32 KDa) có vai trò của một enzym và một phức hệ các tiểu phần B (7,6 KDa) đóng vai trò liên kết với thụ thể. Tiểu phần A bao gồm 2 chuỗi polypeptide A1 (27 KDa) và polypeptide A2 (5 KDa) liên kết với nhau qua một cầu disulfide. Chức năng của tiểu phần A là làm ngừng hoạt động tổng hợp protein của tế bào chủ bằng cách làm bất hoạt thể ribozoom 60S. Tiểu phần B đóng vai trò nhận biết glucolipid Gb3 trên bề mặt tế bào chủ. Các protein này được mã hóa bởi các gen *stxA* và *stxB*. Các gen này khu trú trên nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn. Để phát hiện vi khuẩn *Shigella* bằng phương pháp PCR có thể sử dụng các cặp mồi nhân bản các đoạn gen khác nhau như:

Bộ cặp mồi đặc hiệu cho gene mã hóa độc tố Shiga (Tarr và cộng sự, 2002) gồm:

- * Cặp mồi cho đoạn trung gian: mdh p9- mdh p10
- * Cặp mồi cho đoạn gene 1A: 1A.251F- 1A.832R
- * Cặp mồi cho đoạn gene 2A: 2A.506F- 2A.848R

Cặp mồi để thu nhận một phân đoạn gen 16S-ARNr với độ dài khoảng 500 bp: Prr -Prr
 Bộ cặp mồi đặc hiệu ORF 3 của locus *spa* để nhân bản phân đoạn ORF3 của locus *spa* phân đoạn này có độ lớn 118 bp.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Sinh phẩm

2.1.1. Vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn hoặc ADN tách chiết từ các vi khuẩn được nêu ở bảng 2:

Bảng 2: Các chủng vi khuẩn dùng trong nghiên cứu

Chủng vi khuẩn	Nguồn cung cấp
Chủng <i>B. anthracis</i> VCM-0012, chủng chuẩn <i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> (Btk), <i>B. cereus</i> (Bc), <i>B. mycoides</i> (Bm), Chủng phân lập HN5, HN8	Bộ Sưu tập Giống VCM, Phòng Di truyền Vi sinh vật, Viện Công nghệ Sinh học
Chủng <i>B. anthracis</i> chuẩn 34F, 17JB	Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương
Chủng <i>B. anthracis</i> phân lập TS1, TS2	Học Viện Quân Y
Vi khuẩn dịch hạch <i>Y. pestis</i> đã bất hoạt	Bộ môn Vi sinh vật, Đại học Y Hà Nội
Các chủng <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> DH5 α , <i>E. coli</i> JM 101, <i>E. coli</i> JM 109, <i>E. coli</i> XL1 Blue và <i>E. coli</i> HB101	Phòng Kỹ thuật Di truyền, Viện Công nghệ Sinh học
Vi khuẩn tả <i>Vibrio cholerae</i> Inaba 389 và Ogawa 395	Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương
Các chủng <i>Salmonella typhi</i>	
Các chủng <i>Shigella. dysenteriae</i> , <i>Shigella. boydii</i> 342, <i>Shigella. flexneri</i> F3a-388, <i>Shigella. flexneri</i> F2b-395, <i>Shigella. flexneri</i> F2a-407, <i>Shigella. sonnei</i> 348, <i>Shigella. sonnei</i> 364, <i>Shigella. sonnei</i> 367, <i>E. coli</i> EPEC, <i>E. coli</i> EHEC, <i>E. coli</i> ETEC, 11 chủng <i>E. coli</i> ký hiệu từ 1-11.	
Các chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps7-1 và <i>Azospirillum</i> sp. DA10-2	Phòng Vi sinh vật học đất, Viện Công nghệ Sinh học

2.1.2. Các cặp môi

Bảng 3: Trình tự các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự	Kích thước sản phẩm (bp)
Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu <i>Bacillus anthracis</i>		
EWA-1	5'-TATGGTTGGTATTGCTG-3'	167
EWA-2	5'-ATGGTTCCGCCTTATCG-3'	
PA 5	5'- TCCTAACACTAACGAAGTCG -3'	596
PA 8	5'- GAGGTAGAAGGATATACGGT -3'	
1234	5'- CTGAGCCATTAATCGATATG -3'	846
1301	5'- TCCCACTTACGTAATCTGAG -3'	
Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu <i>Yersinia pestis</i>		
PLAF	5' ATCTTACTTTCCGTGAGAAG 3'	480
PLAR	5' CTTGGATGTTGAGCTTCCTA 3'	
Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu <i>Vibrio cholerae</i>		
TOXP1	5'-GGCTGTGGGTAGAAGTGAAACGG-3'	1300
TOXM2	5'-CTTAATTTGCCATACTAATTGCCGC-3'	
HLYA1	5'-GCCAAAACCTCAATCGTTGCG-3'	1100
HLYA2	5'-TGTAAGCTAACCGCTTGCG-3'	
MALATP3	5'-TCTTCCTGCTGGTTCTGATCTCGCG -3'	1400
ALATM6	5'-TTGTGGCAAGCTAAACACGCCCG - 3'	
Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu <i>Salmonella typhi</i>		
<i>vipRf</i>	5' GTTATTTTCAGCATAAGGAG 3'	595
<i>vipRr</i>	5' ACTTGTCGGTGTITTTACTC 3'	
Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu <i>Shigella</i> spp.		
mdh p9	5'- CTA ACC CGG TTA ACA CCA CAG T-3'	201
mdh p10	5'- GGC AGA ATG GTA ACA CCA GAG T-3'	
1A.251F	5'- GGG ATA GAT CCA GAG GAA GG-3'	624
1A.832R	5'- CCG GAC ACA TAG AAG GAA ACT C-3'	
2A.506F	5'- CTG GCG TTA ATG GAG TTC AG-3'	383
2A.848R	5'- CCT GTC GCC AGT TAT CTG AC-3'	

Prf	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	500
Prr	5'-GCGTGGACTAECAGGGTATCTAATCC-3'	
ORF-3f	5'-AGCGATCTTACGTCTTG-3'	118
ORF-3r	5'-CGAGATGTGGAGGCAT-3'	

2.1.2. Các Kit tách chiết

- TA Cloning Kit (Invitrogen)
- QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN)
- S.N.A.P.[™] Purification Kit (Invitrogen)
- BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- QIA Prep Spin Mini Kit (QIAGEN)

2.2. Dụng cụ và hoá chất

2.2.1. Dụng cụ

- Bộ lọc mẫu vi khuẩn (Santorius): Phễu lọc, giá lọc, ống dẫn, bình thu mẫu và màng lọc khuẩn.
- Máy bơm chân không.
- Ống eppendorf chuẩn đoán.
- Máy PCR và bộ điện di agarose.
- Ống ly tâm vô trùng.
- Máy sốc nhiệt.
- Pipet Man, đầu côn các loại cùng một số dụng cụ khác.

2.2.2. Hoá chất

Nước sử dụng để pha môi trường, pha các dung dịch và để dùng trực tiếp trong các thí nghiệm được khử trùng và khử ion theo hệ thống xử lý nước Milli-Q Ultrapure (Millipore, Australia), nước sử dụng cho phản ứng PCR là loại siêu tinh khiết do BRL-GIBCO cung cấp.

Agar dùng cho nuôi cấy vi sinh loại A được cung cấp bởi Becton Dickinson và Co., Cockeysville, MD, USA.

Agarosa để kiểm tra sản phẩm PCR được cung cấp bởi FMC Bioproducts, Rockland, MA., USA

Chỉ thị ADN (ADN Marker) và các enzym giới hạn khác cũng như các dung

dịch đệm do Invitrogen, New England Biolabs, Inc., Beverley, MA., USA cung cấp.

Một số hoá chất sử dụng khác được cung cấp bởi Sigma Chemical Company (St. Louis, MO., USA), Merck PtyLtd., (Kilsyth, VIC., Australia), BDH Laboratory Supplies và Asia Pacific Speciality Chemical Ltd. Tất cả các hoá chất này được sử dụng và bảo quản đúng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

2.2.3. Môi trường

Môi trường cơ bản LB (Luria-Bertani) dùng trong các thí nghiệm nuôi cấy được pha chế theo công thức:

- Bactotrypton hoặc casein hydrolysate:	10 g
- Cao nấm men (bactoyeast extract):	5 g
- NaCl:	10 g
- Với môi trường LB agar cho thêm agar:	15 g
- H ₂ O	1l

Môi trường SOB gồm: Trypton (20g/l), Yeast extract (5g/l), NaCl (10 mM), KCl (2,5 mM) và MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM). MgCl₂ và MgSO₄ được thêm vào sau khử trùng nhiệt độ. Môi trường SOC là SOB có bổ sung thêm 20 mM glucoza sau khi khử trùng.

• Môi trường MPA:		• Môi trường CYS	
Cao thịt	3g	Pepton	10g
Pepton	10g	Cao nấm men	3g
Thạch	20g	Glucoza	7g
NaCl	5g	KH ₂ PO ₄	5g
H ₂ O	1l	MgCl ₂	0,5mM
PH	7-7,2	MnCl ₂	0,5mM
• Môi trường MPB		ZnSO ₄	0,05mM
Cao thịt	3g	FeCl ₃	0,05mM
Pepton	10g	CaCl ₂	0,2mM
NaCl	5g	H ₂ O	1l
H ₂ O	1l		
PH	7-7,2		

- Môi trường RSA là môi trường MPA bổ sung 5% máu thỏ

2.3. Các phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tách chiết ADN từ vi khuẩn

Để thực hiện được phản ứng PCR thì thành phần không thể thiếu là ADN làm khuôn. Đối với mỗi loài vi khuẩn sẽ có các phương pháp khác nhau để tách chiết ADN.

Tách chiết ADN từ vi khuẩn *B. anthracis*

Một khuẩn lạc vi khuẩn mọc trên môi trường thạch máu RBA qua đêm được chuyển vào 200µl dung dịch đệm TE (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1mM EDTA Na), trộn đều, đun sôi trong 20 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, li tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút thu dịch nổi làm khuôn cho chạy PCR.

Tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn *Yersinia pestis*

ADN tổng số của vi khuẩn dịch hạch vô hoạt được tách chiết bằng bộ hoá chất là DNeasy kit của Hãng Qiagen. Quy trình tách chiết được mô tả tóm tắt như sau:

1. Lấy 500 µl sinh khối vi khuẩn, ly tâm 10000 vòng/2 phút, thu được cặn tế bào.
2. Thêm 180 µl ATL vào mỗi ống Eppendorf (dùng đầu côn khuấy tan cặn tế bào). Thêm 20 µl Proteinase-K và 4 µl Rnase-A (nồng độ 100 mg/ml), sau đó lắc đều bằng máy lắc và ủ ở 55°C/2 giờ (thỉnh thoảng lắc trong quá trình ủ).
3. Thêm 200 µl AL, lắc đều 15 phút. Sau đó ủ ở 70°C/10 phút.
4. Thêm 200 µl cồn tuyệt đối (96-100°), lắc đều.
5. Chuyển toàn bộ hỗn dịch sang *ống có màng lọc* của bộ kit DNeasy (mini column) đem ly tâm ở 13000 v/phút trong 1 phút, bỏ dịch ly tâm bên dưới, giữ lại cột có màng lọc.
6. Cho 500 µl dung môi AW1, đem ly tâm ở 13000 v/phút trong 3 phút, bỏ dịch ly tâm dưới cột.
7. Cho 500 µl dung môi AW2, đem ly tâm ở 13000 v/phút trong 3 phút, bỏ dịch ly tâm dưới cột.
8. Chuyển cột DNeasy mini column đặt vào ống Eppendorf 1,5ml mới có ghi ký hiệu mẫu để lưu giữ. Cho 100 µl AE lên màng lọc trong cột, để ở nhiệt độ phòng một phút, đem ly tâm ở 13000 v/phút trong 1 phút. Dịch ly tâm lúc này chính là ADN tổng số, bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Nồng độ ADN được xác định bằng phương pháp đo độ hấp phụ ở bước sóng 260 nm nhờ máy quang phổ kế (spectrophotometer) GBC UV/visible 911A. Hàm lượng

ADN tổng số sử dụng cho mỗi phản ứng PCR (50 µl) là khoảng 100-150 nanogram (ng).

Tách chiết ADN plasmid từ vi khuẩn *Vibrio cholerae*

1. Lấy 1,5ml dung dịch sinh khối vi khuẩn dịch hạch vào ống Eppendorf, ghi ký hiệu cẩn thận.
2. Ly tâm 13.000vòng/phút trong 4 phút để thu cận tế bào.
3. Cho 250µl P1 vào, trộn đều để hoà tan cận tế bào.
4. Cho vào 250µl P2, đảo nhẹ, để nhiệt độ phòng trong 4 phút.
5. Cho vào 350µl N3, đóng nắp, đảo nhẹ bằng cách lộn ngược xuôi vài lần.
6. Ly tâm 13.000vòng/phút trong 10 phút. Thu dịch trong bên trên để chuyển sang cột lọc.
7. Ly tâm 13.000vòng/phút trong 1 phút. Đổ bỏ phần nước dưới cột.
8. Cho vào 500µl PB, ly tâm 13.000vòng/phút trong 1 phút, bỏ nước ở dưới.
9. Cho vào 750µl PE, ly tâm 13.000vòng/phút trong 1 phút, bỏ nước ở dưới, ly tâm 13.000vòng/phút trong 1 phút một lần nữa.
10. Chuyển cột lọc sang ống Eppendorf sạch.
11. Cho 50µl dung dịch thôi ADN (gọi là EB, elution buffer) lên trên màng lọc, để nhiệt độ phòng trong 5 phút, ly tâm 13.000vòng/phút trong 2 phút. Dung dịch bên dưới là ADN plasmid, kiểm tra trên thạch agarosa sau khi cắt bằng enzym giới hạn, và bảo quản ở -20°C cho đến khi cần sử dụng.

Tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn *Yersinia pestis*

- Ly tâm huyền dịch vi khuẩn, loại dịch nổi. Cận tế bào vi khuẩn được hoà lại trong 567 µl TE(10 : 1), bổ sung 32 µl SDS 10% và 3 µl Proteinase K, đảo đều, ủ ở 37 °C trong 1 giờ để phá tế bào.

- Bổ sung 180 µl NaCl 5M, ủ 65°C trong 10 phút, sau đó chiết ADN bằng 700 µl dung dịch phenol, ly tâm thu dịch nổi nằm trên lớp xác tế bào, chuyển sang ống Eppendorf mới. Chiết lại ADN bằng cách bổ sung 600 µl *chloroform* : *isoamylalcohol* (24:1), ly tâm thu dịch nổi chuyển sang ống Eppendorf mới.

- Kết tủa ADN bằng cách bổ sung 1/10 thể tích NaOAc 3M pH 5.2 và 2.5 lần thể tích cồn 100%, sau đó tủa ADN ở - 25°C trong 2 giờ.

- Ly tâm loại bỏ dịch nổi, rửa cặn ADN bằng cồn 70%, làm khô ADN, sau đó hoà lại cặn ADN trong đệm TE chứa *RNase* (100 µg / ml), ủ ở 37°C trong 1 giờ để loại ARN.

Tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn *S. typhi*

Nuôi cấy vi khuẩn *S. typhi* trong 10 ml môi trường LB lỏng (0,5% yeast extract; 1% bacto-pepton; 1% NaCl) ở 37°C, lắc 200 vòng/phút qua đêm.

- Đổ dịch nuôi cấy qua đêm này vào các ống eppendorf 1,5 ml, ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút, thu lấy tế bào. Trong mỗi ống, trình tự các bước tiếp theo được tiến hành như sau:

- Hoà tan tủa tế bào vào 576 µl dung dịch TE (Tris-HCl 1M, pH = 8; EDTA 0,5 M, pH = 8), sau đó bổ sung 30 µl SDS 10% và 3 µl proteinase K 1% và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

- Bổ sung thêm 180 µl NaCl 5M và ủ ở 65°C trong 10 phút.

- Mẫu được lấy ra và đặt ngay trên đá lạnh để tránh đứt gãy ADN genom.

- Ly tâm mẫu ở 13000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để tủa những phân tử protein có khối lượng phân tử lớn.

- Dịch nổi được trộn đều nhẹ nhàng với 2 ml phenol/chloroform/isoamylalcohol. Sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút và chuyển dịch pha trên sang ống eppendorf mới. Quá trình này được tiến hành lặp lại ít nhất 2 lần để loại bỏ hoàn toàn protein có trong mẫu.

- Dịch pha trên chứa ADN genom được tủa bằng 2 lần cồn lạnh tuyệt đối và được thu lại bằng cách ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Tủa ADN được làm khô và hoà lại vào trong 40 µl TE có bổ sung thêm *RNase* 1%. Mẫu được giữ ở — 20°C.

Tách chiết ADN vi khuẩn tổng số của *Shigella* spp.

i. Do tất cả các chủng được sử dụng nghiên cứu đều là vi khuẩn Gram âm, nên tách chiết ADN tổng số của các tế bào-*Shigella* spp., *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *V. inaba*, *V. ogawa* *P. fluorescens* Ps7-1 và *Azospirillum* sp DA10-2 được tiến hành theo Masterson và cộng sự (1985).

ii. Tách chiết ADN vi khuẩn từ mẫu nước sông ngòi.

Nước sông ngòi tự nhiên có thành phần phức tạp nên được lựa chọn làm mô hình để tiến hành nghiên cứu tách chiết ADN vi khuẩn. Các phương pháp theo Yu-li Tsai và cộng sự, 1993; Kuske và cộng sự, 1998; và theo Watanabe, K. và cộng sự, 1998 đã được sử dụng trong quá trình nghiên cứu tách chiết ADN vi khuẩn từ mẫu nước sông ngòi ở Hà Nội. Quy trình như sau:

1. Thu thập mẫu nước (200-400 ml) → 2. Thu sinh khối (qua màng lọc vi khuẩn) → 3. Rửa sinh khối bằng nước vô trùng → 4. Hòa sinh khối vào đệm TEN (350ml), trộn đều → 5. Bổ sung SDS (5%), lắc đều, trộn kỹ và ủ 10 phút → 6. Chiết bằng phenol và Chloroform (3x) → Kết tủa bằng cồn → 7. Rửa sạch ADN bằng cồn 70% → 8. Làm khô chân không → 9. Kiểm tra chất lượng bằng phản ứng nhân bản gen 16S-ARNr.

2.3.2. Phương pháp PCR để xác định gen trong vi khuẩn

Sau khi tách được ADN vi khuẩn, công việc tiếp theo là phải nhân được gen cần phát hiện bằng phương pháp PCR và kiểm tra sản phẩm trên gel agarose. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR và nồng độ gel agarose là khác nhau đối với mỗi loại gen khác nhau.

Xác định các gen của *Bacillus anthracis*

Phản ứng PCR để xác định các gen *rrv*, *cap*, *pag* của vi khuẩn *Bacillus anthracis* được tiến hành ở điều kiện: 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ khuếch đại (94°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút) và kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR (3,5µl) được điện di trên gel agarose 2%.

Xác định các gen *pla* của *Yersinia pestis*

Phản ứng PCR để xác định các gen *pla* của *Yersinia pestis* được tiến hành ở điều kiện: 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ khuếch đại (95°C - 1 phút, 51°C - 1 phút, 72°C - 2 phút) và kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR (3,5µl) được điện di trên gel agarose 0,8%.

Xác định các gen của *Vibrio Cholerae*

Phản ứng PCR khuếch đại các gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza sử dụng Taq polymeraza được tiến hành với 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính sợi ADN khuôn ở 94°C trong 1 phút. Bước 2: mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trong ADN khuôn ở 52°C trong 1 phút. Bước 3: tổng

hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 20 giây. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Xác định gen *vipR* của *Salmonella typhi*

Chương trình PCR sử dụng Taq polymeraza được tiến hành với 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính sợi ADN khuôn ở 94°C trong 1 phút. Bước 2: mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trong ADN khuôn ở 54°C trong 1 phút. Bước 3: tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 40 giây. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

Xác định các gen của *Shigella*

i. Phản ứng nhân bản các phân đoạn gen mã hóa độc tố Shiga.

Chu trình nhiệt được tiến hành theo Tarr và cộng sự (2002): biến tính 10 phút ở 94°C, chạy 35 chu kỳ theo các bước: 92°C trong 40 giây, 60°C trong 1 phút và 72°C trong 2 phút. Sản phẩm phản ứng được kiểm tra bằng phương pháp điện di agarose 1,5%.

ii. Phản ứng nhân bản phân đoạn gen 16S-rADN

Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: Giai đoạn đầu, ADN được biến tính ở 95°C trong 1 phút 30 giây, tiếp tục biến tính ở 94°C trong 1 phút, kế tiếp mỗi được gắn ở nhiệt độ 52°C và phản ứng kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 20 giây. Giai đoạn chính được lặp lại 30 lần chu kỳ nhiệt cơ bản giống ở giai đoạn đầu, chỉ khác ở chỗ ADN được biến tính một lần ngay ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, tiếp sau pha cuối cùng phản ứng kéo dài chuỗi được duy trì ở 72°C trong 10 phút và sản phẩm được bảo quản ở 4°C. Kết quả phản ứng được kiểm tra bằng phương pháp điện di agarose 0,8%.

iii. Phản ứng nhân bản phân đoạn ORF3 của locus *psa*

Phân đoạn *ORF-3* được thu nhận bằng chu trình nhiệt theo Rafii *et al.* (1995) như sau: biến tính ADN 50 giây ở 94°C, sau đó phản ứng kéo dài 35 chu kỳ nhiệt với các bước 94°C trong 60 giây, 45°C trong 90 giây và 72°C trong 2 phút; ở chu kỳ cuối cùng bước 72°C kéo dài 10 phút. Sản phẩm phản ứng được kiểm tra bằng phương pháp điện di agarose 1,5%.

2.3.3. Phương pháp tạo Kit phát hiện các vi khuẩn gây bệnh

Sau khi kiểm tra các sản phẩm PCR, lựa chọn các gen đặc hiệu cho mỗi vi khuẩn đã được phát hiện. Tiến hành tạo Kit phát hiện dựa trên các thành phần và điều kiện cho phản ứng PCR đã tối ưu. Ngoài ra mỗi bộ Kit cần có thêm Kit âm tính và Kit dương tính làm đối chứng.

Kit phát hiện: Để phát hiện những vi khuẩn tương ứng với gen đặc hiệu.

Kit âm tính: Dùng nước vô trùng hoặc ADN của vi khuẩn khác loài.

Kit dương tính: Sử dụng ADN của vi khuẩn tương ứng.

2.3.4. Phương pháp xác định độ nhạy của Kit

Để xác định độ nhạy của Kit, ta sử dụng Kit với các độ pha loãng tế bào hay ADN của vi khuẩn tương ứng. Sau đó xác định nồng độ pha loãng nhỏ nhất mà vẫn có thể phát hiện được vi khuẩn.

2.3.5. Phương pháp thu mẫu vi khuẩn từ nước và không khí

Nguyên tắc của phương pháp là làm giàu lượng vi khuẩn cần phát hiện bằng hệ thống thu mẫu. Hệ thống thu mẫu gồm 2 bộ phận chính: Bơm chân không tạo ra sự chênh lệch áp suất trong và ngoài bình lọc, tạo áp lực để không khí (nước đi vào bình lọc), Màng lọc vi khuẩn ($\Phi 0,45\mu\text{m}$) làm ranh giới giữa trong và ngoài bình lọc dùng để thu vi khuẩn đi qua.

2.3.6. Một số phương pháp khác

Ngoài các phương pháp chủ yếu đã nêu, chúng tôi còn sử dụng một số phương pháp khác để hỗ trợ cho nghiên cứu bao gồm:

- Phương pháp thử đặc điểm sinh lí sinh hoá của vi khuẩn,
- Phương pháp tạo Kit huyết thanh miễn dịch,
- Phương pháp thử nghiệm Kit trong phòng thí nghiệm,
- Phương pháp tách dòng và đọc trình tự gen.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN từ vi khuẩn

3.1.1. Tách chiết ADN từ vi khuẩn *Yersinia pestis*

Tách chiết ADN tổng số

Toàn bộ ADN trong vi khuẩn bao gồm ADN của hệ gen và ADN của các loại plasmit gọi là *ADN tổng số* (total genomic ADN), được tách chiết bằng bộ hoá chất là DNeasy kit của Hãng Qiagen. Lấy 500 µl môi trường vi khuẩn bất hoạt, ly tâm thu cặn tế bào. Dung giải, tinh sạch và tách chiết ADN bằng các dung dịch của bộ kit theo hướng dẫn, cuối cùng thu ADN tổng số và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. ADN đã tách chiết được kiểm tra trên thạch agarosa 0.8%. Kết quả được biểu hiện ở Hình 9:



Hình 9: Ảnh điện di kiểm tra phản ứng tách ADN tổng số của *Y. pestis*

Tách chiết ADN plasmid

Nhằm thu ADN của plasmit pPCP1, một phương pháp khác được áp dụng là sử dụng bộ hoá chất QiaPrep Spin Mini Kit. Về nguyên tắc, hàm lượng thu được chỉ chứa *ADN của plasmit pPCP1* và như vậy sẽ làm khuôn chắc chắn cho phản ứng nhân đoạn gen *pla* trong hệ gen của plasmit này. ADN đã tách chiết được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng và được kiểm tra trên thạch agarosa 0.8%. Kết quả được trình bày ở Hình 10:



Hình 20: Ảnh điện di kiểm tra phản ứng tách ADN plasmid pPCP1 của *Y. pestis*

Như vậy ADN tổng số và ADN plasmid pPCP1 của *Y. pestis* đã được tách chiết với chất lượng tốt, là nguyên liệu chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn *Vibrio cholerae*

Từ hai chủng *Vibrio cholerae* Ogawa 395 và Inaba 389 chúng tôi tiến hành tách chiết ADN để làm khuôn cho phản ứng PCR. Quy trình tách chiết ADN tổng số được thực hiện như trong phần phương pháp nghiên cứu. Kết quả tách chiết được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả được thể hiện ở hình 11

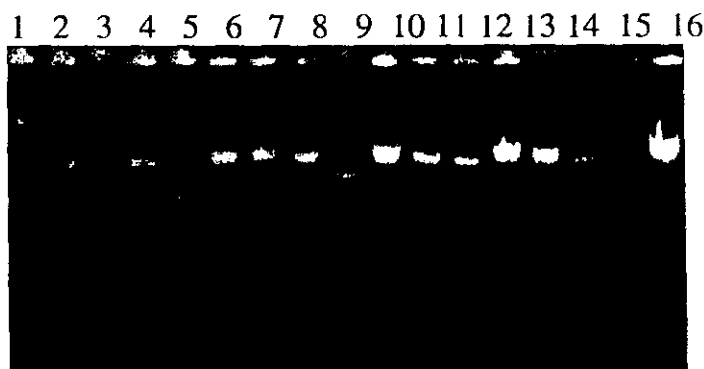


Hình 11: Kết quả tách chiết ADN tổng số từ *Vibrio cholerae* Ogawa 395 và Inaba 389. Đường chạy 1: ADN tổng số tách chiết từ *Vibrio cholerae* Ogawa 395. Đường chạy 2: ADN tổng số tách chiết từ *Vibrio cholerae* Inaba 389.

Kết quả trên cho thấy cả hai mẫu ADN tổng số được tách chiết từ *Vibrio cholerae* Ogawa 395 và Inaba 389 có một băng duy nhất, điều đó chứng tỏ quy trình tách chiết là hoàn toàn phù hợp.

3.1.3. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn *S. typhi*

Để nhân gen *virR* bằng PCR, trước hết chúng tôi tiến hành tách chiết ADN genom để làm sợi khuôn. Sau đó ADN genom được chạy kiểm tra trên



Hình 12: Phân tích ADN genom từ các chủng *S. typhi* trên gel agarosa 0.8%

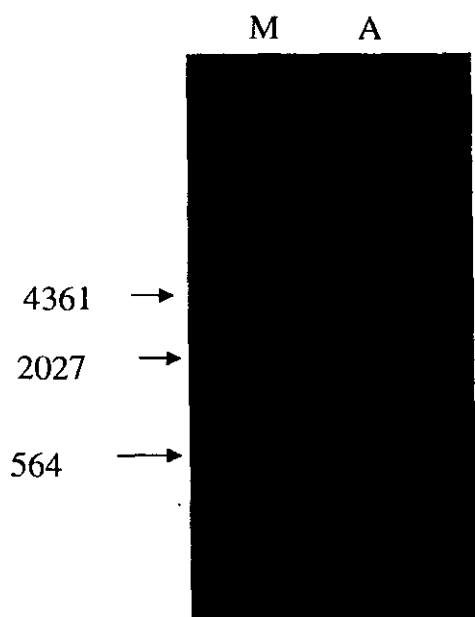
Đường chạy số 1-8, 10-17: ADN genom của các chủng *S. typhi* khác nhau

Đường chạy số 9: Thang ADN chuẩn (1 Kb)

gel agarose. Kết quả cho thấy ADN genom là băng sáng, không bị đứt gãy (Hình 12). ADN genom được pha loãng đến nồng độ khoảng 5ng/ μ l để làm sợi khuôn cho kỹ thuật PCR.

3.1.4. Tách chiết ADN vi khuẩn từ mẫu nước tự nhiên

Đến nay đã có nhiều tài liệu về phương pháp tách chiết ADN vi khuẩn từ mẫu bùn, nước tự nhiên và đất đã được công bố. Điều đó chứng tỏ rằng, việc tách chiết ADN vi khuẩn từ mẫu vật tự nhiên không đơn giản. Không loại trừ công việc này chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố bắt nguồn từ đặc trưng môi trường của mẫu. Với suy nghĩ như vậy, chúng tôi đã tiến hành thu nhận ADN vi khuẩn theo các phương của Yu-li Tsai và cộng sự, 1993; Kuske và cộng sự, 1998; Watanabe, K. và cộng sự, 1998. Đây là những phương pháp tách chiết ADN vi khuẩn từ nước thải, từ bùn và từ đất. Theo các phương pháp đã nêu, chúng tôi đều đã thu nhận được ADN thông qua quan trắc trên bản điện di nhuộm ethidium bromid và xác định phổ hấp thụ trên Quang phổ kế ở bước sóng 260 nm. Tuy vậy, khi tiến hành kiểm tra chất lượng sản phẩm ADN thu được thông qua phản ứng nhân bản gen 16S-ARNr, đã không thu nhận được kết quả, mặc dù sản phẩm ADN đã được tiến hành làm sạch nhiều lần khác nhau. Cuối cùng, sau nhiều lần điều chỉnh, cũng đã tiếp cận được mục tiêu (Hình 13).



Hình 13: Sản phẩm nhân bản phân đoạn gen 16S rARN.

M: chỉ thị độ lớn ADN (lamda (Hind III))

A: sản phẩm PCR phân đoạn gen 16S rARN.

B: ADN tự nhiên.

3.2. Xác định các gen đặc hiệu cho vi khuẩn bằng phương pháp PCR

3.2.1. Xác định các gen *virA*, *capA*, *pag* từ vi khuẩn *B. anthracis*

Để xác định các gen này chúng tôi đã sử dụng các chủng:

- Chủng *B. anthracis* độc 17JB, chủng *B. anthracis* nhược độc VCM-0012 và 34F làm đối chứng dương.
- Chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) làm đối chứng âm.
- Hai chủng phân lập TS1, TS2 phân lập từ bệnh nhân mắc bệnh than.

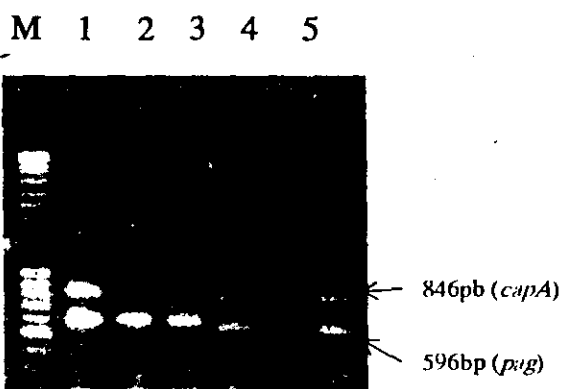
Kết quả như sau:

Khuyếch đại gen gây độc (*capA*) và gen mã hoá kháng nguyên bảo vệ (*pag*)

Phần lớn các gen của Ba nằm trên 2 plasmid lớn thể hiện tính gây độc. Plasmid lớn pXO1 có trọng lượng phân tử là 174kDa chứa các gen *lef*, *pag*, *cya* mã hoá cho các protein nhân tố gây chết - LF (lethal factor) trọng lượng 85 kDa, kháng nguyên bảo vệ

- PA (protective antigen) trọng lượng 83kDa và protein nhân tố gây phù thũng — EF (edema factor) trọng lượng 89kDa. Kháng nguyên bảo vệ PA được tổng hợp ra trong pXO1, bản thân kháng nguyên bảo vệ PA không có khả năng gây độc cho tế bào vật chủ, tuy nhiên vi khuẩn *B. anthracis* nếu muốn gây độc cho tế bào vật chủ thì lại không thể thiếu kháng nguyên PA này. Điều này được giải thích rằng kháng nguyên bảo vệ cần thiết cho việc mở đường cho 2 tác nhân gây độc khác là EF và LF. Trong máu, các enzym proteaza và bề mặt tế bào vật chủ sẽ hoạt hoá kháng nguyên bảo vệ bằng cách cắt PA thành 2 đoạn 20 kDa và 63 kDa. Đoạn 20 kDa sẽ tách ra nhường chỗ cho nhân tố EF hoặc LF liên kết.

Plasmid pXO2 nhỏ hơn chứa các gen *CapA*, *CapB*, và *CapC* những gen này mã hóa tổng hợp vỏ màng nhầy capsule polyD-glutamid acid. Độc tố phụ thuộc hình thành vỏ nhầy và kết hợp với protein mã hoá pXO1. Dựa vào đó chúng tôi đã thiết kế 2 cặp mồi để khuếch đại hai gen gây độc là PA và vỏ màng nhầy capsule (Hình 14):



Hình 14. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen kháng nguyên bảo vệ và vỏ màng nhày

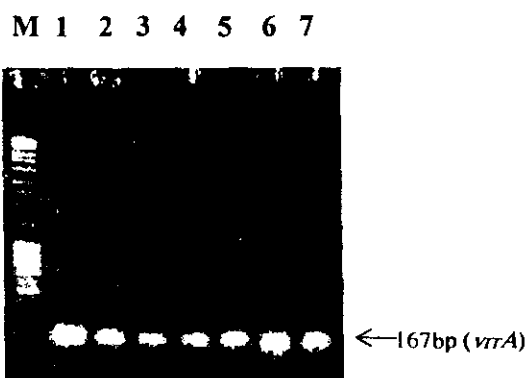
Kênh 1: Marker, các kênh 2, 3, 4, 5, 6 lần lượt là các chủng 17JB, VCM-0012, 34F2, TS1, Btk, TS2

Từ hình 13 ta thấy các chủng 17JB, VCM-0012, 34F, TS1, TS2 đều mang gen *pag* điều này chứng tỏ rằng chúng đều là *B. anthracis*. Chỉ có các chủng 17JB, TS1, TS2 là mang gen *capA* như vậy chúng là những chủng độc. Riêng chủng Btk không khuếch đại gen nào chứng tỏ các kết quả thu được là hoàn toàn phù hợp.

Như vậy ta có thể sử dụng gen *pag* để xác định *B. anthracis*.

Khuyếch đại vùng biến thể

Khuyếch đại vùng biến thể (VNTR) của gen *vrr*. Đây là gen mã hoá các protein giàu glutamic có trọng lượng phân tử là 30 kDa. Chúng bao gồm 3 đa hình khác nhau về bản sao của 12 bp, như vậy có thể dễ dàng phân biệt Ba và các loài liên quan thuộc chi *Bacillus* để chứng minh độ dài biến hình của các chủng chúng tôi đã sử dụng cặp mồi EWA1 và EWA2 được miêu tả bởi Anderson *et al.* kết quả được thể hiện ở Hình 15.



Hình 15. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *vrrA*

Kênh 1 - Marker, kênh 2 - Chủng 17JB, kênh 3 và 4 - Chủng VCM-0012, kênh 5 và 6 - Chủng 34F, kênh 6 - Chủng TS1, kênh 7- Chủng TS2.

Hình 15 cho thấy tất cả các chủng *B. anthracis* đều mang gen *vrrA*.

3.2.2. Xác định gen *pla* từ vi khuẩn *Y. pestis*

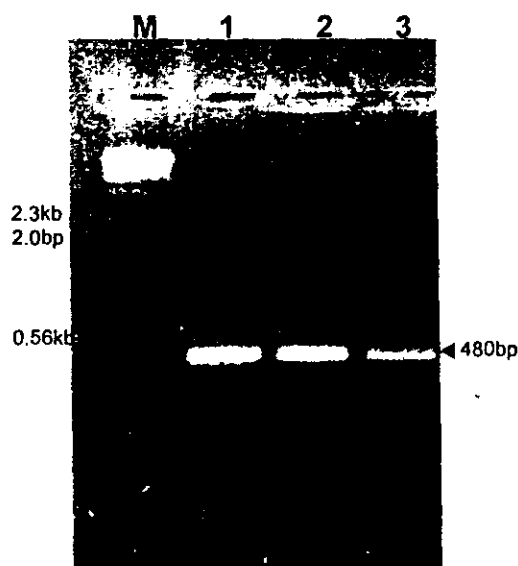
Có 3 nguồn cung cấp ADN làm khuôn cho phản ứng PCR:

- Nguồn **ADN tổng số** tách chiết bằng kit tách chiết ADN tổng số, bao gồm cả ADN của vi khuẩn và của plasmid pPCP1, hàm lượng cho một phản ứng PCR (dung tích 50 µl) là 50ng. Sản phẩm của phản ứng này được ký hiệu là YpPCR 248.

- Nguồn **ADN của plasmid pPCP1**, tách chiết bằng kit tách chiết plasmid, hàm lượng cho một phản ứng PCR (dung tích 50 µl) là 50ng. Sản phẩm của phản ứng này được ký hiệu là YpPCR 249.

- Vi khuẩn **nguyên vẹn tế bào**, tức là dùng toàn bộ vi khuẩn, khoảng 10^5 vi khuẩn sử dụng cho một phản ứng, và ADN tổng số (kể cả của plasmid) sẽ được giải phóng làm khuôn trong quá trình thực hiện phản ứng PCR.

Với mỗi xuôi là PLAF và mỗi ngược là PLAR, phản ứng PCR cho sản phẩm là đoạn ADN có độ dài 480bp nằm trong cấu trúc của gen *pla*. Sản phẩm của các phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên thạch agarosa 0,8% cho kết quả ở Hình 16:



Hình 16: Kết quả phản ứng PCR thu nhận sản phẩm đoạn gen *pla* từ vi khuẩn dịch hạch phân lập ở Việt Nam. Ghi chú: M: Chỉ thị ADN, ở đây dùng ADN của thực khuẩn thể Lambda cắt bằng enzym giới hạn *HindIII*. Sản phẩm PCR có độ dài 480 bp, sử dụng cặp mồi PLAF-PLAR, với các cách xử lý ADN làm khuôn khác nhau: số 1: từ ADN tổng số của vi khuẩn; số 2: từ ADN plasmid pPCP1 tách chiết từ vi khuẩn; số 3: từ vi khuẩn nguyên tế bào (không tách chiết ADN).

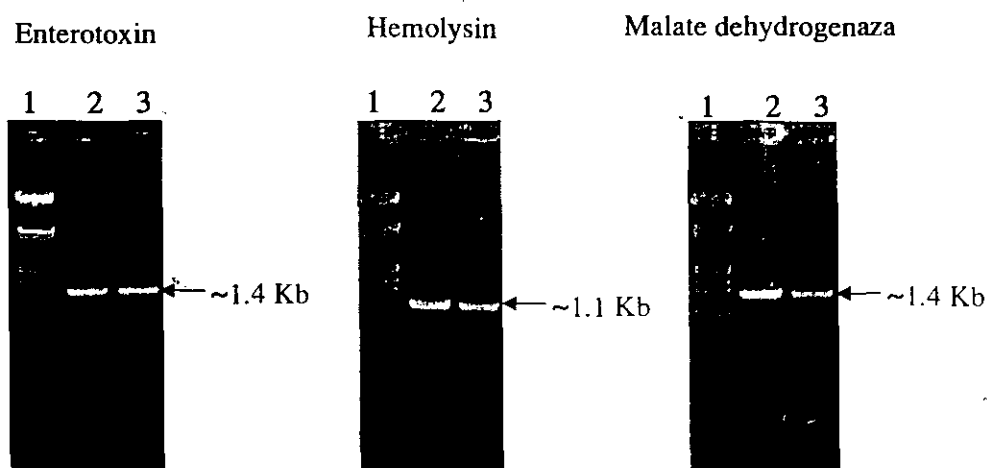
Với cặp mồi PLAF-PLAR, cả 3 loại nguồn ADN làm khuôn đều cho sản phẩm phản ứng PCR rất rõ nét, có độ dài khoảng 480bp (Hình 15). Như vậy, cho dù nguồn làm khuôn là ADN tổng số (có lẫn ADN của vi khuẩn chủ), hay ADN của plasmid đã được tách chiết riêng, hay là nguyên vẹn tế bào vi khuẩn không tách chiết ADN từ trước, với hàm lượng khoảng 50ng (nanogram) hoặc khoảng 10^5 vi khuẩn, phản ứng PCR vẫn được thực hiện một cách rất đặc hiệu cho sản phẩm hết sức đơn nhất và tinh khiết (Hình 16).

Như vậy ta có thể sử dụng gen *pla* để xác định vi khuẩn *Y. pestis*

3.2.3. Xác định các gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ *Vibrio Cholerae*

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ vi khuẩn *Vibrio Cholerae* Ogawa 395 và Inaba 389 đã được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Chúng tôi lấy 100ng ADN dùng làm khuôn để khuếch đại gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae*. Gen mã hoá Enterotoxin của vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu TOXM2, TOXP1, gen mã hoá Malate dehydrogenaza được khuếch đại với cặp mồi MALATP3, MALATM6, gen mã hoá Hemolysin được khuếch đại với cặp mồi HLYA1, HLYA2.

Quy trình tiến hành phản ứng PCR để khuếch đại gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ *Vibrio Cholerae* được thực hiện như phần phương pháp nghiên cứu. Theo lý thuyết sản phẩm PCR của gen mã hoá Enterotoxin có chiều dài khoảng 1300 cặp bazơ, gen mã hoá Hemolysin có chiều dài khoảng 1100 cặp bazơ và gen mã hoá Malate dehydrogenaza có chiều dài khoảng 1400 cặp bazơ. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, kết quả của phản ứng PCR được thể hiện trên hình 17.



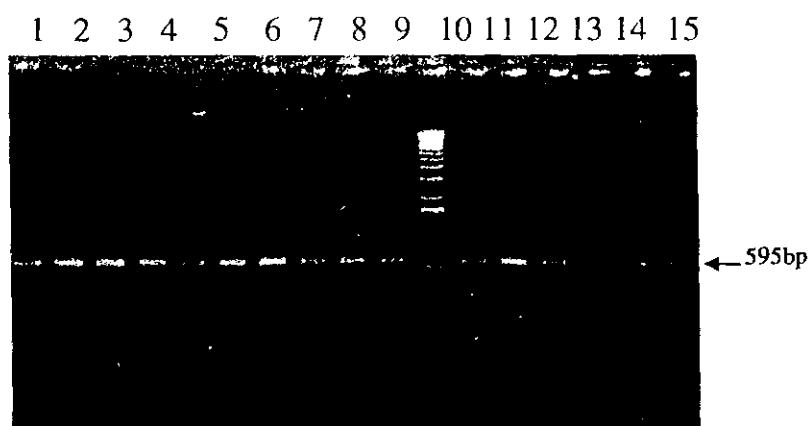
Hình 17: Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1%. Đường chạy 1: ADN chuẩn. Đường chạy 2: Sản phẩm PCR Ogawa 395. Đường chạy 3: Sản phẩm PCR Inaba 389 (Enterotoxin-gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin-gen mã hoá Hemolysin, Malate dehydrogenaza-gen mã hoá Malate dehydrogenaza).

Kết quả trên cho thấy cả ba gen Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae* Ogawa 395 và Inaba 389 đều được khuếch đại thành

công, cho một băng đặc hiệu và đúng với lý thuyết. Điều đó chứng tỏ chương trình khuếch đại gen mà chúng tôi chọn là hoàn toàn hợp lý về mặt kỹ thuật.

3.2.4. Xác định gen *vipR* từ vi khuẩn *S. typhi*

Sau khi có ADN genom từ các chủng *S. typhi*, chúng tôi tiến hành kỹ thuật PCR với quy trình tiến hành như đã miêu tả ở phần phương pháp. Kết quả PCR được miêu tả trên hình 18, 19 và bảng 4.



Hình 18: Phân tích sản phẩm PCR trên gel agarosa 0.8%
Đường chạy số 1-10, 12-17: Sản phẩm PCR nhân gen *vipR* từ các chủng *S. typhi* số 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
Đường chạy số 11: Thang ADN chuẩn 1kb

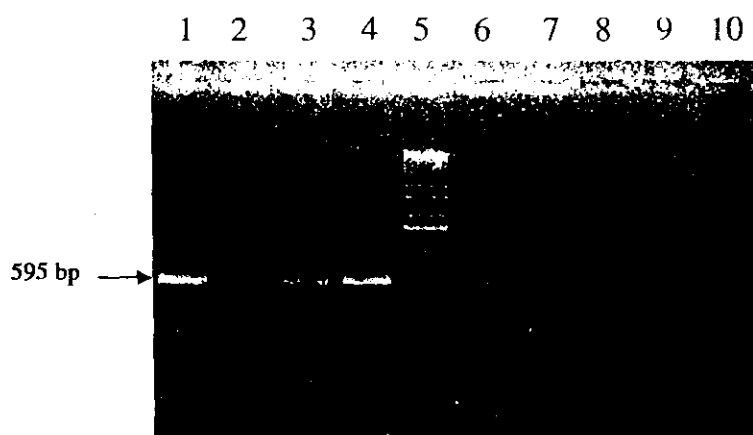
Bảng 4: Kết quả PCR nhân đoạn gen *vipR* có kích thước 595bp mã hoá cho kháng nguyên Vi

STT	Chủng vi khuẩn	Kết quả PCR	STT	Chủng vi khuẩn	Kết quả PCR
1	<i>S. typhi</i> 1	+	14	<i>S. typhi</i> 14	+
2	<i>S. typhi</i> 2	+	15	<i>S. typhi</i> 15	+
3	<i>S. typhi</i> 3	+	16	<i>S. typhi</i> 16	+
4	<i>S. typhi</i> 4	+	17	<i>S. typhi</i> 17	+
5	<i>S. typhi</i> 5	+	18	<i>S. typhi</i> 50	+
6	<i>S. typhi</i> 6	+	19	<i>S. typhi</i> 51	+
7	<i>S. typhi</i> 7	+	20	<i>S. typhi</i> 52	+
8	<i>S. typhi</i> 8	+	21	<i>S. enteritidis</i> 1	-

9	<i>S. typhi</i> 9	+	22	<i>S. enteritidis</i> 2	-
10	<i>S. typhi</i> 10	+	23	<i>S. enteritidis</i> 3	-
11	<i>S. typhi</i> 11	+	24	<i>S. typhimurium</i>	-
12	<i>S. typhi</i> 12	+	25	E. coli ATCC11105	-
13	<i>S. typhi</i> 13	+	26		

Chú thích: (+): Kết quả PCR dương tính. (-): Kết quả PCR âm tính

Hình 18, 19 cho thấy khi sử dụng kỹ thuật PCR dựa trên trình tự gen *vipR* thì chỉ có các chủng *S. typhi* mới cho kết quả dương tính, đó là bằng ADN của gen *vipR* có kích thước 595 bp đúng như dự đoán còn các chủng khác thậm chí trong cùng serovar của *Salmonella* như *S. enteritidis* và *S. typhimurium* đều cho kết quả âm tính.



Hình 19: Phân tích sản phẩm PCR gen *vipR* trên gel agarosa 0.8%

Đường chạy 1-4: Sản phẩm PCR nhân gen *vipR* từ các chủng *S. typhi* số 17, 50, 51, 52

Đường chạy số 5: Thang ADN chuẩn

Đường chạy số 6-8: Sản phẩm PCR nhân gen *vipR* từ các chủng *S. enteritidis* số 1, 2, 3

Đường chạy số 9-10: Sản phẩm PCR nhân gen *vipR* từ các chủng *S. typhimurium*, *E. coli* ATCC11105

Năm 1995, Hasimoto và cộng sự cũng đã thiết lập kỹ thuật PCR cho phép phát hiện *S. typhi* từ máu người bệnh dựa trên các vùng gen khác nhau trên vùng *ViaB* và thấy rằng chỉ có kỹ thuật PCR dựa trên vùng gen *vipR* là có tính đặc hiệu tốt hơn cả. Mặt khác, do trình tự gen *vipR* của chủng *S. typhi* và *S. paratyphi* C có độ tương đồng cao nên khi sử dụng đoạn mã nhân gen *vipR* từ genom *S. paratyphi* C thì cũng cho kết quả dương tính. Trên thực tế, *S. paratyphi* C cũng gây ra bệnh thương hàn nhưng tỷ lệ bệnh nhân thương hàn do *S. paratyphi* C thấp hơn rất nhiều lần so với *S. typhi* vì vậy việc phát hiện chúng cũng không có ảnh hưởng tới chẩn đoán bệnh.

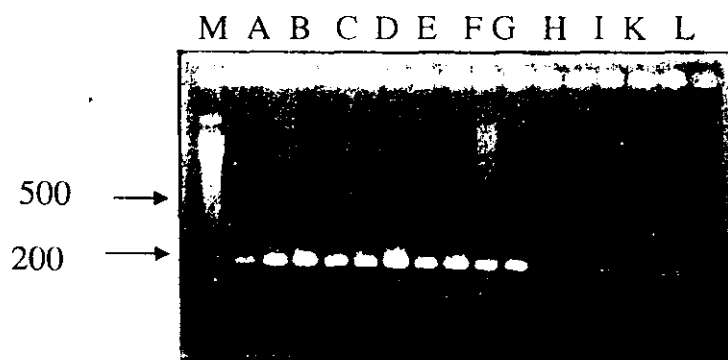
Vậy có thể sử dụng gen *vipR* để phát hiện vi khuẩn *S. typhi*

3.2.5. Xác định các gen từ vi khuẩn *Shigella*

Như ta biết, các nhóm vi khuẩn *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella* và *Vibrio* đều thuộc hệ vi khuẩn đường ruột và có thể phát tán trong môi trường nước tự nhiên hoặc không khí. Môi trường nước cũng là nơi tập hợp phong phú các quần thể vi khuẩn, chẳng hạn như *Aquaspirillum*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*. Theo các báo cáo khoa học, nhóm vi khuẩn *Azospirillum* có quan hệ di truyền rất gần với các nhóm *Aquaspirillum*, *Rhodospirillum*. Chính vì vậy, ngoài 8 chủng vi khuẩn đại diện cho 4 loài *Shigella*, các chủng *E. coli*, *S. enteritidis*, *V.*, *P. fluorescens* Ps7-1 và *Azospirillum* sp. DA10-2 đã được sử dụng để xác định tính đặc hiệu của các cặp môi để nhân bản các phân đoạn gen stxA.

i- Tính đặc hiệu của phân đoạn trung gian

Kết quả phản ứng nhân bản phân đoạn gen trung gian của gen stxA với ADN khuôn từ các chủng vi khuẩn khác nhau với cặp mồi mdh p9 và mdh p10 được thể hiện ở Hình 20. Theo đó, tất cả 8 chủng thuộc 4 loài *Shigella* khác nhau



Hình 20: Ảnh điện di sản phẩm PCR gen độc tố Shiga với 3 cặp mồi.

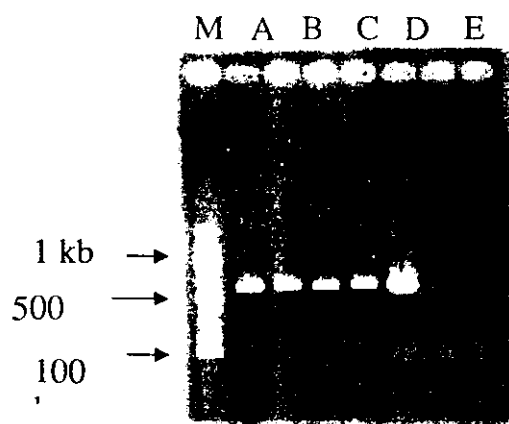
M : chỉ thị 100 base-pair ladder. A: *Shigella dysenteria*. B: *S. boydii*. C: *S. flexneri* F3a- 388. D: *S. flexneri* F2b-395. E: *S. flexneri* F2a-407. F: *S. sonnei* 384. G: *S. sonnei* 364. H: *S. sonnei* 367. I: *E. coli* EPEC. K: *E. coli* EHEC. L: *Vibrio inaba*. N: *Vibrio ogawa*. O: *Salmonella enteritidis*. P: *Salmonella typhimurium*. Q: *P. fluorescens* Ps7-1. R: *Azospirillum* sp DA10-2.

và tất cả 2 chủng *E. coli* EPEC, *E. coli* EHEC cũng như với các chủng *S. enteritidis*, *P. fluorescens* Ps7-1 và *Azospirillum* sp DA10-2 đã cho kết quả dương tính. Như đã trình bày ở trên, các loài *Shigella* và *E. coli* có quan hệ di truyền rất gần nhau, nên tín hiệu dương tính trong trường hợp này có thể được coi là bình thường. Điều đáng chú ý, đó là có thể tồn tại các đoạn tương đồng ở các chủng vi khuẩn thuộc các Chi có quan hệ di

truyền xa với nhóm vi khuẩn *Shigella*. Nói cách khác, cặp môi mdh p9 và mdh p10 không đặc hiệu cho việc xác định vi khuẩn nhóm *Shigella*.

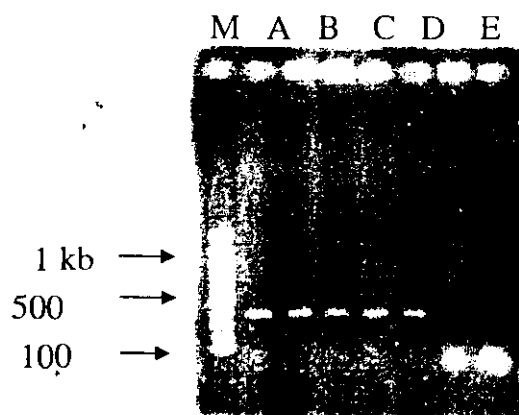
ii- Tính đặc hiệu của các phân đoạn gen stx1A và stx2A

Phản ứng nhân bản các phân đoạn của các gen stx1A và stx2A của ADN khuôn từ đại diện các nhóm *Shigella* và từ các chủng đại diện có quan hệ di truyền gần hoặc xa với vi khuẩn *Shigella*, với các cặp môi 1A.251F, 1A.832R và 2A.506F, 2A.848R đã được thực hiện. Kết quả được thể hiện ở Hình 20 và Hình 21. Ở đây các phân đoạn gen stx1A và stx2A chỉ được tổng hợp với ADN



Hình 21: Ảnh điện di sản phẩm PCR gen độc tố Shiga với cặp môi 1A.

M: chỉ thị 100 base-pair ladder. A: *Shigella dysenteriae*. B: *S. boydii*. C: *S. flexneri* F3a- 388. D: *S. sonnei* 384. E: *E. coli* EHEC. F: *Vibrio inaba*. G: *Salmonella enteritidis*.



Hình 22: Xác định tính đặc hiệu của cặp môi 2A.

M: marker. A: *Shigella dysenteriae*. B: *S. boydii*. C: *S. flexneri* F3a- 388. D: *S. sonnei* 384. E: *E. coli* EHEC. F: *Vibrio inaba*. G: *Salmonella enteritidis*.

khuôn từ các chủng vi khuẩn nhóm *Shigella* và *E. coli*, không có ở các chủng *P. fluorescens* Ps7-1 và *Azospirillum* sp. DA10-2. Với kết quả như vậy, có thể nói rằng, các cặp mỗi 1A.251F và 1A.832R hoặc 2A.506F và 2A.506R thể hiện tính đặc hiệu cao hơn so với cặp mỗi của đoạn gen trung gian, bởi nó không cho kết quả dương tính đối với mẫu có họ hàng xa, nhưng vẫn cho kết quả dương tính với chủng *E. coli* EHEC. Để khẳng định điều này, các cặp mỗi 1A.251F và 1A.832R hoặc 2A.506F và 2A.506R đã được lai với các trình tự nucleotit có trong GenBank và kết quả cho thấy, trình tự của các cặp mỗi này lai với hơn 100 trình tự nucleotit từ các chủng vi khuẩn *E. coli* khác nhau.

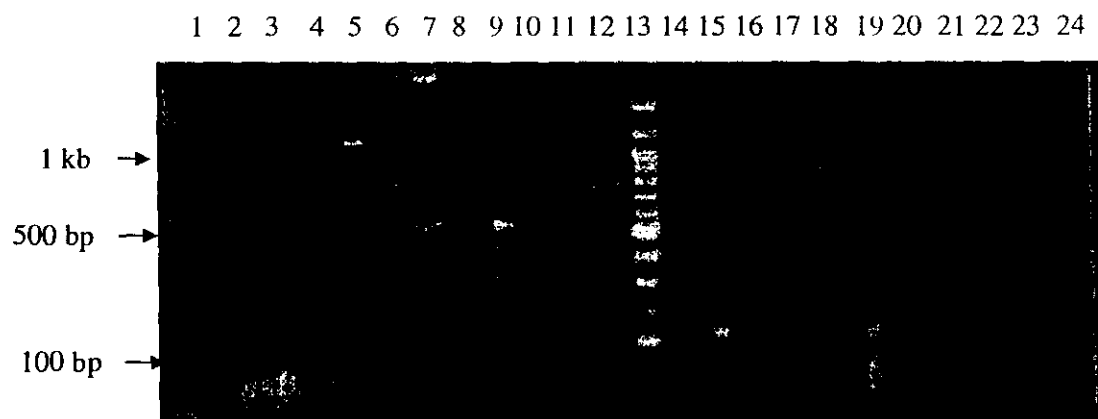
iii-Tính đặc hiệu chỉ thị của phân đoạn ORF3

Như đã được trình bày ở trên tính đặc hiệu chỉ thị của đoạn gen *stx1A* và *stx2A* không cao, nên việc tìm kiếm một phân tử chỉ thị đặc trưng cho nhóm vi khuẩn *Shigella* đã được đặt ra. Theo Rafii và cộng sự, phân đoạn gen ORF3 của locus *spa* đặc hiệu cho các loài *Shigella* mà các loài khác không có, kể cả *E. coli*.

Kết quả phản ứng nhân bản phân đoạn *ORF3* của locus *spa* với khuôn là ADN tổng số từ 6 chủng *Shigella*, 20 chủng *E. coli*, 2 chủng *Salmonella*, 2 chủng *Vibrio*, 1 chủng *Azospirillum* và 1 chủng *Pseudomonas* đã được thu nhận (Hình 8a và 8b). Trước hết kết quả này cho thấy, ở tất cả 6 chủng thuộc 4 loài *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* và *S. sonnei* đều hiện diện phân đoạn với độ lớn khoảng 118 bp. Trong tổng số 20 chủng *E. coli* được phân tích chỉ cho một tín hiệu phản ứng dương tính với ADN khuôn từ chủng *E. coli* EPEC (Hình 23, giếng số 20). Ở 4 chủng vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn đường ruột *Salmonella* và *Vibrio* cũng như ở 2 chủng vi khuẩn *Azospirillum* và *Pseudomonas* sản phẩm phản ứng nhân bản phân đoạn ADN với độ lớn khoảng 118 bp không tồn tại. Một kết quả tương tự như vậy cũng đã được công bố (Rafii *et al.*, 1995), tuy số cá thể chủng của một loài được xác định ít hơn, nhưng số loài thuộc nhóm vi khuẩn đường ruột lớn hơn, cụ thể bao gồm các loài *Escherichia hermannii*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Serratia odorifera*, *S. liquefaciens*. Kết quả của nhóm tác giả này cũng cho thấy, sử dụng sản phẩm nhân bản gen với độ lớn 118 bp làm mẫu lai cho tín hiệu lai dương tính với ADN từ các chủng *Shigella*.

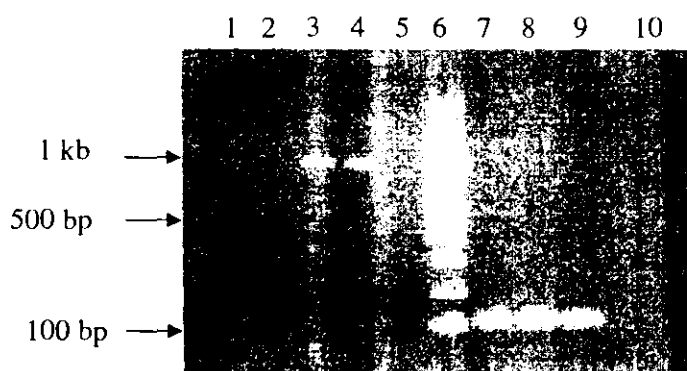
Kết quả phản ứng nhân bản phân đoạn *ORF-3* với cặp mỗi *ORF-3F* và *ORF-3R* cũng cho thấy sự hiện diện một số sản phẩm khác không đặc hiệu và các phân đoạn này đều có kích thước từ 300 — 1200 bp, lớn hơn đoạn *ORF-3* của locus *spa*. Các sản

phẩm phụ của phản ứng nhân bản gen này đa số xuất hiện ở các chủng vi khuẩn *E. coli*, và có thể cho tới 4 sản phẩm không đặc hiệu như ở chủng *E. coli* 7; đối với vi khuẩn *Shigella* chỉ tồn tại một sản phẩm phụ ở chủng *S. sonnei* 348 với kích thước khoảng 1000 bp. Sự hiện diện sản phẩm phản ứng nhân bản gen sử dụng cặp mồi *ORF-3f* và *ORF-3r* với kích thước khoảng 500 bp ở một chủng *S. flexneri* cũng đã được Rafii và cộng sự (1995) đề cập tới, và theo tác giả sở dĩ phản ứng cho sản phẩm phụ có thể là do chịu ảnh hưởng bởi sự thay đổi điều kiện của hỗn hợp phản ứng.



Hình 23: Điện di sản phẩm PCR của đoạn gen *ORF-3*.

Giếng 1-12: tương ứng với *E. coli* 1-12; 13: marker 100 bp; 14: *Pseudomonas* Ps7-1; 15: *Shigella boydii* 342; 16: *E. coli* EHEC; 17: *E. coli* ETEC; 18: *Shigella sonnei* 348; 19: *Shigella sonnei* 364; 20: *E. coli* EPEC; 21: *Vibrio inaba*; 22: *Vibrio ogawa*; 23: *Salmonella enteritidis*; 24: *Salmonella typhimurium*.



Hình 24: Điện di sản phẩm PCR của đoạn gen *ORF-3*.

1: *E. coli* DH5 α ; 2: *E. coli* JM101; 3: *E. coli* JM109; 4: *E. coli* XL1 Blue; 5: *E. coli* HB101; 6: marker 100 bp; 7: *Shigella dysenteriae*; 8: *Shigella flexneri* F3a-388; 9: *Shigella flexneri* F2b-395; 10: *Azospirillum* Az-10.

Theo Rafii và cộng sự (1995), cặp môi *ORF-3f* và *ORF-3r* đặc hiệu chỉ, chỉ thị cho tất cả các loài *Shigella*. Việc kiểm tra tính đặc hiệu của cặp môi *ORF-3f* và *ORF-3r* bằng cách thực hiện lai trình tự của cặp môi này với trình tự các gen vi khuẩn được lưu giữ ở ngân hàng gen cũng cho thấy tính đặc hiệu cao của cặp môi này do chúng chỉ tương đồng với ADN từ các chủng thuộc các loài *Shigella*, không tương đồng với ADN từ các chủng vi khuẩn *E. coli* đã được công bố. Sự hiện diện phân đoạn với độ lớn tương đương phân đoạn *ORF-3* ở chủng *E. coli* EPEC (Hình 20, giếng số 20) có thể là do trước đó trình tự của chủng này chưa được đăng ký ở ngân hàng gen. *E. coli* EPEC là vi khuẩn gây bệnh đường ruột, chính vì vậy, việc phát hiện được nhóm vi khuẩn này có trong thực phẩm và các nguồn nước cũng sẽ giúp loại trừ nguy cơ gây bệnh cho con người.

Như vậy, so với trường hợp sử dụng gen mã hóa độc tố Shiga làm phân tử chỉ thị thì tính đặc hiệu của *ORF-3* cao hơn hẳn. Có thể sử dụng gen *ORF-3* xác định *Shigella*.

3.3. Xây dựng quy trình chế tạo và sử dụng Kit phát hiện vi khuẩn

Qua các kết quả nghiên cứu ở trên ta có thể khẳng định rằng:

- Gen *pag* mã hoá kháng nguyên bảo vệ và gen *rrvA* là đặc hiệu cho vi khuẩn *B. anthracis*.
- Gen *pla* sản xuất sản phẩm hoạt hoá plasminogen là đặc hiệu với vi khuẩn *Y. Pestis*.
- Các gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza là đặc hiệu với *Vibrio Cholerae*.
- Gen *vipR* đặc hiệu với vi khuẩn *S. typhi*.
- Gen *ORF-3* của locus *spa* là đặc hiệu cho *Shigella*

Dựa vào các đặc tính này ta có thể xây dựng quy trình chế tạo và sử dụng Kit phát hiện mỗi loại vi khuẩn như sau.

3.3.1. Quy trình chế tạo Kit

- Tổng hợp các cặp môi đặc hiệu cho mỗi loại Kit gồm:

- Cặp môi PA5-PA8 để nhân gen *pag*, EWA1-EWA2 để nhân gen *rrvA* dùng cho Kit phát hiện *Bacillus anthracis*.
- Cặp môi PLAF - PLAR để nhân gen *pla* dùng cho Kit phát hiện *Yersinia pestis*

- Cặp mồi TOXP1 - TOXM2 để nhân gen mã hoá Enterotoxin dùng cho Kit phát hiện *Vibrio cholerae*
- Cặp mồi *vipRf* - *vipRr* để nhân gen *vipR* dùng cho Kit phát hiện *Salmonella typhi*
- Cặp mồi *ORF-3f* - *ORF-3r* để nhân gen *ORF-3* của locus *spa* dùng cho Kit phát hiện *Shigella* spp.

Trình tự các cặp mồi và kích thước gen tương ứng được nêu trong phần vật liệu và phương pháp (Bảng 4).

- Tổng hợp các thành phần khác cho phản ứng PCR gồm: H₂O khử ion vô trùng, Đệm 10 lần cho Taq ADN polymeraza, MgCl₂, dNTP, Taq ADN polymeraza.
- ADN của các vi khuẩn tương ứng dùng làm đối chứng dương, nước dùng làm đối chứng âm.
- Tất cả thành phần của các bộ Kit được bảo quản ở -4°C cho tới khi sử dụng.

3.3.2. Quy trình sử dụng các bộ Kit

Đối với mỗi loại vi khuẩn khác nhau cần phát hiện thì các thành phần trong bộ Kit và cách sử dụng là khác nhau.

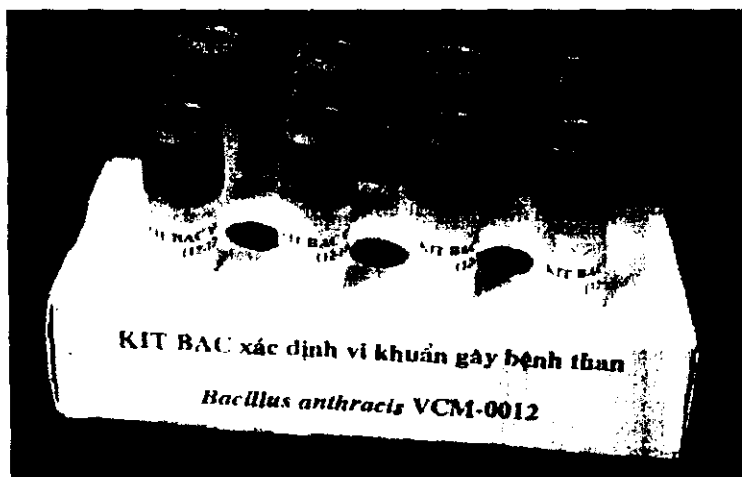
Quy trình sử dụng BacKit để phát hiện *Bacillus anthracis*

Thành phần Kit:

H ₂ O khử ion vô trùng	11,5 µl
Đệm 10X cho Taq ADN polymeraza	2 µl
dNTP 2 mM	2 µl
Môi PA5	1 µl
Môi PA8	1 µl
ADN hệ gen	2 µl
Taq ADN polymeraza (5 U/µl)	0,5 µl

Chương trình PCR: 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ khuếch đại (94°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút) và kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR

(3,5µl) được điện di trên gel agarose 2%, sản phẩm có kích thước 596bp (với cặp mồi PA5-PA8) hoặc 167bp (với cặp mồi EWA1-EWA2).



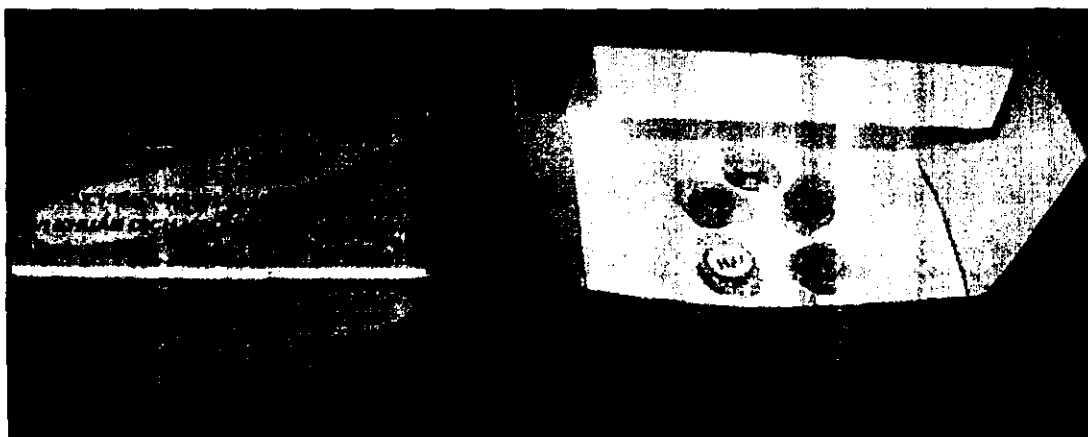
Hình 25. BacKit xác định vi khuẩn *B. anthracis* gây bệnh than

Quy trình sử dụng YerKit để phát hiện *Yersinia pestis*

Thành phần

Thành phần	Kit phát hiện	Kit dương tính	Kit âm tính
Khuôn	ADN tách từ mẫu cần phát hiện 2µl	ADN của YP (Khuôn được cung cấp trong bộ KIT) 2 µl	Nước tinh khiết (không cung cấp khuôn ADN) 2 µl
Hỗn hợp mồi PLAF - PLAR	6 µl	6 µl	6 µl
Đệm PCR	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Nước	vừa đủ	vừa đủ	vừa đủ
Tổng thể tích	25 µl	25 µl	25 µl

Chu trình nhiệt: Một chu kỳ ở 94 °C trong 10 phút; sau đó 35 chu kỳ với 3 bước, cụ thể: 94 °C trong 2 phút; 51 °C trong 2 phút; 72 °C trong 3 phút; kết thúc bằng 1 chu kỳ ở 72 °C trong 10 phút, rồi làm lạnh xuống 4°C cho đến khi kiểm tra sản phẩm. Sản phẩm điện di trên gel agarose 0,8% có kích thước 480bp.



Hình 26: Bộ KIT chẩn đoán phân tử vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis*

Quy trình sử dụng VibKit để phát hiện *Vibrio cholerae*

Thành phần Kit:

H ₂ O khử ion vô trùng	16,2 µl
Đệm 10X cho Taq ADN polymeraza	2,5 µl
dNTP 2 mM	2 µl
Môi TOXP1	1 µl
Môi TOXM2	1 µl
ADN hệ gen	2 µl
Taq ADN polymeraza (5 U/µl)	0,3 µl

Phản ứng PCR khuếch đại các gen mã hoá Enterotoxin được tiến hành với 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính sợi ADN khuôn ở 94°C trong 1 phút. Bước 2: mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trong ADN khuôn ở 52°C trong 1 phút. Bước 3: tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 20 giây. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, sản phẩm có kích thước 1300bp.

Quy trình sử dụng SalKit để phát hiện *Salmonella typhi*

Thành phần Kit:

H ₂ O khử ion vô trùng	9,85 µl
Đệm 10 lần cho Taq ADN polymeraza	2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 µl

dNTP 2 mM	2,5 µl
Môi VifRf, 4 µM	1 µl
Môi VifRr, 4 µM	1 µl
ADN hệ gen (5 ng/µl)	2 µl
Taq ADN polymeraza (5 U/µl)	0,15 µl

Chương trình PCR được tiến hành với 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính sợi ADN khuôn ở 94°C trong 1 phút. Bước 2: mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trong ADN khuôn ở 54°C trong 1 phút. Bước 3: tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 40 giây. Sản phẩm điện di trên gel agarose 0,8% có kích thước 595bp.

Quy trình sử dụng ShiKit để phát hiện *Shigella* spp.

Thành phần Kit:

H ₂ O khử ion vô trùng	10 µl
Đệm 10X cho Taq ADN polymeraza	2,5 µl
dNTP 2 mM	2 µl
Môi <i>ORF-3f</i>	1 µl
Môi <i>ORF-3r</i>	1 µl
ADN hệ gen	3 µl
Taq ADN polymeraza (5 U/µl)	0,5 µl

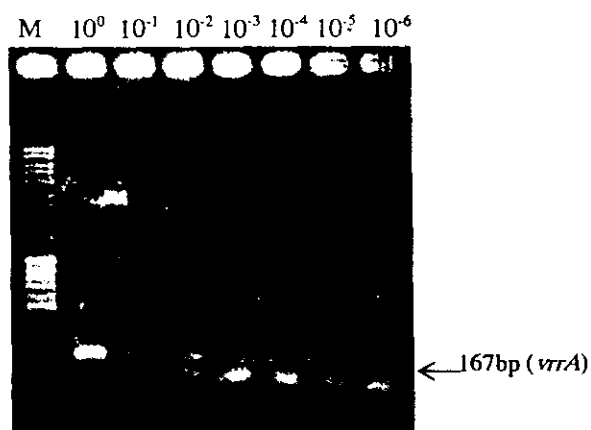
Chương trình PCR: Biến tính ADN 50 giây ở 94°C, sau đó phản ứng kéo dài 35 chu kỳ nhiệt với các bước 94°C trong 60 giây, 45°C trong 90 giây và 72°C trong 2 phút; ở chu kỳ cuối cùng bước 72°C kéo dài 10 phút. Sản phẩm phản ứng được kiểm tra bằng phương pháp điện di agarose 1,5%, có kích thước 118bp.

3.4. Đánh giá độ nhạy của các bộ Kit

3.4.1. Đánh giá độ nhạy của BacKit (Kit phát hiện *Bacillus anthracis*)

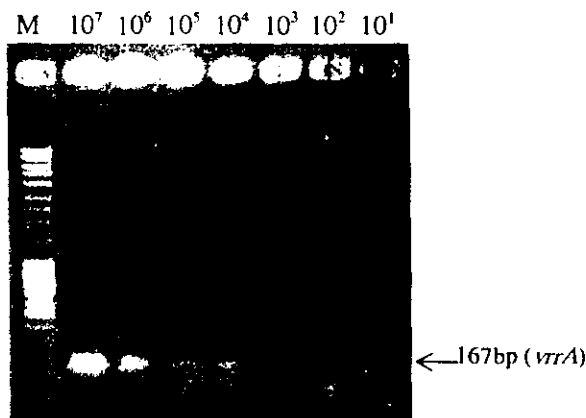
Để đánh giá độ nhạy của phương pháp chẩn đoán, chúng tôi sử dụng chủng nhược độc 34F với cặp môi EWA1-EWA2 để kiểm tra khả năng phát hiện đoạn gen *vrrA*. Việc đánh giá được tiến hành theo hai cách.

- Dịch nuôi chủng 34F qua đêm trong môi trường MPB được xác mật độ tế bào là 10^7 tế bào/ml, li tâm 5000vòng/phút trong 5 phút, rửa ba lần bằng nước khử ion, thu cặn bổ sung 50 μ l nước khử ion, đun sôi 10 phút, li tâm 10000vòng/phút trong 1 phút, thu dịch nổi. Dịch nổi được pha loãng lần lượt theo hệ số 10 với các nồng độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , sử dụng các nồng độ này làm khuôn cho phản PCR, kết quả thể hiện trên hình 27.



Hình 27. Điện di đồ các sản phẩm PCR khuếch đại gen *vrrA* với các khuôn ADN pha loãng ở nồng độ khác nhau

Qua hình 27 có thể nhận thấy ở nồng độ pha loãng ADN 10^{-5} tương ứng với nồng độ ADN là 1pg vẫn có thể xác định được vi khuẩn *B. anthracis* bằng bộ Kit đã chế tạo. Cũng với dịch nuôi này tiến hành pha loãng tế bào theo các nồng độ như trên và tiến hành thu ADN và chạy PCR theo phương pháp đã nêu. Kết quả thể hiện trên hình 28.



Hình 28. Điện di đồ các sản phẩm PCR khuếch đại gen *vrrA* với các khuôn ADN từ các nồng độ pha loãng tế bào khác nhau

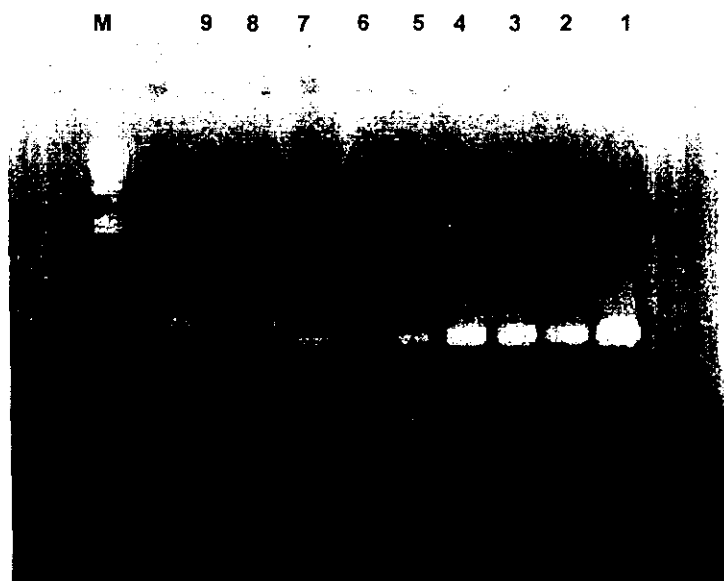
Bằng phương pháp pha loãng tế bào sau đó mới thu ADN ta có thể phát hiện được vi khuẩn *B. anthracis* với lượng tế bào là 1000.

3.4.2. Đánh giá độ nhạy của YerKit

Chúng tôi đã thực hiện thành công phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi PLAF-PLAR, nhân một đoạn gen *pla* có độ dài 480 bp; với độ pha loãng cao nhất của khuôn như sau:

- + khuôn ADN tổng số là 0,6 ng, tương đương với 1 vi khuẩn *Y. pestis*.
- + khuôn ADN plasmid pPCP1 là 0,2 ng;
- + khuôn vi khuẩn nguyên vẹn (không cần tách ADN tổng số), với lượng vi khuẩn là 10^1 .

Như vậy, PCR đặc hiệu vẫn thực hiện thành công ở độ pha loãng 160.000 lần, tương đương với hàm lượng khuôn ADN tổng số là 0,2 ng/phản ứng, phản ứng PCR vẫn thực hiện thành công (Hình 29).



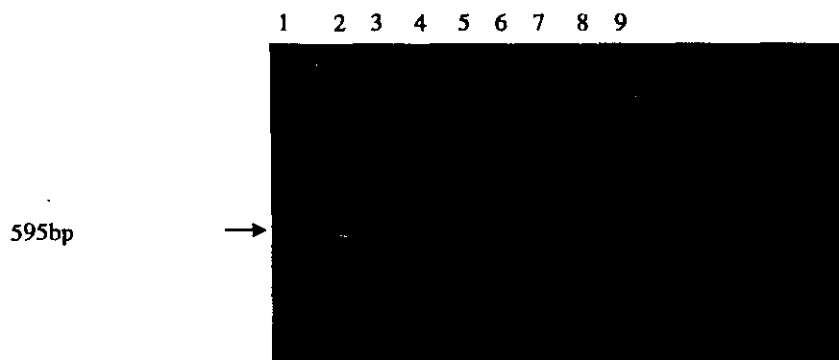
Hình 29: Kết quả phản ứng PCR thu nhận sản phẩm đoạn gen *pla* từ khuôn là ADN tổng số đã pha loãng. Ghi chú: M: Chỉ thị ADN, ở đây dùng ADN của thực khuẩn thể Lambda cắt bằng enzym giới hạn *Hind*III. Sản phẩm PCR có độ dài 480 bp, sử dụng cặp mồi PLAF-PLAR. Đường chạy 1-9: sản phẩm PCR, với khuôn pha loãng gấp đôi từ số 1 (100ng); đến đường số 9 (0,1953125 ng) vẫn có sản phẩm PCR dương tính (mũi tên chỉ dẫn).

3.4.3. Đánh giá độ nhạy của VibKit

Cũng bằng phương pháp pha loãng tế bào của dịch nuôi vi khuẩn *Vibrio cholerae* trong môi trường LB qua đêm theo cơ số 10. Sau đó tiến hành thu ADN ở mỗi nồng độ pha loãng và sử dụng ADN làm khuôn để chạy PCR với VibKit. Kết quả cho thấy độ nhạy của VibKit đạt ở ngưỡng 1000 tế bào.

3.4.4. Đánh giá độ nhạy của SalKit

Mặt khác, để đánh giá độ nhạy của phương pháp chẩn đoán, ADN genom của *S. typhi* được pha loãng theo cơ số 10 và tiến hành kiểm tra khả năng phát hiện đoạn gen *VipR* bằng kỹ thuật PCR. Từ nồng độ ADN genom pha loãng, có thể tính được số vi khuẩn cần thiết để phát hiện được bằng kỹ thuật PCR. Kết quả được kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 30).



Hình 30: Phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%

Đường chạy 1-8: Sản phẩm PCR của gen *VipR* từ genom pha loãng 10^{-2} - 10^{-9} . Đường chạy 9: Thang ADN chuẩn 1Kb

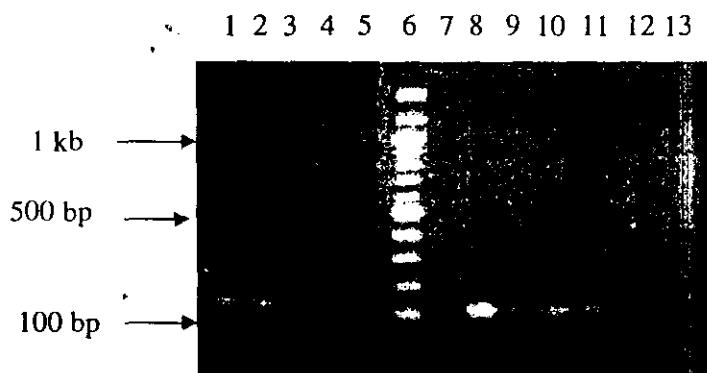
Kết quả trên hình 30 cho thấy, tại đường chạy thứ 5-tương đương với nồng độ ADN genom pha loãng tới 10^{-6} , vẫn có thể phát hiện được bằng ADN kích thước khoảng 0,6kb. Theo tính toán, khi ADN genom pha loãng tới 10^{-6} tương đương với nồng độ ADN là 0,07pg/ μ l hoặc khoảng 7-10 vi khuẩn. Ngưỡng phát hiện này đã khẳng định độ nhạy của phương pháp phát hiện là khá cao, đáp ứng yêu cầu phát hiện vi khuẩn *S. typhi* trong các mẫu nước và không khí.

3.4.5. Đánh giá độ nhạy của ShiKit

Sau khi nồng độ ADN được xác định bằng quang phổ hấp thụ vùng tử ngoại, dãy dung dịch với các nồng độ 440; 70; 3,5; 1,75; 0,90 và 0,70 ng ADN/ μ l đã được điều chế. Tổng thể tích phản ứng là 25 μ l và có chứa 1 μ l ADN khuôn. Kết quả phản

ứng nhân bản phân đoạn *ORF-3* với các nồng độ khuôn khác nhau hoặc với hỗn hợp ADN vi khuẩn từ mẫu nước tự nhiên được trình bày ở hình 30. Trong trường hợp khuôn là ADN thuần từ *Shigella*, sản phẩm phản ứng không đủ để biểu hiện ở hàm lượng 0,9 ng và 0,7 ng/phản ứng. Trong trường hợp hỗn hợp dung dịch phản ứng chứa ADN vi khuẩn được tách chiết từ nước kênh lạch với hàm lượng 70 ng ADN sản phẩm, phản ứng nhân bản phân đoạn *ORF-3* cũng chỉ được quan sát ở hàm lượng từ 1,75 ng ADN *Shigella* trở lên. Ở hàm lượng 70 ng ADN khuôn, cường độ biểu hiện của sản phẩm mạnh nhất. Kết quả điện di cũng cho thấy, với ADN vi khuẩn từ mẫu nước tự nhiên làm khuôn, phản ứng không cho bất cứ một sản phẩm nhân bản nào.

Độ nhạy của phương pháp thông qua sự biểu hiện của sản phẩm nhân bản phân đoạn *ORF-3* đã được Rafii và cộng sự (1995) đề cập tới. Theo nhóm tác giả này, ở mẫu nước rửa rau xà lách với mật độ $1,5 \times 10^4$ tế bào vi khuẩn *Shigella*/ml, sản phẩm phản ứng không đủ biểu hiện trên bản điện di agarose; sản phẩm *ORF-3* chỉ quan sát được bắt đầu ở mật độ $1,5 \times 10^5$ tế bào/ml. Theo lý thuyết, số tế bào trong ml này sẽ cho khoảng 0,7 - 0,9 ng ADN tổng số; đây cũng là hàm lượng ADN khuôn thường được sử dụng trong phản ứng nhân bản gen với 30 chu kỳ tổng hợp.



Hình 31: Điện di sản phẩm PCR đoạn gen *ORF-3* với ADN khuôn hỗn hợp.

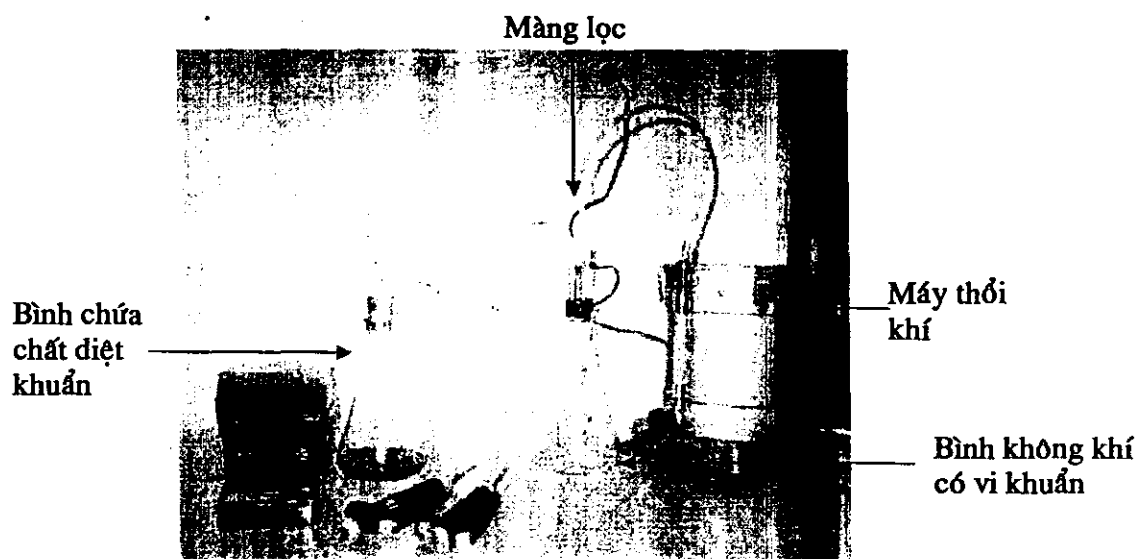
Giếng 1-5: ADN khuôn chủng *S. flexneri* F2b-395 với nồng độ lần lượt là 440; 3,5; 1,75; 0,9; 0,7 ng/μl; 6: marker 100 bp; giếng 7-13: ADN tự nhiên 70 ng/μl và ADN *S. flexneri* F2b-395 có nồng độ lần lượt là 0; 70; 7; 3,5; 1,75; 0,9; 0,7 ng/μl.

3.5. Chế tạo các thiết bị thu mẫu vi khuẩn từ mẫu nước và không khí và xây dựng quy trình phát hiện chúng

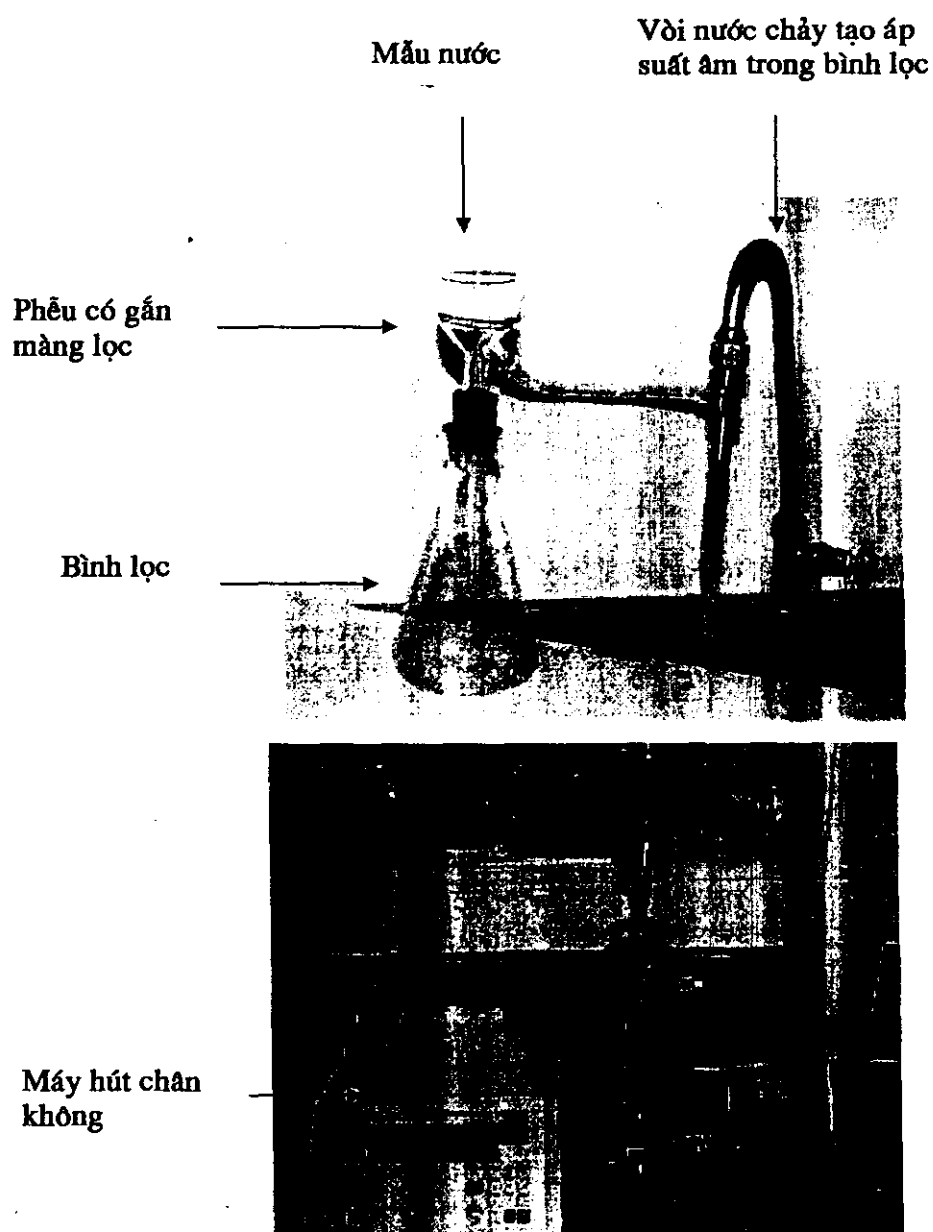
3.5.1. Chế tạo các thiết bị thu vi khuẩn

Mục tiêu của thiết bị là làm giàu lượng vi khuẩn cần phát hiện trong môi trường không khí và nước. Hệ thống thu mẫu gồm 2 bộ phận chính: Bơm chân không tạo ra sự chênh

lệch áp suất trong và ngoài bình lọc, tạo áp lực để không khí (nước đi vào bình lọc),
Màng lọc vi khuẩn ($\Phi 0,45\mu\text{m}$) làm ranh giới giữa trong và ngoài bình lọc dùng để thu
vi khuẩn đi qua. Sau quá trình nghiên cứu và thiết kế chúng tôi đã chế tạo được 2 bộ
dụng cụ để thu mẫu vi khuẩn từ nước và một bộ thu mẫu vi khuẩn từ không khí. Minh
họa trên hình 31, 32.



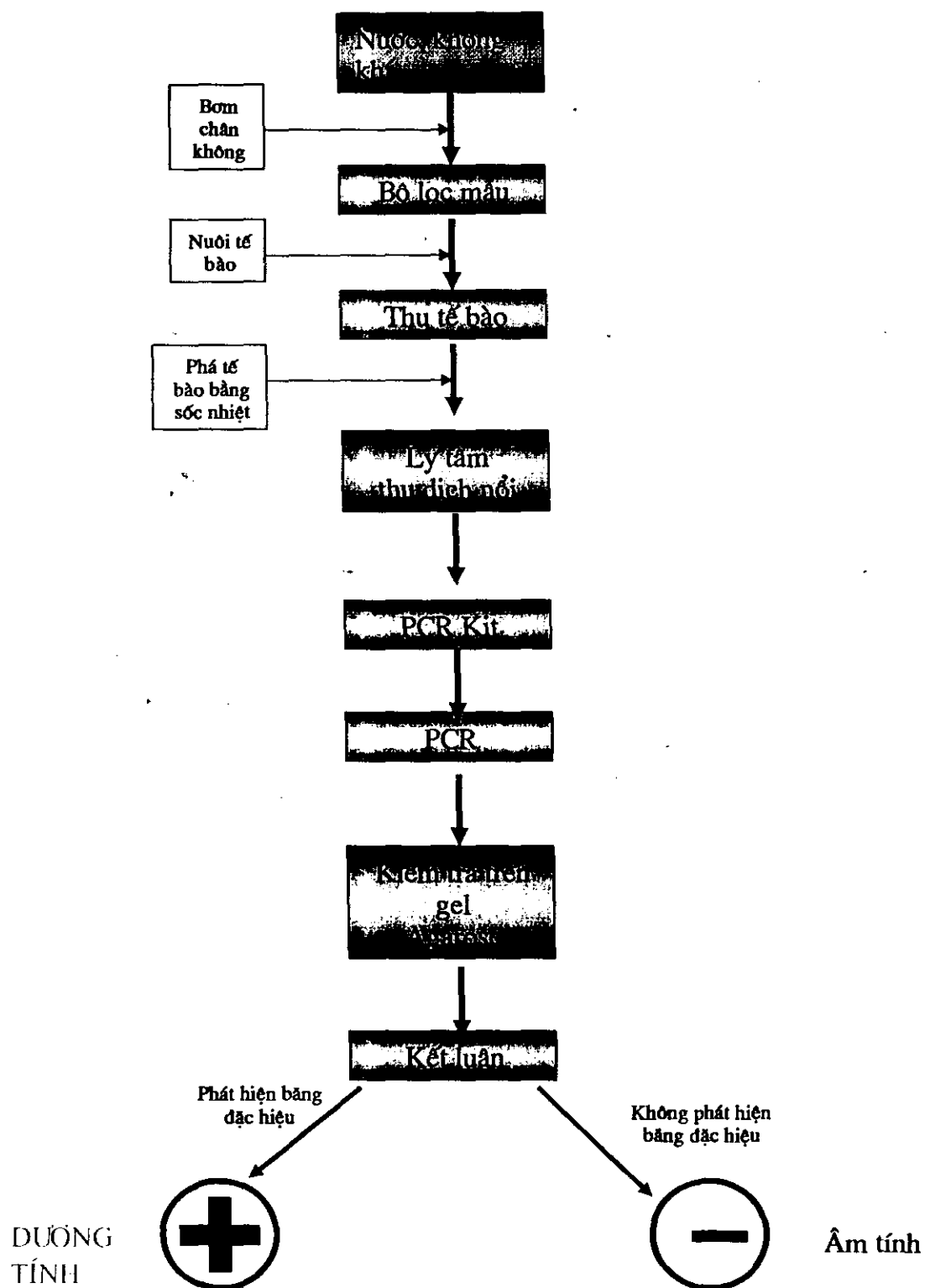
Hình 31. Mô hình thiết bị thu hồi vi khuẩn từ không khí



Hình 32. Mô hình thiết bị thu hồi vi khuẩn từ mẫu nước

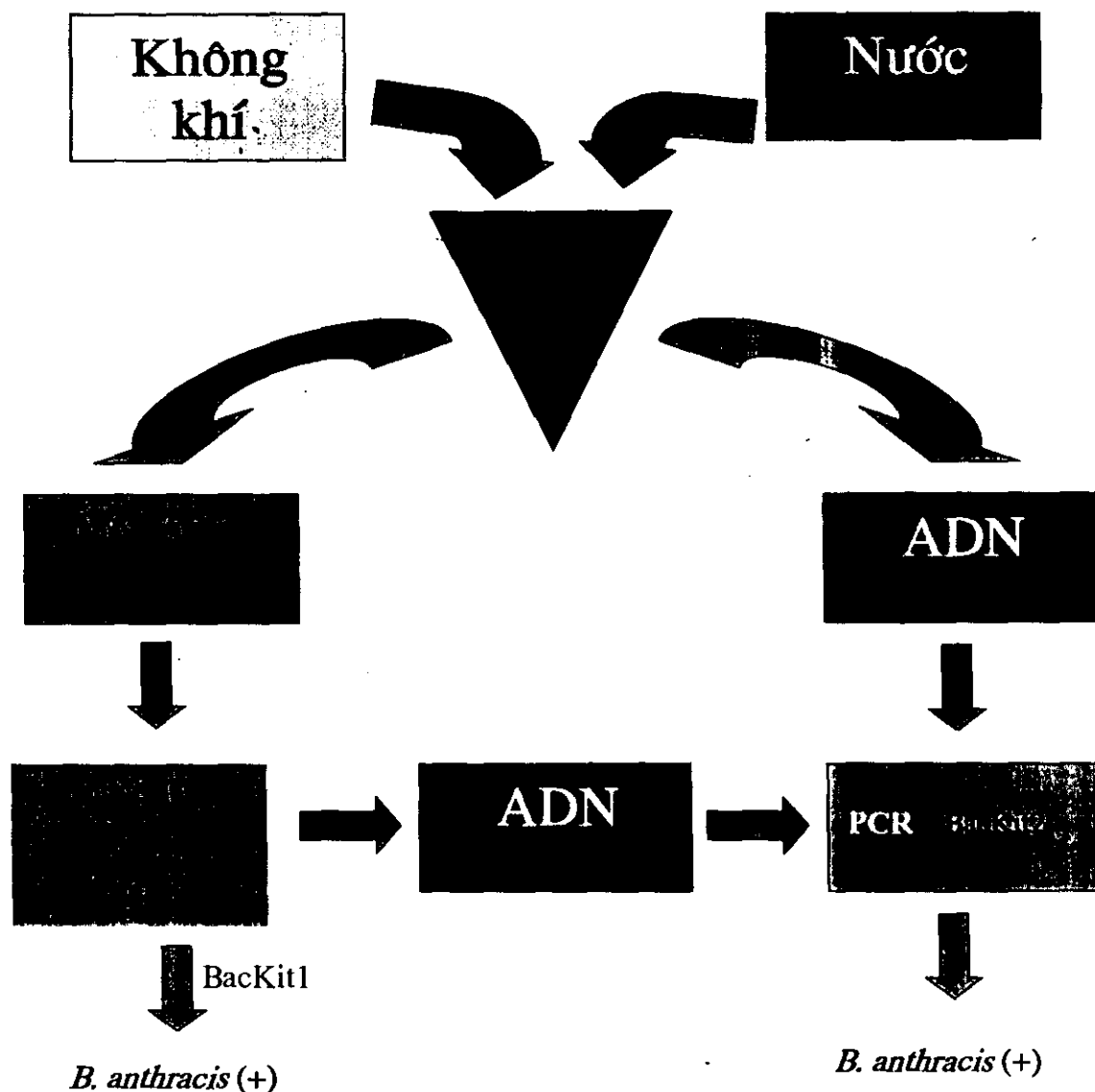
3.5.2. Xây dựng quy trình phát hiện vi khuẩn gây bệnh từ nước và không khí

Nguyên lý chung của quy trình đó là sử dụng các thiết bị lọc mẫu làm giàu và thu hồi vi khuẩn. Từ lượng vi khuẩn thu được tiến hành tách ADN sau đó chạy PCR với Kit đặc hiệu và phát hiện gen trên gel agarose (Hình 32). Toàn bộ quy trình phát hiện được thực hiện trong khoảng thời gian 6-8h.



Hình 33. Quy trình phát hiện vi khuẩn gây bệnh trong nước và không khí

Riêng đối với vi khuẩn *B. anthracis* gây bệnh than, ngoài Kit PCR chúng tôi đã chế tạo thêm được Kit huyết thanh miễn dịch, do vậy quy trình phát hiện sẽ bổ sung như sau:

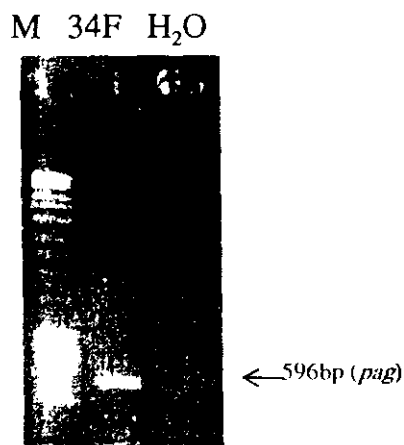


Hình 34. Sơ đồ quy trình lấy mẫu và phát hiện vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây bệnh Than

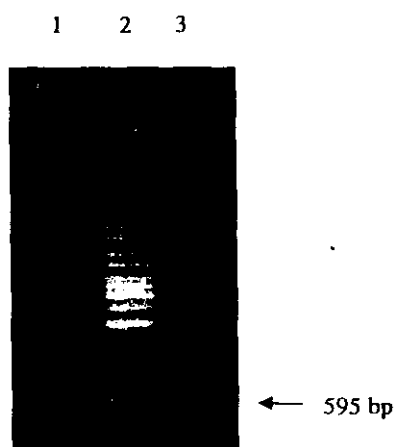
3.6. Sử dụng các bộ Kit để phát hiện vi khuẩn gây bệnh trong phòng thí nghiệm

Để kiểm tra độ tin cậy của thiết bị cũng như của các bộ Kit chúng tôi đã lập mô hình thử nghiệm trong phòng thí nghiệm. Tuy nhiên để đảm bảo công tác an toàn chúng tôi chỉ sử dụng vi khuẩn *Bacillus anthracis* (chủng nhược độc 34F) và vi khuẩn *S. typhi* làm mẫu đối chứng dương, nước máy làm mẫu chẩn đoán.

Sử dụng 10^5 tế bào pha trong 2 lit nước cất sau đó lọc bằng thiết bị lọc và phát hiện vi khuẩn bằng phương pháp PCR với bộ Kit đã chế tạo, kết quả trên hình 35, 36.



Hình 35. Phát hiện vi khuẩn *Bacillus anthracis*



Hình 36. Phát hiện vi khuẩn *S. tyhi*

Đường chạy 1: Mẫu nước của Viện Công nghệ Sinh học

Đường chạy 2: Thang ADN chuẩn 1Kb

Đường chạy 3: Mẫu đối chứng

Như vậy các thiết bị có khả năng thu được vi khuẩn từ nước và không khí, các bộ Kit có thể phát hiện được các vi khuẩn đặc hiệu. Các kết quả cụ thể được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Thông tin về các bộ Kit đã sản xuất

Tên Kit	Vi khuẩn đích	Độ nhạy (pg)	Ngưỡng phát hiện (Tế bào)	Bảo quản
BacKit	<i>Bacillus anthracis</i>	1	1000	Lạnh
YerKit	<i>Yersinia pestis</i>	200	10 - 100	Lạnh
VibKit	<i>Vibrio cholerae</i>	1	1000	Lạnh
SalKit	<i>Salmonella typhi</i>	0,07	10 - 100	Lạnh
ShiKit	<i>Shigella</i> sp.	1700	10 ⁵	Lạnh

3.7. Một số kết quả khác đã đạt được của đề tài

3.7.1. Phân lập và phân loại *Bacillus anthracis*

Số liệu cụ thể được trình bày trong phụ lục 1.

3.7.2. Tách dòng và đọc trình tự đoạn ADN của gen *pla* ở *Y. pestis*

Số liệu cụ thể được trình bày trong phụ lục 2.

3.7.3. Xác định trình tự gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae*

Số liệu cụ thể được trình bày trong phụ lục 3.

3.7.4. Đào tạo và các công trình đã công bố

Đề tài cũng góp phần đào tạo được:

- 2 thạc sỹ, 7 cử nhân
- 4 sinh viên, 2 học viên cao học đang làm khoá luận tốt nghiệp
- 1 nghiên cứu sinh đang làm luận văn
- 12 bài báo đã được công bố.

3.7.5. Kinh phí được cấp:

Tổng kinh phí: 380 tr. đ

- Năm 2001: 50 (đã cấp và đã quyết toán)
- Năm 2002: 150 (đã cấp và đã quyết toán)
- Năm 2003: 150 (đã cấp và đã quyết toán)
- Năm 2004: 30 (Chưa cấp)

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN

1. Đã thiết kế chế tạo được hai bộ thu thập mẫu vi khuẩn gây độc hại từ nước và không khí.
2. Đã chế tạo được 5 bộ Kit phân tử (mỗi bộ 2 Kit) dùng để phát hiện nhanh các vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây bệnh than, *Yersinia pestis* gây bệnh dịch hạch, *Vibrio cholerae* gây bệnh tả, *Salmonella typhi* gây bệnh thương hàn, *Shigella* gây bệnh lỵ. Ngoài ra đề tài cũng đã chế tạo được 2 bộ Kit huyết thanh miễn dịch để phát hiện vi khuẩn *Bacillus anthracis* và *Vibrio cholerae* để sử dụng ở tuyến cơ sở.
3. Đã xây dựng được 5 quy trình sản xuất và sử dụng cho các bộ Kit này.
4. Đã kiểm tra độ nhạy của 5 bộ Kit; Các bộ Kit có thể phát hiện được vi khuẩn với lượng ADN của chúng là 0,07-1700 pg, ngưỡng phát hiện là 10^{-5} tế bào; thời gian xác định mẫu khoảng 6-8h.
5. Đã sử dụng 5 bộ Kit này trong phòng thí nghiệm để phát hiện các vi khuẩn gây bệnh, kết quả cho thấy các bộ Kit có khả năng phát hiện các vi khuẩn nhanh và đặc hiệu.
6. Đề tài cũng góp phần đào tạo được 2 thạc sỹ, 7 cử nhân; 4 sinh viên, 2 học viên cao học đang làm khoa luận tốt nghiệp, 1 nghiên cứu sinh đang làm luận án tiến sĩ; 12 bài báo đã được công bố, đăng ký được 3 trình tự gen quan trọng của *Vibrio cholerae* trong ngân hàng gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Ngô Đình Bính, 2002. *Bacillus anthracis* và bệnh than. Hội thảo khoa học Phương pháp luận nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học xử lý các chất thải quốc phòng đặc chủng và sự ô nhiễm vi sinh vật độc hại. *Tuyển tập báo cáo toàn văn, chương trình KHCN trọng điểm cấp nhà nước giai đoạn 2001-2004*. 86-99.
2. Ngô Đình Bính, Nguyễn Ánh Nguyệt, Nguyễn Quang Huy, *et al.*, 2003. Phát hiện vi khuẩn gây bệnh than *Bacillus anthracis* bằng phương pháp sinh học phân tử. *Báo cáo khoa học tại Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2003*. Nxb KH & KT. 150-154.
3. Đặng Tuấn Đạt, Phạm Văn Hậu, Phạm Công Tiến, Y Bom Niê và cs. (2002), "Một số nhận xét về công tác phòng chống dịch hạch ở Tây Nguyên năm 2001", *Tạp san Y học dự phòng Tây Nguyên*, Viện VSDT Tây Nguyên, 21(1), tr.87-90.
4. Ra Lan Tố Hoa (2002), Tìm hiểu sự lưu hành yếu tố kháng thể F1 của vi khuẩn dịch hạch trên một số đối tượng cảm nhiễm ở một vùng tỉnh Đắk Lắk, Luận án Thạc sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
5. Lê Thanh Hoà (2003), "Giám định phân tử vi khuẩn gây bệnh dịch hạch *Yersinia pestis* (Lehmann and Neumann 1896) phân lập tại Việt Nam sử dụng gen *pla* của plasmid pPCP1", *Tạp chí Y học Việt Nam*, 283(4), tr. 1-7.
6. Lê Thanh Hoà (2004), Sách chuyên khảo: *Sinh học phân tử plasmid: bản chất và ứng dụng*. NXB. Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 350 trang (đang in).
7. Lê Thanh Hoà (2004), *Sinh học phân tử: nguyên lý và ứng dụng* - Giáo trình giảng dạy Sau Đại học, Học viện Quân Y, Hà Nội, 105 trang (đang in).
8. Lê Thanh Hoà (2002). "Nghiên cứu một số phương pháp chẩn đoán nhanh vi khuẩn gây bệnh *Yersinia*". *Tạp san Hội thảo khoa học Bộ quốc phòng* - (7.03.2002), Hà Nội.
9. Lý Thị Vi Hương, Đào Xuân Vinh và cs. (2000), "Tìm hiểu mối quan hệ và tác nhân gây bệnh dịch hạch (*Y. pestis*) tại các ổ dịch hạch ở Tây Nguyên", *Tạp san Y học dự phòng Tây Nguyên*, 18(1), tr. 114-122.
10. Lý Thị Vi Hương, Đào Xuân Vinh, Slutxtki A.A., Maiorov I.V., Sunsova N.I (2002), "Kết quả giám sát vật chủ và trung gian truyền bệnh dịch hạch tại Đắk Lắk năm 2000", *Tạp san Y học dự phòng Tây Nguyên*, Viện VSDT. Tây Nguyên, 21(1), tr. 65-68.
11. Võ Thương Lan (2001), *Sinh học phân tử*, NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội.

12. Nguyễn Đức Lượng (chủ biên) (2002), *Công Nghệ Gen*, NXB ĐHQG, TP. HCM.
13. Nguyễn Văn Mẫn, Đặng Đức Trạch, Hoàng Thuỷ Long (1981), "Hình ảnh hiển vi điện tử của vi khuẩn dịch hạch", *Công trình NCKH. 1976-1980*, Viện VSDT Hà Nội, tr. 72-73.
14. Nguyễn Ái Phương, Naumov A. B., Đào Xuân Vinh và cs. (1997), "Nghiên cứu tổng hợp các đặc điểm dịch tễ, vi sinh vật học, vật chủ và trung gian truyền bệnh dịch hạch ở Tây Nguyên", *Báo cáo tổng kết Đề tài khoa học kỹ thuật cấp nhà nước M.11*, tr.42-52.
15. Nguyễn Xuân Sơn (1992), Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch dịch thể của bệnh nhân dịch hạch bằng phương pháp ELISA, Luận văn cử nhân Sinh học, ĐHKHTN., Hà Nội, tr. 8-10.
16. Nguyễn Thái, Nguyễn Ái Phương và cs. (1983), "Lịch sử và kết quả nghiên cứu bệnh dịch hạch ở Tây Nguyên 1944-1975", *Công trình NCKH 1983*, Viện VSDT TN., tr. 9-24.
17. Nguyễn Thái và cs. (1996), "Nhận định qua vụ dịch hạch tại huyện Ayunpa ở tỉnh Gia Lai cao điểm mùa khô 1995-1996", *Tạp chí Y học thực hành*, số 12, tr.117-120.
18. Dương Đình Thiện (Chủ biên) (1996), *Thực hành dịch tễ học*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 15-25.
19. Lê Thế Trung (2001), "Vũ khí sinh học, phòng chống khủng bố sinh học", <http://www.cimsi.org.vn/tapchi/sotttyd/bai1-12-2001.htm>.
20. Đỗ Thông, Phan Đức Nhuận và cs. (1980), "Tóm lược lịch sử và đặc điểm của dịch hạch ở vùng duyên hải miền Trung" , *Công trình NCKH 1975-1980*, Viện Pasteur Nha Trang, tr.101-103
21. Đào Xuân Vinh (1989), Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn dịch hạch phân lập ở Tây Nguyên, Luận án PTS. Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
22. Đào Xuân Vinh, Trịnh Thị Mai (2001), "Một số nhận xét về Biotype và Ribotype của các chủng vi khuẩn dịch hạch (*Y. pestis*) phân lập ở Tây Nguyên", *Tạp san Y học dự phòng Tây Nguyên*, số 19, tr. 29-35.
23. Đào Xuân Vinh, May C. Chu và cs. (2002), "Bước đầu nghiên cứu DNA của một số chủng *Y. pestis* phân lập tại Tây Nguyên bằng enzym cắt đoạn (Restriction)", *Tạp chí Y học thực hành*, số 10 (432+433), tr. 29-31
24. Đào Xuân Vinh và cs. (2000), "Kết quả xác định độc lực và độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn dịch hạch phân lập ở Tây Nguyên từ năm 1994-1997", *Tạp chí Y học thực hành*, số 386, Hà Nội, tr. 170-173.
25. Nguyễn Minh Anh, Nguyễn Ngọc Dũng, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đỗ Ngọc Khuê (2003) Nghiên cứu xác định vi khuẩn *Shigella* bằng kỹ thuật gen. *Báo cáo khoa học Hội nghị*

Công nghệ Sinh học toàn quốc 2003, 16-17. 12. 2003, Hà Nội. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 162-166.

26. Nguyễn Minh Anh, Nguyễn Ngọc Dũng, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đỗ Ngọc Khuê (2004). Sử dụng kỹ thuật phản ứng nhân bản phân đoạn *ORF-3* của locus *spa* trong xác định *Shigella* spp. Tạp chí Công nghệ Sinh học (đang in)

Tài liệu tiếng nước ngoài

27. OIE, 2000. Chapter 2.21. Anthrax. In *Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines*. Office International des Épizooties, Paris.
28. Paul J. Jackson, Eliza A. Walther, Abdullahi S. Kalif, Kara L. Richmond, Debra M. Adair, Ken K. Hill, Cheryl R. Kuske, Gary L. Andersen, Kenneth H. Wilson, Martin E. Hugh-Jones, Paul Keim, 1997. Characterization of the Variable-Number Tandem Repeats in *vrrA* from Different *Bacillus anthracis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 1997, Vol. 63, No. 4, p 1400-1405.
29. WHO/EMC/ZDI/98.6 Guidelines for the Surveillance and control of Anthrax in Human and Animals.
30. Annie Guiyoule, F.Grimont, I. iteman, Patrick A.D. Grimont, M.Lefèvre, E. Carniel. (1994), "Plague pandemic Investigated by Ribotyping of *Yersinia pestis*" strains. *J. of Clinical Microbiology*, Mar., pp. 634-641.
31. Andrew A. Filippov, Nicolai S. Solodnikov, Liubov M. Kookleva and Olga A. Protsenko. (1990), "Plasmid content in *Y. pestis* strains of different origin", *FF. MS. Microbiology Letters* 67, pp. 45-48.
32. Arnold, T., Hensel, A., Hagen, R., Aleksic, S., Neubauer, H., Scholz, H.C. (2001), "A highly specific one-step PCR-assay for the rapid discrimination of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* from pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*", *Syst Appl Microbiol.*, 24(2), pp.285-289.
33. Bahmanyar, Cavanaugh D. C. (1976), *Plague manual*, World Health Organization, Geneva, pp. 19-22.
34. Bibel D. J. and Chen T. H. (1976), "Diagnosis of plague. An analysis of the Yersin-Kitasato controversy", *Bacteriol. Rev.* pp. 40: 633-651.
35. Carpenter A.A. (1997), Enzyme-Linked Immunoassays. In: Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM, eds. *Manual of clinical laboratory immunology*, 5th ed. Washington, Dc: ASM press: 20-9, PP. 57-63.
36. David T. Dennis and James M. Hughes. (1997), "Multidrug Resistance in Plague". *The*

New England Journal of Medicine, September 4, Volume 337, Number 10: pp. 702-704.

37. Dawes, H. (2001). " *Yersinia pestis*: Sequence sheds light on the plague's past", *Curr. Biol.* 11:R949-R951.
38. Engelthaler, D.M., Hinnebusch, B.J., Rittner, C.M., Gage, K.L. (2000), Quantitative competitive PCR as a technique for exploring flea-*Yersinia pestis* dynamics, *Am J Trop Med Hyg.* 62(5):552-560.
39. Eugene T. (1999), *Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control - WHO /CDS/CSR/EDC* , pp. 87-95.
40. Hu, P., Elliott, J., McCready, P., Skowronski, E., Garnes, J., Kobayashi, A., Brubaker, R.R., and Garcia, E. (1998), "Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*", *J. Bacteriol.* 180(19):5192-5202.
41. Inglesby Thomas V., Dennis David T., et al. (2000), "Plague as a biological weapon", *Medical and public health management*. JAMA. May 3, 2000, 283(17), pp. 2281-2290.
42. Iqbal, S.S., Chambers, J.P., Goode, M.T., Valdes, J.J., Brubaker, R.R. (2000), Detection of *Yersinia pestis* by pesticin fluorogenic probe-coupled PCR, *Mol. Cell. Probes.* 14(2), pp. 109-114.
43. James E. W., Lorraine A., David M.R. (1982), "Comparison of passive hemagglutination and enzyme-Linked Immunosorbent assay for serodiagnosis of plague", *Report of the World Health Organization*, 60 (5): pp. 777-781
44. Laboratory Response Network (LRN), 2001, *Level A Laboratory Procedures for Identification of Yersinia pestis*, PDF file downloaded from Website: ype.la.cp.121301.
45. Lindler, L.E., Plano, G.V., Burland, V., Mayhew, G.F. and Blattner, F.R. (1998), "Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen", *Infect Immun*, 66(12):5731-5742.
46. May C. Chu. (2000), *Laboratory Manual of Plague Diagnostic Test CDC*, 3rd edition, WHO, pp. 67-89.
47. Marc Galimand, Annie Guiyoule, Guy Gerbaud, Bruno RAsoamanana, Suzanne Chanteau, Elisabeth Carniel and Patrice Courvalin. (1997), "Multidrug Resistance in *Yersinia pestis* Mediated by a Transferable Plasmid", *The New England Journal of Medicine*, September 4, 337(10), pp. 677-680.
48. Mollaret H.H. (1965), *Intenn Bull. Bact. Nomen taxon*, V. 15: pp: 97.132
49. Mollaret H.H. (1991), *Alexandre Yersin ou le vaingueur de la peste*, NXB Văn hoá thông tin, Hà Nội, Nguyễn Việt Hồng dịch, tr.195-223.

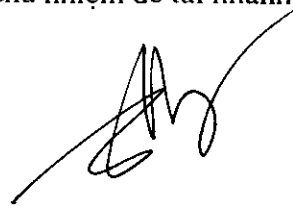
50. Parkhill, J., Wren, B.W., Thompson, N.R. và cs. (2001), "Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague", *Nature*, 413, pp. 523-527.
51. Perry, R.D., Straley, S.C., Fetherston, J.D., Rose, D.J., Gregor, J. and Blattner, F.R. (1998), "DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5", *Infect Immun.*, 66(10), pp. 4611-4623.
52. Putzker, M., Sauer, H., Sobe, D. (2001), "Plague and other human infections caused by *Yersinia* species", *Clin. Lab.*, 47(9-10), pp. 453-466.
53. Radnedge, L., Gamez-Chin, S., McCready, P.M., Worsham, P.L. and Andersen, G.L. (2001), "Identification of Nucleotide Sequences for the Specific and Rapid Detection of *Yersinia pestis*", *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 3759-3762.
54. Rahalison, L., Vololonirina, E., Ratsitorahina, M., Chanteau, S. (2000). "Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions", *J. Clin. Microbiol.*, 38(1), pp. 260-263.
55. Robert D.P. and Jacqueline D.F. (1997), "*Yersinia pestis* - Etiologic Agent of Plague". *Journal Microbiology Reviews*, pp.35-65.
56. Robert R. Brubaker (1984), "Molecular biology of the dread Black Death", *ASM News*, 50(6), pp. 240-245.
57. Sambrook, J. and Russell, D. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.), Cold Springs Harbor Press, Cold Springs Harbor N.Y.
58. Tsukano, H., Itoh, K., Suzuki, S., Watanabe, H. (1996), "Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers". *Microbiol. Immunol.*, 40(10), pp. 773-775.
59. Byun R., Elbourne L. D., Lan R., Reeves P.R. (1999), "Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes", *Infect Immun*, 67(3), pp. 16-24.
60. Elliot E. L., Kaysner C. A., Tamplin M. L. (1992), "*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp", Bacteriological analytical manual, 7, pp.111 – 140.
61. Ohkuma, M., K. Ohtoko, N. Takada, T. Hamamoto, R. Usami, T. Kudo, and K. Horikoshi. 1996. Characterization of malate dehydrogenase from deep-sea psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710 and cloning of its gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 137:247-252 [Medline]

62. Boyd, E. F., K. Nelson, F. S. Wang, T. S. Whittam, and R. K. Selander. 1994. Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1280-1284.
63. Vogel, R. F., K. D. Entian, and D. Mecke. 1987. Cloning and sequence of the *mdh* structural gene of *Escherichia coli* coding for malate dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* 149 : 36-42 [Medline].
64. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular cloning.
65. Shah M. M., John J. (1998), " Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*, Microbiology and Molecular biology reviews", American Society for Microbiology, pp.1301-1314.
66. Pollitzer, R. 1959. History of the disease, p. 11-50. In R. Pollitzer (ed), *Cholerae*. World Heath Organization, Geneva, Switzerland.
67. Axelsson F., Marie-Laure S.(1997), *Transia Salmonella*, S-422 46 Hisings Backa, Sweden.
68. Parkhill J., Dougan G., James K. D., Thomson N. R., Pickard D., Waln J., Churcho C., Mungall K. L., Bentley S. D., Holden M. T. G., Sebahlla M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T., Connerton P., Cronin A., Davis P., Davies R. M., Dowd L., White N., Farrar J., Feltwell T., Hamlin N., Haque A., Hlen T. T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T. S., Leather S., Moule S., Gaora P. O., Parry C., Quall M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B. G. (2001), "Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18", *Letters to Nature*, 413, p. 848-852
69. Lim P. L., Tam F. C. H., Cheong Y. M., Jegathesan M. (1998). "One-step 2-minute test to detect typhoid-specific antibodies based on particle separation in tubes", *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (8), p. 2271-2278.
70. Wyant T. L., Tanner M. K., Szein M. B. (1999). " *Salmonella typhi* Flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes", *Infection and Immunity*, 67, (7), p. 3619-3624.
71. Haque.A., Ahmed J., Qureshi A.J., (1999). "Early detection of typhoid fever by polymerase chain reaction", *Annals of Saudi Medicine*, 19, (4), p.337-340.
72. Kossaczka Z., Lin F. Y. C., Vo A. H., Nguyen T. T. T., Phan V. B., Tran C. T., Ha B. K., Dang D. T., Karpas A., Hunt S., Bryla D. A., Schneerson R., Robbins J. B., Szu S. C. (1999). "Safety and immunogenicity of Vi conjugate vaccines for typhoid fever in adults,

- teenagers, and 2- to 4-year-old children in Vietnam", *Infection and Immunity*, 67 (11), p. 5806-5810.
73. Hashimoto Y., Itho Y., Fujinaga Y., Khan A. Q., Sultana F., Miyake M., Hirose K., Yamamoto H., Ezaki T. (1994). "Development of nested PCR based on the *ViaB* sequence to detect *Salmonella typhi*", *Journal of Clinical Microbiology*, 33, (3), p. 775-777.
 74. Chart H., Cheesbrough J. S., Waghorn D. J. (2000), "The serodiagnostic of infection with *Salmonella typhi*", *J Clin Pathol*, 53, p. 851-853.
 75. Song J. H., Cho H., Park M. Y., Kim Y. S., Moon H. B., Kim Y. K., Pai C. H. (1994), "Detection of the H1-j strain of *Salmonella typhi* among Korean isolates by the polymerase chain reaction", *Am J Trop Med Hyg*, 50(5), p. 608-611.
 76. Chaudhry R., Laxmi B. V., Nisar N., Ray K., Kumar D. (1997), "Standardisation of polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella typhi* in fever", *J Clin Pathol*, 50 (5), p. 437-439.
 77. Chistopher M., Tran Tinh Hien., White N.J., Farrar J.J., (2002). "Typhoid fever", *The New England Journal of Medicine*, 347, (22), p.1770-1782.
 78. Jinneman, K. C., P. A. Trost, W. E. Hill, S. D. Weagant, J. L. Bryant, C. A. Kaysner, and M. M. Wekell. 1995. Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* O157 Shiga-like toxins type I and II DNA by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of food protection*. 58: 722-726.
 79. Kuske CR, Banton KL, Adorada DL, Stark PC, Hill KK, Jackson PJ (1998) Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environ Microbiol* 64: 2463-2472.
 80. Rafii, F., M. A. Holland, W. E. Hill, and C. E. Cerniglia. 1995. Survival of *Shigella flexneri* on vegetables and detection by polymerase chain reaction. *Journal of food protection*. 58: 727-732.
 81. Tsai, Y. L., C. J. Palmer, and L. R. Sangermano. 1993. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology*. 59: 353-357.
 82. Tarr, C. L., S. Reid and T. S. Whittam. Multiplex PCR detection of Shiga toxin genes.
 83. Villalobo, E., and A. Torres. 1998. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise. *Applied and environmental microbiology*. 64: 1242-1245.
 84. Wang, R. F., W. W. Cao, and C. E. Cerniglia. Phylogenetic analysis and identification of *Shigella* spp. by molecular probes. *Molecular and cellular probes*. 1997. 11: 427-432.

Hà Nội, ngày 10 tháng 9 năm 2004

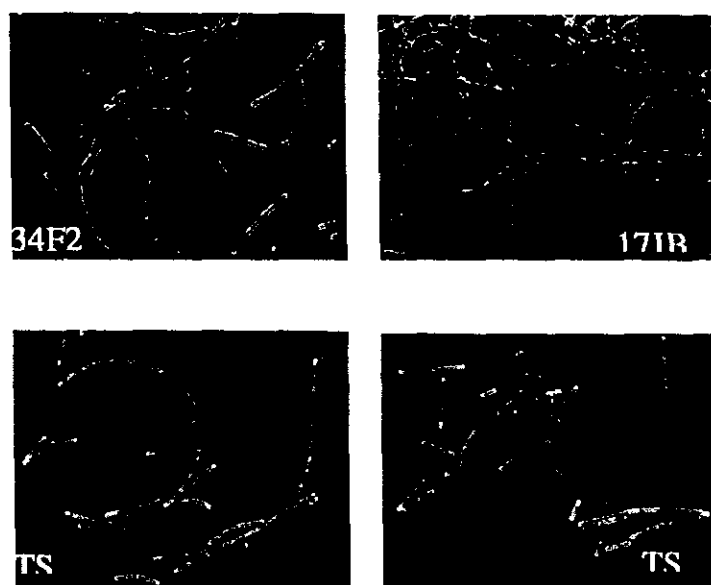
Chủ nhiệm đề tài nhánh

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke extending to the left.

Nguyễn Thị Ngọc Dao

PHỤ LỤC 1: PHÂN LẬP VÀ PHÂN LOẠI *Bacillus anthracis*

- Phân lập: Đã phân lập được 10 chủng trực khuẩn thuộc nhóm *Bacillus cereus* theo nghĩa rộng (bao gồm *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*) từ 35 mẫu đất, nước, không khí và mẫu môi trường thu thập từ một số địa phương đã xảy ra các vụ dịch nhiệt thán trên gia súc và nhà máy thuộc da. Đối với các mẫu không khí và nước được thu bằng thiết bị lấy mẫu tự chế tạo.
- Thu thập: Đã thu thập được 3 chủng *B. anthracis*, chủng không độc (VCM-0012) dùng cho sản xuất vacxin, chủng nhược độc (34F) và chủng độc (17JB).
- Phân loại: Kết quả phân lập, phân loại, nghiên cứu các đặc điểm hình thái sinh lý sinh hoá của các chủng phân lập và chủng chuẩn (Hình 1, Bảng 1, Bảng 2):



Hình 1. Ảnh kính hiển vi điện tử chụp các chủng phân lập TS1, TS2 và các chủng chuẩn 34F2, 17JB, nuôi trên môi trường đặc sau 12 giờ.

Chủng 34F2 chụp ở độ phóng đại 2000 lần, chủng 17JB -1500 lần, chủng TS1 và TS2-1000 lần.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của các chủng thuộc chi *Bacillus* phân lập từ đất

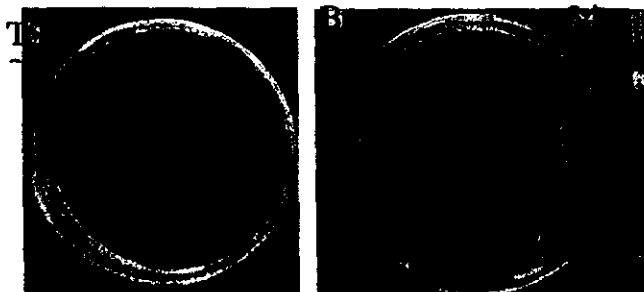
ST T	Tên chủng	Hình thái khuẩn lạc	Sinh bào tử	Kích thước tế bào	Gram	Di động
1	HN1	Trắng, răng cưa	+	3mm	+	+
2	HN2	Trắng ngà, nhẵn	+	4mm	+	+
3	HN3	Trắng sữa, phẳng	+	3,8mm	+	+
4	HN4	Trắng nâu,	+	5mm	+	+
5	HN5	Trắng xám, phẳng	+	3,5mm	+	-
6	HN6	Trắng, nhẵn	+	4mm	+	+
7	HN7	Trắng, hơi lồi	+	4,2mm	+	+
8	HN8	Trắng xám, phẳng	+	3,7mm	+	-
9	HN9	Trắng ngà, trơn	+	2,5mm	+	+
10	HN10	Trắng nâu, phẳng	+	3,4mm	+	+
11	TS1	Trắng nâu, răng cưa	+	3mm	+	-
12	TS2	Trắng nâu, răng cưa	+	3mm	+	-

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh lí của chủng chuẩn và chủng phân lập

STT	Chủng	Sinh axetoin	Khử nitrat	Sinh urease	Sinh catalase
1	17JB	+++	+++	-	++
2	HN5	+++	+++	-	+++
3	HN8	++++	+++	-	+++
4	TS1	+++	+++	-	++
5	TS2	+++	+++	-	++

Tính chất nuôi cấy. Trên môi trường thạch máu RBA, các chủng TS1 và TS2 đều làm tan huyết giống *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong khi đó, chủng chuẩn *Bacillus anthracis* 34F2 thì không. Đây là một tính chất nuôi cấy của chủng TS1, TS2 khác so

với chủng chuẩn. Tuy nhiên, trong một số tài liệu, tùy từng chủng có thể làm tan huyết máu thỏ (Hình 2).



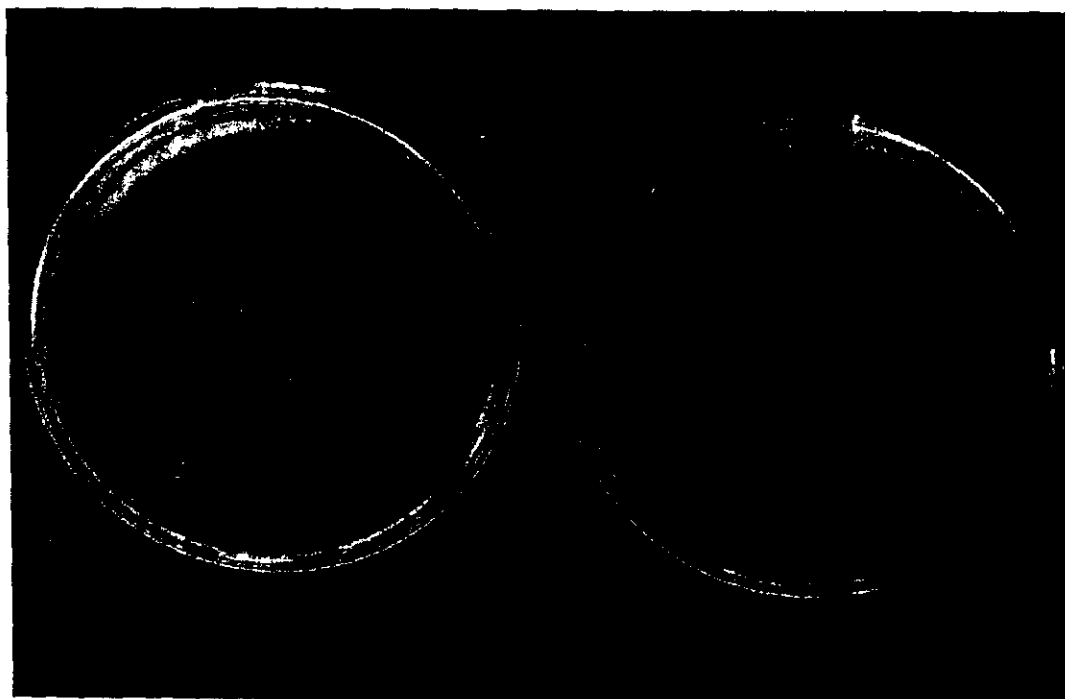
**Hình 2. Tính chất nuôi cấy của các chủng TS2, Bt, 34F
trên môi trường thạch máu thỏ RBA sau 24 giờ.**

PHỤ LỤC 2: DÒNG HOÁ VÀ GIẢI TRÌNH TRÌNH TỰ GEN *PLA* CỦA *Y. pestis*

2.1 Kết quả dòng hoá đoạn ADN của gen *pla* ở *Y. pestis*

Sản phẩm PCR thu được từ 3 nguồn làm khuôn mô tả ở trên được tinh sạch bằng bộ hoá chất QiaQuick Purification Kit (Qiagen Inc.). Tiếp theo, sản phẩm được tạo dòng vào vectơ plasmit pCR2.1 (Invitrogen Inc.) sử dụng bộ kit tạo dòng TA của Hãng Invitrogen.

Sau khi chuyển nạp vào tế bào khả biến *E. coli*, các dòng tế bào vi khuẩn tái tổ hợp có chứa đoạn gen *pla* được thu nhận. Hình 3 trình bày các đĩa thạch chứa các khuẩn lạc vi khuẩn, trong đó các khuẩn lạc màu trắng là các dòng tế bào tái tổ hợp mang ADN ngoại lai (gen *pla*):



Hình 3: Kết quả dòng hoá sản phẩm PCR từ 2 nguồn ADN tổng số và ADN plasmit pPCP1 của *Y. pestis*.

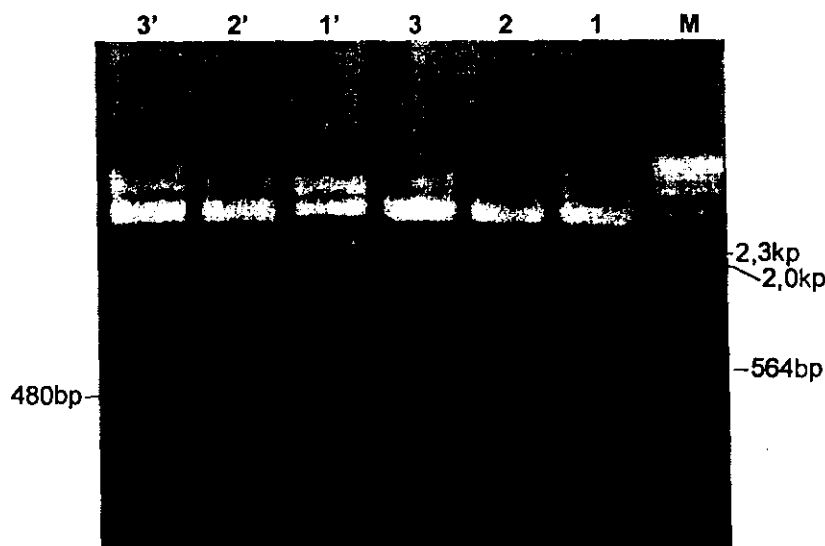
1- Yp PCR 248: sản phẩm PCR từ nguồn ADN tổng số

2- Yp PCR 249: sản phẩm PCR từ nguồn ADN plasmit pPCP1

Chú thích: Các dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp được cấy trên đĩa thạch có chứa cơ chất X-gal và kháng sinh kanamycin nồng độ 50µg/ml. Những khuẩn lạc xanh là tế bào vi khuẩn mang vectơ tự gắn lại (gen *lacZ* nguyên vẹn), còn những khuẩn lạc màu trắng là

tế bào vi khuẩn mang vector có gắn ADN ngoại lai (gen *pla*) (gen *lacZ* xen giữa ADN ngoại lai).

Các khuẩn lạc trắng được chọn lọc, nuôi cấy và tách chiết ADN của plasmit. Độ dài của đoạn gen *pla* có trong plasmit tái tổ hợp được kiểm tra trên thạch 0.8%, sau khi xử lý bằng enzym giới hạn *EcoRI*. Kết quả được trình bày ở Hình 4:



Hình 4 : Điện di kiểm tra phản ứng tách plasmit mang đoạn gen *pla*

Chú thích:

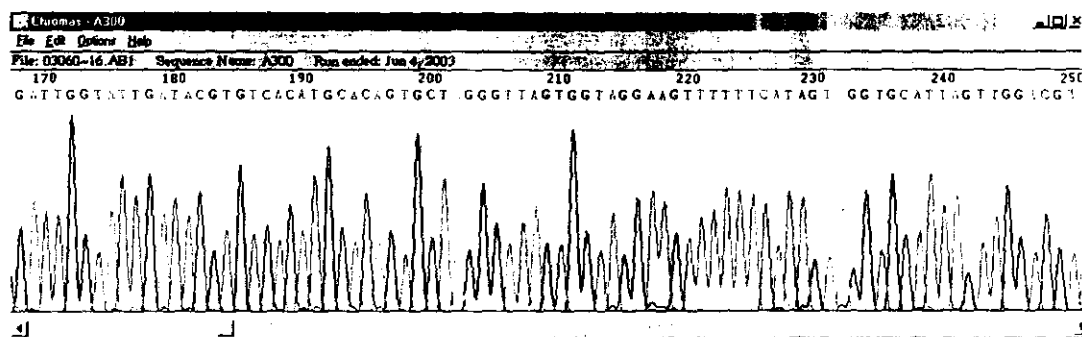
1, 2, 3 tương ứng với các clone 1, 2, 3 của *YpPCR 248*

1',2',3' tương ứng với các clone 1, 2, 3 của *YpPCR 249*.

Kết quả điện di trên cho thấy, trong số các plasmit đã tách ADN tái tổ hợp, một số có mang gen *pla* của *Y. pestis*. Dựa trên đó, giải trình trình tự gen được tiến hành.

2.2 Kết quả giải trình trình tự gen *pla*

Trình tự nucleotit của ADN plasmit chứa sản phẩm PCR tái tổ hợp được giải trình trên máy tự động ABI-377 (ABI-377 automated sequencer) của Hãng Perkin-Elmer (Mỹ). Chuỗi nucleotit được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03; sau đó sử dụng chương trình AssemblyLIGN 1.9 và hệ chương trình MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Inc.) để so sánh. So sánh đối chiếu và xử lý số liệu của các chuỗi bằng chương trình GENDOC 2.5 (Nicholas and Nicholas, 1999). Thành phần axit amin được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (của vi khuẩn) số 11 có trong Ngân hàng Gen thông qua chương trình GENDOC 2.5.



Hình 5: Giải đồ giải trình tự (chromatogram) minh họa một phân đoạn gen pla của vi khuẩn dịch hạch Việt Nam.

```

PLAF>      *           20           *           40           *           60
YpVN(pla):
ATCTTACTTTCCGTGAGAAGACATCCGGCTCACGTTATTATGGTACCGTAATT
AACGCTG                                         : 60
      *           80           *           100          *           120
YpVN(pla):
GATATTATGTCACACCTAATGCCAAAGTCTTTGCGGAATTTACATACAGTAA
ATATGATG                                         :120
      *           140          *           160          *           180
YpVN(pla):
AGGGCAAAGGAGGTACTCAGACCATGATAAGAATAGTGGAGATTCTGTCT
CTATTGGCG                                         :180
      *           200          *           220          *           240
YpVN(pla):
GAGATGCTGCCGGTATTTCCAATAAAAATTATACTGTGACGGCGGGTCTGCA
ATATCGCT                                         :240
      *           260          *           280          *           300
YpVN(pla):
TCTGAAAAATACAGATCATATCTCTCTTTTCATCCTCCCCTAGCGGGGAGGAT
GTCTGTG                                         :300
      *           320          *           340          *           360
YpVN(pla):
GAAAGGAGGTTGGTGTTTGACCAACCTTCAGATGTGTGAAAAATCACCTTTT

```

TCACCATA					:360
	*	380	*	400	*
					420
YpVN(pla):					
ATGACGGGGCGCTCATTCTGTTGTTTTGCCTTGACATTCTCCACGTCTTTCAGG					
GCATGG					
					:420
	*	440	*	460	*
					<PLAR
YpVN(pla):					
AGAAGGTCAAATTAGACATGGAACGCTACTCTCCTTCCTGTAGGAAGCTCAA					
<u>CATCCAAG</u> :480					

Hình 6: Chuỗi nucleotit phân đoạn gen pla thu được sau khi giải trình trình tự và phân tích. 20 nucleotit ở phần đầu và cuối là thành phần của cặp mồi PLAF và PLAR (được gạch kép ở bên dưới).

Sau khi giải trình trình tự, chuỗi nucleotit thu nhận được từ vi khuẩn dịch hạch Việt Nam có độ dài là 480 cặp nucleotit, hoàn toàn chính xác về độ dài mà các nhà nghiên cứu khác thu nhận được từ các chủng khác nhau trên thế giới của vi khuẩn dịch hạch sử dụng cặp mồi PLAF-PLAR [32] (Hình 17).

2.3 Kết quả truy cập Ngân hàng Gen

Chuỗi nucleotit này được đưa vào truy cập Ngân hàng Gen tại địa chỉ: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sử dụng chương trình BLAST. Kết quả được trình bày ở bảng 5. Kết quả cho thấy hệ số đồng nhất của gen *pla* của plasmid pPCP1 vi khuẩn dịch hạch (*Yersinia pestis*) phân lập tại Việt Nam, với các chủng khác nhau của thế giới cho phép kết luận chính xác về giám định phân tử vi khuẩn dịch hạch Việt Nam.

Bảng 3: Kết quả truy cập Ngân hàng Gen sử dụng chuỗi nucleotit của gen pla thu nhận từ chủng vi khuẩn dịch hạch Việt Nam, và được xác định với hệ số đồng nhất 100% với gen pla của plasmid pPCP1 của các chủng vi khuẩn dịch hạch (*Yersinia pestis*) thế giới.

Số đăng ký Ngân hàng Gen	Tên loài có kết quả tương đồng	Hệ số	Giá trị
gi 48629 emb X15136.1 YPPLA	<i>Y.pestis</i> plasmit pKYP1 <i>pla</i> gene...	952	0.0
gi 5763810 emb AL109969.1 YPPCP1	<i>Yersinia pestis</i> plasmit pPCP1	952	0.0
gi 2996216 gb AF053945.1 AF053945	<i>Yersinia pestis</i> plasmit p...	952	0.0
gi 155524 gb M27820.1 YEPTA	<i>Yersinia pestis</i> plasminogen ac...	936	0.0
gi 23194196 gb AF528089.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate assc Pla...	872	0.0
gi 23194194 gb AF528088.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate pusc Pla...	872	0.0
gi 23194192 gb AF528087.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate suau Pla...	872	0.0
gi 23194190 gb AF528086.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate sull Pla...	872	0.0
gi 23194188 gb AF528085.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate nabc Pla...	872	0.0
gi 23194186 gb AF528084.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate nasp Pla...	872	0.0
gi 23194184 gb AF528083.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate ansp Pla...	872	0.0
gi 23194182 gb AF528082.1	<i>Yersinia pestis</i> isolate anbc Pla...	872	0.0

Ghi chú: Chương trình sử dụng là chương trình BLAST của NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dãy số và ký tự bên trái là số đăng ký; ở giữa là tên loài; hai dãy cuối cho biết mức độ chính xác của kết quả phân tích sinh-tin học trong chương trình BLAST.

***Y. PESTIS* (PHÂN ĐOẠN GEN *PLA*):**

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
Yp (KIM) : ATCTTACTTTCCGTGAGAAAGACATCCGGCTCACGTTATTATGGTACCGTAATTAACGCTGGATATTATGTCACACCTAAT : 80
Yp (CO92) : ..... : 80
Yp (VN) : ..... : 80
Yp (assc) : ..... : 60
Yp (nabc) : ..... : 60
Yp (pusc) : ..... : 60
Yp (suau) : ..... : 60
Yp (sull) : ..... : 60
      *           100          *           120          *           140          *           160
Yp (KIM) : GCCAAAGTCTTTGCGGAATTTACATACAGTAAATATGATGAGGGCAAAGGAGGTACTCAGACCATTGATAAGAATAGTGG : 160
Yp (CO92) : ..... : 160
Yp (VN) : ..... : 160
Yp (assc) : ..... : 140
Yp (nabc) : ..... : 140
Yp (pusc) : ..... : 140
Yp (suau) : ..... : 140
Yp (sull) : ..... : 140
      *           180          *           200          *           220          *           240
Yp (KIM) : AGATTCTGTCTCTATTGGCGGAGATGCTGCCGGTATTTCCAATAAAAATTATACTGTGACGGCGGGTCTGCAATATCGCT : 240
Yp (CO92) : ..... : 240
Yp (VN) : ..... : 240
Yp (assc) : ..... : 220
Yp (nabc) : ..... : 220
Yp (pusc) : ..... : 220
Yp (suau) : ..... : 220
Yp (sull) : ..... : 220
      *           260          *           280          *           300          *           320
Yp (KIM) : TCTGAAAAATACAGATCATATCTCTCTTTTCATCCTCCCTAGCGGGGAGGATGTCTGTGGAAGGAGGTTGGTGTTTGA : 320
Yp (CO92) : ..... : 320
Yp (VN) : ..... : 320
Yp (assc) : ..... : 300
Yp (nabc) : ..... : 300
Yp (pusc) : ..... : 300
Yp (suau) : ..... : 300
Yp (sull) : ..... : 300
      *           340          *           360          *           380          *           400
Yp (KIM) : CCAACCTTCAGATGTGTGAAAAATCACCTTTTCACCATAATGACGGGGCGCTCATTCTGTTGTTTTCCTTGACATTCT : 400
Yp (CO92) : ..... : 400
Yp (VN) : ..... : 400
Yp (assc) : ..... : 380
Yp (nabc) : ..... : 380
Yp (pusc) : ..... : 380

```

Yp(suau):		: 380
Yp(sull):		: 380
	* 420 * 440 * 460 * 480	
Yp(KIM):	CCACGTCTTTCAGGGCATGGAGAAGGTCAAATTAGACATGGAACGCTACTCTCCTTCCTGTAGGAAGCTCAACATCCAAG	: 480
Yp(CO92):		: 480
Yp(VN) :		: 480
Yp(assc):		: 440
Yp(nabc):		: 440
Yp(pusc):		: 440
Yp(suau):		: 440
Yp(sull):		: 440

Hình 3: So sánh trình tự 480 nucleotit của phân đoạn gen pla thu nhận từ vi khuẩn dịch hạch Việt Nam (Yp(VN)), với các chủng chuẩn của thế giới (Yp(KIM)); (Yp(CO92)); và các chủng khác nhau phân lập tại Ấn Độ (Yp(assc); Yp(nabc); Yp(pusc); Yp(suau); Yp(sull)).

Ghi chú: chủng Việt Nam Yp(VN) được bôi đậm; dấu (.) biểu thị giống với trình tự chủng chuẩn Yp(KIM); sai khác về nucleotit hoặc axit amin được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng; dấu (-) biểu thị thiếu thành phần nucleotit.

PHỤ LỤC 3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN MÃ HOÁ ENTEROTOXIN, HEMOLYSIN VÀ MALATE DEHYDROGENAZA TỪ VI KHUẨN TẢ *VIBRIO CHOLERA*

Để khẳng định chắc chắn kết quả tạo dòng plasmit tái tổ hợp có mang gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae*. Chúng tôi tiến hành tinh sạch plasmid tái tổ hợp này bằng Kit S.N.A.P.TM (Invitrogen) và xác định trình tự ADN theo phương pháp tổng hợp của Sanger và cs với bộ kit xác định trình tự BigDye Terminator v3.1 và máy đọc trình tự ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biotech).

Sau khi xác định trình tự gen mã hoá Enterotoxin, Hemolysin và Malate dehydrogenaza từ vi khuẩn tả *Vibrio Cholerae*, chúng tôi đã đăng ký 3 trình tự trên trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế với số đăng ký AJ575590, AJ576090, AJ575356

1: AJ575356. *Vibrio cholerae* g...[gi:32451231]

[Links](#)

```

LOCUS       VCH575356                  1565 bp    DNA        linear    BCT 03-JUL-
2003
DEFINITION  Vibrio cholerae gene for malate dehydrogenase.
ACCESSION   AJ575356
VERSION     AJ575356.1  GI:32451231
KEYWORDS    malate dehydrogenase.
SOURCE      Vibrio cholerae
  ORGANISM  Vibrio cholerae
             Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales;
             Vibrionaceae; Vibrio.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Ha Thi,Q., Bach Thi,Q.N., Duong Hong,Q., Nguyen Thi,D.N., Do
            Ngoc,K., Phung Dac,C. and Dinh Duy,K.
  TITLE     Cloning of the gene encoding malate dehydrogenase of Vibrio
            cholerae
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 1565)
  AUTHORS   Dinh Duy,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-JUL-2003) Dinh Duy K., Molecular Microbiology
            Lab,
            Institute of Biotechnology, NCST, 18, Hoang Quoc Viet, Cau Giay,
            Hanoi, 10000, VIET NAM
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..1565
                     /organism="Vibrio cholerae"
                     /mol
     _type="genomic DNA"
                     /serotype="Inaba"
                     /db_xref="taxon:666"
     CDS              73..1008
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="malate dehydrogenase"
                     /protein_id="CAE01323.1"
                     /db_xref="GI:32451232"

```

/translation="MKVAVIGAAGGGIGQALALLLNRLPAGSDLALYDIAPVTPGVAA
 DLSHIPTPVTIKGYAGEDPTPALEGADVVLVSAGVARKPGMDRADLFNVNAGIVKALA
 EKIAVVC PKACVGIITNPVNTTVPIAAEVLKKAGVYDKRKLFGVTTLDVIRSETFVAA
 LKDKDPGQVRVPVIGGHSVGTILPLLSQVEGVSTDEEVAALTKRIQNAGTEVVEAKA
 GGGSATLSMGQAACRFLALVKALQGESDVVEYAYVEGEYAPFFAQPIKLGKNGVE
 ALLDIGKLSAYEQAALDGM LDTLKGDIQIGVEFVK"
 mat peptide 76..1002
 /product="malate dehydrogenase"
 BASE COUNT 365 a 328 c 405 g 467 t
 ORIGIN

```

1 atagcggtttg acggtcggat acacctaatac accctacaaa catataagag attactctca
61 aggagattta cgatgaaagt cgctgttatt ggtgccgctg gcggcattgg tcaagccctt
121 gctctgttac tcaaaaaccg tcttcctgct ggttctgata tcgcgctgta tgatattgag
181 cctgtcacac cgggtgtcgc tgcggatctg agtcatatcc caacaccagt taccatcaaa
241 ggctatgcgg gtgaagaccc aacgcctgcg ctggaagggt cggatgtggt tctggtttct
301 gcgggtgttg cagctaagcc gggatggat cgtgcggatc tgttcaatgt gaacgctggc
361 attgtgaaag cattggcaga aaaaattgct gtgggtgtgc cgaaggcctg tgttggcatt
421 attactaacc cagtgaacac aacggctcct atcgagccg aagtgtgaa aaaagccggt
481 gtgtatgaca agcgtaaagt atttgggtgc accacactgg atgtgatccg ctctgaaacc
541 ttcggtgccg cgctgaaaga taaagatccg ggccaagtgc gtgtgcctgt gattggtggt
601 cactcagggg ttactattct gcctctgttg tcgcaagtag aaggcgtaag ctttaccgat
661 gaagaagttg ccgctttgac taaacgtatc caaaacgcgg gtaccgaggt ggttgaagct
721 aaggcgggtg gcgggttcagc gactctttct atgggccaag cggcatgtcg ttttggctct
781 gacttggtta aagcactgca aggcgaatct gatgtgttg agtacgcgta tgtagaaggt
841 gagggggagt acgctccatt ctttgcccaa cctatcaagc taggtaaaaa tggcgttgaa
901 gcgttgctgg atatcgcaa actgagcgtc tatgagcaag ccgcgctgga tggcatgtta
961 gatacactca aaggcgacat tcaaactcgt gttgagtttg taaaataatc gacaatcgat
1021 tcaagcattg gaaaataccg ctcttgaaga gcggtatatt tttatctcaa tgatatcccc
1081 ttctacttg aagctgcagc ggtgttgact acactcgttc accccaatca catagtttgc
1141 ctatgtctat gcctatgctt atggggattc acttacttgc cgcctacctg caacttcaag
1201 tagtttgaga tttgggaggt cttaaaatta attatttgat ttttcagttt taaattccag
1261 ctattggttt tccactagtg aattcttatg ttacttatct aattatcatt tcatccact
1321 acttttcgtg taatatgcgc tgttttttgt atgcttcgac tcatgtctcg tgagtggaa
1381 ggtggccctt cggctgttgc aggcggattt tctctgttt gtgactgatg cttggaaggg
1441 gaagatggct ttttacctct gttattggtg attaaaaaat aatggataaa aaactgggtt
1501 taggtctctt caccggccta gtgatgggtt caatgattgg tgcgggcgtg tttagcttgc
1561 cacaa

```

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

1: AJ576090. *Vibrio cholerae* p...[gi:32698437]

[Links](#)

LOCUS VCH576090 1726 bp DNA linear BCT 14-JUL-2003
 DEFINITION *Vibrio cholerae* partial hlyA gene for hemolysin A.
 ACCESSION AJ576090
 VERSION AJ576090.1 GI:32698437
 KEYWORDS hemolysin A; hlyA gene.
 SOURCE *Vibrio cholerae*
 ORGANISM *Vibrio cholerae*
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales;
 Vibrionaceae; *Vibrio*.

REFERENCE 1
AUTHORS Ha Thi,Q., Bach Thi,Q.N., Duong Hong,Q., Phung Dac,C., Do Ngoc,K.
and Dinh Duy,K.
TITLE Cloning of the gene encoding hemolysin A from *Vibrio cholerae* serotype Inaba
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1726)
AUTHORS Dinh Duy,K.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (14-JUL-2003) Dinh Duy K., Molecular Microbiology Lab,
Institute of Biotechnology, NCST, 18, Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, 10000, VIET NAM

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1726
/organism="Vibrio cholerae"
/mol_type="genomic DNA"
/serotype="Inaba"
/db_xref="taxon:666"
gene 257..1726
/ gene="hlyA"
CDS 257..>1726
/ gene="hlyA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hemolysin A"
/protein_id="CAE11224.1"
/db_xref="GI:32698438"

/translation="MPKLNRCIAIAIFTILSAISSPTLLANINEPSGEAADIISQVADS
HAIKYNAADWQAEDNALPSLAELRDLVINQQKRVLVDFSQISDAEGQAEMQAQFRKA
YGVGFANQFIVITEHKGELLFTPFDAQEEVDPPQLLEAPRTARLLARSGFASPAPANSE
TNTLPHVAFYISVNRAISDEECTFNNSWLWKNEKGSRPFCCKDANISLIYRVNLERSLQ
YGLVGSATPDAKIVRISLDDSTGAGIHLNDQLGYRQFGASYTTLDAYFREWSTDAIA
QDYRFVFNASNKAQILKTFPVDNINEKFERKEVSGFELGVTGGVEVSGDGPKAKLEA
RASYSQSRWLTYNTQDYRIERNAKNAQAVSFTWNRQQYATAESLLNRSTDALWVNTYP
VDVNRISPLSYASFVPKMDVIYKASATETGSTDFIIDSSVNIRPIYNGAYKHYYVVG
HQSYPHFEDTPRRRITKSASFVVDWDHPVFTGGRPVNLQL"

BASE COUNT 497 a 371 c 404 g 454 t
ORIGIN
1 ccgtagcagt aaagccacac gcaaaactcaa ggatgacgag ggtaacccat gagacacatg
61 caaaatgggt atgttctaata tacttgaaaa tataagaata ttactcaact cagaattata
121 gaagagagtt tattagcaac tattaatttg agtgtttgat atatttcttg ttttttcagt
181 !
agtttgag
ta taagtcactt tgtttgaaa tctctcttgt aataacacta aaaataacag
241 agtcagttag gtttatatgc caaaactcaa tcgttgcgca atcgcgatat tcacaatatt
301 aagcgcaata tccagtcacaa ccotgttggc aaatatcaat gaaccaagtg gtgaagcggc
361 ggatattatt agtcaagtcg ctgatagtcg tgcaataaaa tattacaatg ctgctgattg
421 gcaagccgaa gacaacgcac taccgagctt agctgagctg cgcgatttgg tgattaacca
481 gcaaaaacgc gttttggttg atttcagtcg gatcagtgat gctgaaggtc aagcagagat
541 gcaagcccaa ttcagaaaagg cttatggggt gggttttgct aatcaattta ttgtcatcac
601 tgaacataaa ggggaactgc tgtttacacc ttttgatcag gcagaagagg ttgacctca
661 attactcgaa gcgcgcgcta ccgctcgctt attagcgcgc tctggttttg caagtcgggc
721 accggcaaac agcgaaacaa ataccttgcc gcatgtggct ttttacatca gtgtcaaccg

```

781 tgcgatcagc gatgaagagt gtacctttaa caactcttgg ttgtggaaaa acgaaaaggg
841 cagtcgtccc ttctgtaaag atgccaatat ctgcttgatt tatcgagtta acctagagcg
901 ttcattgcaa tacggccttg tgggttcgcg gagaccggat gccaaaattg tgcgtatcag
961 cctagatgat gacagcacgg gagccggcat tcatctgaat gatcaactcg gttatcgta
1021 gtttggagcc agttatacga cgttatagtc ctatttccgt gagtgggtcaa ccgatgcgat
1081 tgcccaagat tatcgcttcg tgtttaacgc atcgaacaat aaagcgcaga tctgaaaac
1141 ctttctgtgc gataacatta acgagaaatt tgagcgcaaa gaggtttcag gttttgag!

ct
1201 tgggggtgact ggtgggggtg aagtcagtgg agatggcccg aaagccaaac tagaggcgag
1261 agcaagttat acccagagtc gctggttaac ctacaacaca caagactatc gtattgagcg
1321 taatgcgaag aatgcgcaag cggttagctt tacatggaat cgtcaacaat acgcgacagc
1381 agaatcgcta ctcaatcggt cgaccgatgc tttgtgggtg aatacctacc cggtagatgt
1441 aaaccgtatt agcccgtgta gctacgcgag ttttgtgccg aaaatggatg tgatttataa
1501 agcctcagcc acagagacag gcagtacgga ttttatcatc gactcttcgg tcaatatccg
1561 cccaatctat aacgggtgctt ataagcacta ctatgtggtc ggtgctcatc agtcctacca
1621 tggctttgaa gatacccccac gtcgtcgaat caccgaaatcg gcaagcttta cggtcgattg
1681 ggatcaccca gtattcacgg gtggcgcgcc ggtcaaccta caactt

```

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

1: AJ575590. *Vibrio cholerae* t...[gi:32693318]

[Links](#)

LOCUS	AJ575590	1324 bp	DNA	linear	BCT 14-JUL-2003
DEFINITION	Vibrio cholerae toxA gene for enterotoxin subunit A.				
ACCESSION	AJ575590				
VERSION	AJ575590.1 GI:32693318				
KEYWORDS	enterotoxin subunit A; toxA gene.				
SOURCE	Vibrio cholerae				
ORGANISM	Vibrio cholerae				
	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio.				
REFERENCE	1				
AUTHORS	Ha Thi,Q., Trinh Quy,B., Bach Thi,Q.N., Phung Dac,C., Do Ngoc,K.				
	and Dinh Duy,K.				
TITLE	Cloning of the gene coding for enterotoxin subunit A from Vibrio cholerae serotype Inaba				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1324)				
AUTHORS	Dinh Duy,K.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (11-JUL-2003) Dinh Duy K., Molecular Microbiology Lab,				
	Institute of Biotechnology, NCST, 18, Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, 10000, VIET NAM				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..1324				
	/organism="Vibrio cholerae"				
	/m				
ol_type="genomic DNA"	/serotype="Inaba"				
	/db_xref="taxon:666"				
gene	176..952				
	/gene="toxA"				
CDS	176..952				
	/gene="toxA"				
	/codon_start=1				

/transl_table=11
/product="enterotoxin subunit A"
/protein_id="CAE11218.1"
/db_xref="GI:32693319"

/translation="MVKIIFVFFIFLSSFSYANDDKLYRADSRPPDEIKQSGGLMPRG

QSEYFDRGTQMNNINLYDHARGTQTGFVRHDDGYVSTISLSRAHLVGQTILSGHSTYY

IYVIATAPNMFNVNDVLGAYSPHPDEQEVSA LGGIPYSQIYGWYRVHFGVLDEQLHRN

RGYRDRYYSNLNIAPAADGFGLAGFPPEHKT LREDPWIIHPPPGCGNAPRSSMSNTCD
EKPQSLGVKFLDEYQSKVKRQIFSGYPSDIDTHNRIKDEL"

BASE COUNT 443 a 204 c 263 g 414 t
ORIGIN

1 ggctgtgggt agaagtgaac cgggggtttac cgataaaaac agagaatgat aaaaaaggac
61 taaatagtat attttgattt ttgatttttg atttttgatt tcaaataata caaatttatt
121 tacttattta attgttttga tcaattattt ttctgttaaa caaagggagc attatatggt
181 aaagataata tttgtgtttt ttattttctt atcatcattt tcatatgcaa atgatgataa
241 gttatatcgg gcagattcta gacctcctga tgaaataaag cagtcagggtg gtcttatgcc
301 aagaggacag agtgagtact ttgaccgagg tactcaaag aatatcaacc tttatgatca
361 tgcaagagga actcagacgg gatttggttag gcacgatgat ggatatgttt ccacctcaat

421 tagtttgaga agtgcccact tagtgggtca aactatatgt tctggtcatt ctacttatta
481 tatatatggt atagccactg caccacaat gtttaacgtt aatgatgtat taggggcata
541 cagtcctcat ccagatgaac aagaagtttc tgcttttaggt gggattccat actcccaaat
601 atatggatgg tatcgagttc attttggggg gcttgatgaa caattacatc gtaatagggg
661 ctacagagat agatattaca gtaacttaaa tattgctcca gcagcagatg gttttggatt
721 ggcagggttc cctccggagc ataaaacctt gaggggaagc ccgtggatcc atcatccgcc
781 cccgggggtg gggaatgctc caagatcatc gatgagtaat acttgcgatg aaaaacccca
841 aagtctagggt gtaaaattcc ttgacgaata ccaatctaaa gtaaaaagac aaatattttc
901 aggcatacca tctgatattg atacacataa tagaattaag gatgaattat gattaaatta
961 aaatttggtg ttttttttac agtttttacta tcttcagcat atgcacatgg aacacctcaa
1021 aatattactg atttgtgtgc agaataccac aacacacaaa tacatacgct aaatgataag
1081 atattttcgt atacagaatc tctagctgga aaaagagaga tggctatcat tacttttaag
1141 aatggtgcaa tttttcaagt agaagtacca ggtagtcaac atatagattc acaaaaaaaaa
1201 gcgattgaaa ggatgaagga taccctgagg attgcatatc ttactgaagc taaagtcgaa
1261 aagttatgtg tatggaataa taaaacgcct catgcgattg ccgcaattag tatggcaaat
1321 taag

//

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH