

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**



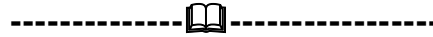
PHẠM THẾ VŨ

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG MỘT SỐ KỸ THUẬT
CHẨN ĐOÁN NHANH *VIBRIO CHOLERA*E GÂY DỊCH
TIÊU CHẢY CẤP TẠI TỈNH THÁI NGUYÊN NĂM 2008**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2009

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**



PHẠM THẾ VŨ

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG MỘT SỐ KỸ THUẬT
CHẨN ĐOÁN NHANH *VIBRIO CHOLERA*E GÂY DỊCH
TIÊU CHẢY CẤP TẠI TỈNH THÁI NGUYÊN NĂM 2008**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60.42.30

GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. LƯU THỊ KIM THANH

THÁI NGUYÊN - 2009

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác.

Tác giả

Phạm Thế Vũ

Lời cảm ơn

Để hoàn thành luận văn này tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thầy cô: Khoa Sau đại học, Khoa sinh - KTNN Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương, Viện Khoa học – Công nghệ Việt Nam.

- TS. Lưu Thị Kim Thanh đã tận tình hướng dẫn giúp đỡ giao đề tài, trực tiếp hướng dẫn tôi hoàn thành luận văn này.

- Bs. Nguyễn Lê Minh giám đốc Trung tâm Y tế Dự phòng Thái Nguyên đã giúp đỡ động viên và tạo mọi điều kiện cho tôi về tinh thần cũng như vật chất trong quá trình học tập.

- NCVC.Ts. Nghiêm Ngọc Minh Viện Khoa học Công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ trong quá trình thực hiện luận văn

Tôi xin cảm ơn tới :

- Cán bộ khoa xét nghiệm Trung tâm Y tế Dự phòng Thái Nguyên, đặc biệt nhóm cán bộ xét nghiệm vi sinh đã không quản ngày, đêm cũng như các ngày nghỉ giúp đỡ tôi thu thập mẫu bệnh phẩm, phân lập vi khuẩn tả, pha chế các loại môi trường, xử lý sầy hấp dụng cụ ...

- Các Bác sỹ, kỹ thuật viên khoa lây, khoa xét nghiệm của các bệnh viện trực thuộc tỉnh Thái Nguyên (Bệnh viện Đa khoa Trung Ương, Bệnh viện A, Bệnh viện C, Bệnh viện Gang thép, Trung tâm y tế các huyện thành) đã cùng tham gia thu thập mẫu khi có bệnh nhân nhập viện.

Thái nguyên, ngày 30 tháng 9 năm 2009

Tác giả

Phạm thế Vũ

MỤC LỤC

	Trang
ĐẶT VẤN ĐỀ	
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	3
3. Những đóng góp mới của đề tài	3
4. Giới hạn nghiên cứu	3
5. Cấu trúc của luận văn	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
1.1. Tình hình dịch tả trên thế giới và Việt Nam	4
1.1.1. Tình hình dịch tả trên Thế giới	4
1.1.2. Tình hình bệnh tả ở Việt Nam	8
1.2. Căn nguyên gây bệnh	11
1.2.1. Ổ chứa và nguồn bệnh	11
1.2.2. Tác nhân gây bệnh	11
1.2.3. Phương thức lây truyền	12
1.2.4. Tính cảm nhiễm	13
1.2.5. Diễn biến bệnh	13
1.2.6. Kháng nguyên và cấu trúc lớp vi khuẩn	14
1.2.7. Độc tố của vi khuẩn tả	16
1.2.8. Một số phương pháp phát hiện <i>Vibrio cholerae</i> trong phòng thí nghiệm	18

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	
2.1. Địa điểm, thời gian nghiên cứu	19
2.2. Nguyên liệu nghiên cứu	19
2.3. Hóa chất thiết bị	20
2.4. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	21
2.4.1. Đối tượng nghiên cứu	21
2.4.2. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu	21
2.4.3. Phương pháp nghiên cứu	22
2.4.3.1. Các kỹ thuật lấy mẫu và vận chuyển bệnh phẩm	22
2.4.3.2. Các phương pháp chẩn đoán <i>Vibrio cholerae</i>	24
2.4.3.3. Tiêu chuẩn đánh giá <i>Vibrio cholerae</i> dương tính trong nghiên cứu	27
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN	
3.1. Đặc điểm chung của các đối tượng nghiên cứu	29
3.1.1. Phân bố đối tượng nghiên cứu theo giới, tuổi	29
3.1.2. Phân bố lấy mẫu bệnh phẩm theo địa điểm lấy mẫu	33
3.2. Đánh giá phương pháp nghiên cứu phát hiện <i>Vibrio cholerae</i> O1	35
3.2.1. Nhận biết vi khuẩn di động bằng kỹ thuật soi tươi	34
3.2.2. Nhận biết hình thể và tính chất bắt màu của vi khuẩn bằng kỹ thuật nhuộm Gram	37
3.2.3. Phát hiện <i>Vibrio cholerae</i> bằng kỹ thuật nuôi cấy	38
3.2.4. Nhận biết <i>Vibrio cholerae</i> bằng phương pháp test nhanh	52

3.2.5. Chẩn đoán <i>Vibrio cholerae</i> bằng kỹ thuật PCR	54
3.3. Đánh giá các kỹ thuật chẩn đoán <i>Vibrio cholerae</i> O1	
3.3.1. Kỹ thuật soi tươi với kháng huyết thanh đặc hiệu	56
3.3.2. Kỹ thuật soi tươi và kỹ thuật nhuộm Gram	57
3.3.3. Kỹ thuật soi tươi với kỹ thuật nuôi cấy	58
3.3.4. Kỹ thuật nhuộm Gram với kỹ thuật nuôi cấy	58
3.3.5. Phương pháp test nhanh với kỹ thuật nuôi cấy	59
3.3.6. Kỹ thuật nuôi cấy với phương pháp PCR	60
3.4. Tổng hợp kết quả các phương pháp và thời gian	61
KẾT LUẬN	66
ĐỀ NGHỊ	68
TÀI LIỆU THAM KHẢO	69

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN

CT	Cholerae Toxi (Độc tố tả)
RNA	Acid deroxy ribonucleic
DNA	Acid deoxy nucleic
E.coli	Escherichia coli (Vi khuẩn Ecoli)
KIA	Kligler Iron Agar (Môi trường song đường)
N.A.G	Non Agglutinable Vibrios
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phát hiện độc tố <i>V.cholerae</i>)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
TCBS	Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (Môi trường chọn lọc nuôi cấy vi khuẩn tả)
<i>V.cholerae</i>	<i>Vibriocholerae</i> (Vi khuẩn tả)

DANH MỤC CÁC BẢNG

1	Bảng 1.1	Tình hình dịch tả ở Việt Nam từ tháng 10/2007 đến tháng 5/2008	9
2	Bảng 1.2	Phân lập <i>V.cholerae</i> typ cổ điển và typ Eltor	15
3	Bảng 2.1	Danh mục một số dụng cụ, hóa chất	20
4	Bảng 3.1	Phân bố đối tượng nghiên cứu theo giới, tuổi	29
5	Bảng 3.2	Tỷ lệ bệnh nhân theo tuổi	31
6	Bảng 3.3	Phân bố bệnh nhân dương tính <i>Vibrio cholerae</i> theo giới tính	33
7	Bảng 3.4	Tỷ lệ thu thập mẫu các địa điểm nghiên cứu	34
8	Bảng 3.5	Tỷ lệ vi khuẩn di động quan sát trên lam kính	36
9	Bảng 3.6	Tỷ lệ vi khuẩn Gram âm quan sát dưới kính hiển vi	37
10	Bảng 3.7	Phân đánh giá chung trong việc xác định các vi khuẩn	38
11	Bảng 3.8	Tỷ lệ <i>Vbri</i> <i>cholerae</i> dương tính bằng kỹ thuật nuôi cấy	39
12	Bảng 3.9	Nhận xét tính chất khuẩn lạc trên môi trường TCBS	41
13	Bảng 3.10	Nhận xét tính chất khuẩn lạc trên môi trường thạch kiềm	43
14	Bảng 3.11	Thời gian mọc khuẩn lạc trên 2 loại môi trường nuôi cấy	44
15	Bảng 3.12	Bảng đọc kết quả trên môi trường sinh vật hóa học	45
16	Bảng 3.13	Phản ứng Oxidase	47
17	Bảng 3.14	Đặc điểm nuôi cấy trên môi trường peptone kiềm	49

18	Bảng 3.15	Phân biệt vi khuẩn tả với các phẩy khuẩn khác thuộc nhóm N.A.G trên 3 loại đường	51
19	Bảng 3.16	Kết quả ngưng kết kháng huyết thanh đa giá và đơn giá	52
20	Bảng 3.17	Phát hiện <i>Vibrio cholerae</i> O1 bằng kỹ thuật test nhanh	54
21	Bảng 3.18	Tỷ lệ <i>Vibrio cholerae</i> O1 bằng kỹ thuật PCR	55
22	Bảng 3.19	Đánh giá kỹ thuật soi tươi với kháng huyết thanh đặc hiệu	57
23	Bảng 3.20	So sánh kỹ thuật soi tươi và kỹ thuật nhuộm Gram	57
24	Bảng 3.21	Bảng so sánh kỹ thuật soi tươi với kỹ thuật nuôi cấy	58
25	Bảng 3.22	Bảng so sánh kỹ thuật nhuộm Gram với kỹ thuật nuôi cấy	59
26	Bảng 3.23	Bảng so sánh phương pháp test nhanh với kỹ thuật nuôi cấy	59
27	Bảng 3.24	Đánh giá kết quả của phương pháp thử Oxidase với kỹ thuật soi tươi	60
28	Bảng 3.25	Bảng so sánh phương pháp nuôi cấy và PCR	61
29	Bảng 3.26	Tổng hợp kết quả các phương pháp và thời gian được áp dụng	61
30	Bảng 3.27	Một số phương pháp có thể áp dụng chẩn đoán nhanh <i>Vibrio cholerae</i>	62
31	Bảng 3.28	Bảng so sánh kỹ thuật nuôi cấy với (bảng 3.27)	64