

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN DUY HÀ

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA KỸ THUẬT PCR
PHÁT HIỆN TRỰC TIẾP MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
TRONG MẪU BỆNH PHẨM

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên – Năm 2011

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN DUY HÀ

**ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA KỸ THUẬT PCR
PHÁT HIỆN TRỰC TIẾP MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
TRONG MẪU BỆNH PHẨM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60.46.30

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. NGUYỄN ĐẮC TRUNG

Thái Nguyên – Năm 2011

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Đắc Trung – Phòng Xét nghiệm Vi sinh vật và Sinh học phân tử - Bộ môn Vi sinh – Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên, đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo tôi trong quá trình thực hiện đề tài này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô, kỹ thuật viên và nhân viên của Bộ môn Vi sinh – Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện về máy móc và cơ sở vật chất giúp tôi hoàn thành đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Ban Giám đốc, Phòng Kế hoạch Tổng hợp, các bác sỹ, kỹ thuật viên của Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Thái Nguyên đã cung cấp mẫu bệnh phẩm, hỗ trợ và giúp đỡ tôi hoàn thành một số thí nghiệm trong quá trình nghiên cứu.

Cùng với lòng biết ơn sâu sắc tôi xin gửi tới toàn thể các thầy cô giáo trong Khoa Sinh – KTNN, Khoa Sau Đại học – Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành đề tài nghiên cứu.

Cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp, người thân và gia đình đã động viên và giúp đỡ tôi rất nhiều.

Tôi xin chân thành cảm ơn !

Thái Nguyên, tháng 8 năm 2011

Học Viên

Nguyễn Duy Hà

LỜI CAM ĐOAN

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

Học Viên

Nguyễn Duy Hà

MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bìa	
Lời cảm ơn	
Lời cam đoan	
Mục lục	i
Danh mục các kí hiệu, các chữ viết tắt	iii
Danh mục các bảng	iv
Danh mục các hình vẽ	v
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh lao	3
1.2. Tình hình bệnh lao trên thế giới và ở Việt Nam	3
1.3. Đặc điểm của bệnh lao và đặc điểm của vi khuẩn lao	8
1.4. Các phương pháp chẩn đoán vi khuẩn lao và bệnh lao	16
1.4.1. Kỹ thuật soi kính trực tiếp	16
1.4.2. Kỹ thuật nuôi cấy	17
1.4.3. Kỹ thuật PCR	17
1.4.4. Kỹ thuật RFLP	17
1.4.5. Phương pháp ELISA	17
1.4.6. Miễn dịch tế bào	18
1.4.7. Miễn dịch dịch thể	18
1.5. Phương pháp PCR và các ứng dụng trong y học	19
1.5.1. Nguyên lý của kỹ thuật PCR	19
1.5.2. Thành phần phản ứng	19
1.5.3. Các ứng dụng của kỹ thuật PCR trong y học	20
1.5.4. Sự đa dạng trong quy trình kỹ thuật và trình tự nucleotide đặc hiệu được sử dụng để phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Đối tượng nghiên cứu	23
2.2. Dụng cụ và thiết bị xét nghiệm	23
2.3. Hóa chất xét nghiệm	23
2.4. Quy trình nghiên cứu	24
2.5. Phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu	25
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	33
3.1 Kết quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong các mẫu bệnh phẩm	33
3.1.1. Kết quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong bệnh phẩm đờm	33
3.1.2. Kết quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong bệnh phẩm dịch màng phổi	35
3.2. Hiệu quả của kỹ thuật PCR trong việc phát hiện nhanh vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37
3.2.1. Hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm	38
3.2.2. Hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi	40
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO	48
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Viết đầy đủ
AFB	Acid Fast Bacilli
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
BK	Bacille de Kock
Bp	Base pair
CTCLQG	Chương trình chống lao quốc gia
DRPQ	Dịch rửa phế quản
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GTDBDT	Giá trị dự báo dương tính
GTDBAT	Giá trị dự báo âm tính
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IgG	Immuno globin G
IS6110	Insert Sequence 6110
PCR	Polymerase Chain Reaction
Se	Sensitivity (độ nhạy)
Sp	Specificity (độ đặc hiệu)
TCYT TG	Tổ chức Y tế thế giới
WHO	World Health Organization

DANH MỤC BẢNG SỐ LIỆU	Trang
Bảng 1.1. Ước tính bệnh nhân lao mới mắc năm 2002 theo khu vực	5
Bảng 1.2. Số liệu ước tính bệnh lao của nước ta hàng năm	7
Bảng 2.1. Phân loại kết quả nhuộm soi	27
Bảng 2.2. Phân loại kết quả nuôi cấy	28
Bảng 2.3. Các thành phần phản ứng PCR	30
Bảng 3.1. Kết quả nhuộm soi phát hiện vi khuẩn AFB trong đờm	33
Bảng 3.2. Kết quả nuôi cấy phát hiện vi khuẩn <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm	33
Bảng 3.3. Kết quả PCR phát hiện vi khuẩn <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm	34
Bảng 3.4.. Kết quả nhuộm soi phát hiện vi khuẩn AFB trong dịch màng phổi	35
Bảng 3.5. Kết quả nuôi cấy phát hiện vi khuẩn <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi	35
Bảng 3.6. Kết quả PCR phát hiện vi khuẩn <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi	36
Bảng 3.7. Hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm bằng nhuộm soi so với nuôi cấy	38
Bảng 3.8. Hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm bằng PCR so với nuôi cấy	39
Bảng 3.9. Hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi bằng nhuộm soi so với nuôi cấy	40
Bảng 3.10. Hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi bằng PCR so với nuôi cấy	41
Bảng 3.11. So sánh hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm giữa phương pháp nhuộm soi và PCR	42
Bảng 3.12. So sánh hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi giữa phương pháp nhuộm soi và PCR	43

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH	Trang
Hình 1.1. Vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> soi dưới kính hiển vi	14
Hình 1.2. Khuẩn lạc vi khuẩn lao trên môi trường nuôi cấy	15
Hình 1.3. Cấu trúc thành vi khuẩn lao	15
Hình 2.1. Quy trình nghiên cứu	24
Hình 2.2. Sơ đồ chu trình nhiệt phản ứng PCR	30
Hình 3.1. So sánh kết quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm bằng 3 phương pháp	34
Hình 3.2. So sánh kết quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi bằng 3 phương pháp	36
Hình 3.3. So sánh hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong đờm giữa phương pháp nhuộm soi và PCR	42
Hình 3.4. So sánh hiệu quả phát hiện vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> trong dịch màng phổi giữa phương pháp nhuộm soi và PCR	43
Hình 3.5. Hình ảnh soi trên kính hiển vi quang học trực khuẩn lao AFB nhuộm bằng phương pháp Ziehl-Neelsen	44
Hình 3.6. Đặc điểm phát triển của vi khuẩn lao trên môi trường nuôi cấy Ogawa	45
Hình 3.7. Điện di đồ DNA trên gel agarose 1,0%	45

MỞ ĐẦU

Lao là một bệnh nhiễm khuẩn phổ biến ở người, số người mắc lao trong cộng đồng ngày càng tăng. Theo Tổ chức Y tế thế giới, năm 1994 có khoảng 1/3 dân số thế giới bị nhiễm lao. Mỗi năm có 30 triệu người nhiễm lao, mỗi giây có thêm 1 người nhiễm lao. Bệnh lao là bệnh gây tử vong hàng đầu ở người lớn, mỗi năm có 3 triệu người chết vì lao, đến năm 2020 có thêm 1 tỷ người nhiễm lao trong đó có khoảng 70 triệu người chết vì lao mà chủ yếu là lao phổi. Bệnh lao chủ yếu phát triển ở những nước nghèo, các nước đang phát triển, khoảng 95% số bệnh nhân lao và 98% số người chết do lao ở những nước có thu nhập vừa và thấp [8, 9, 10, 43].

Ở các nước đang phát triển, bệnh lao vẫn còn tồn tại trong cộng đồng do rất nhiều yếu tố: sự bùng nổ của đại dịch HIV/AIDS, tăng dân số không kìm hãm được, do sự phân cực, phân hóa giàu nghèo, hoạt động chưa hiệu quả của các chương trình phòng chống lao quốc gia. Việt Nam đứng thứ 12 trong số 22 nước có số bệnh nhân lao cao trên toàn cầu (WHO, 2008). Trong khu vực Tây-Thái Bình Dương, Việt Nam đứng thứ 3 sau Trung Quốc và Philippines về số lượng bệnh nhân lao lưu hành cũng như bệnh nhân lao xuất hiện thêm hàng năm.

Để làm giảm tỷ lệ mắc bệnh cũng như tỷ lệ tử vong do bệnh lao, một trong những biện pháp mà Tổ chức Y tế thế giới ưu tiên hàng đầu là đẩy mạnh việc phát hiện sớm các trường hợp mắc lao, điều trị kịp thời để loại bỏ nguồn lây, hạn chế tối đa sự lây nhiễm trong cộng đồng.

Bệnh lao là bệnh nhiễm khuẩn, tác nhân gây bệnh là trực khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*. Phát hiện và chẩn đoán lao quan trọng nhất chủ yếu dựa vào việc phát hiện trực khuẩn lao trong cơ thể hoặc trong chất xuất tiết của người bị bệnh lao. Tìm thấy trực khuẩn lao được coi là “**tiêu chuẩn vàng**” trong việc chẩn đoán bệnh lao. Hiện nay có một số phương pháp giúp chẩn đoán xác định hoặc hỗ trợ chẩn đoán xác định vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* gây bệnh lao như: nhuộm soi trực tiếp, nuôi cấy phân lập, tiêm truyền động vật cảm nhiễm, test tuberculin, ELISA,... [13, 23].