

**VIỆN HÀN LÂM KH&CN VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

-----***-----

LUẬN VĂN CAO HỌC

Mã số chuyên ngành: 60420103

Đề tài:

Nghiên cứu so sánh một số phương pháp phát hiện tác nhân gây bệnh than *Bacillus anthracis*

**Học viên: Lưu Anh Tú
Lớp: CHST _ K15
Hướng dẫn: PGS.TS Ngô Đình Bính**

Hà Nội, 2013

Lời cảm ơn

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Ngô Đình Bình là người thầy đã hướng cho tôi những ý tưởng khoa học, tận tình hướng dẫn, truyền đạt kiến thức, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn phòng tập thể phòng Di truyền Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học và bản luận án này.

Tôi xin cảm ơn tất cả các thầy cô giáo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã chia sẻ, động viên, giúp tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành tốt công việc nghiên cứu của mình.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bè bạn, những người luôn bên tôi, động viên, góp ý và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tác giả

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các đồng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực.

Hà Nội, ngày tháng năm 2013

Tác giả

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ATP	Acid Adenozin Triphosphate
<i>B. anthracis/ Ba</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
bp	base pair
CA	Casamino Acid
dH ₂ O	deion water
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EF	Edema Factor
FAO	Food Agricultural Organisation
h	giờ
kDa	Kilo Dalton
LB	Lauria Betani
LF	Lethal Factor
MPA	Meat Pepton Agar
MPB	Meat Pepton Broth
ORF	Open Reading Frame
PA	Protective Antigen
PCR	Polymerase Chains Reaction
SDS	Sodium Dodecylsulphate
TAE	Tris – Acetate EDTA

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây bệnh than đã được sử dụng như là một vũ khí sinh học nguy hiểm nhất trong lịch sử chiến tranh. Đặc biệt những năm gần đây những chủng vi khuẩn gây bệnh than đã cải biến gen được sử dụng trong khung bộ sinh học gây hoảng loạn trong cộng đồng dân cư trên thế giới. Vì vậy việc phát hiện nhanh, chính xác vi khuẩn gây bệnh than là rất cần thiết và cấp bách, giúp cho các bác sĩ và các nhà dịch tễ học có biện pháp ứng phó kịp thời, hạn chế thương vong và lây lan của dịch bệnh. Các phương pháp truyền thống dựa trên việc phân lập và xác định đặc điểm hình thái, tính chất nuôi cấy, đặc tính sinh lý, sinh hóa của các chủng đòi hỏi tốn thời gian và dễ xảy ra nhầm lẫn dẫn đến tình trạng mất nhiều thời gian để phát hiện được người bệnh đang bị nhiễm bệnh than. Ngoài ra, hiện nay ở Việt Nam chưa có biện pháp nào đánh giá mức độ sản sinh kháng thể kháng bệnh than ở người cũng như ở động vật. Dựa trên các kết quả nghiên cứu trước đây về việc phát hiện nhanh tác nhân gây bệnh than bằng kỹ thuật sinh học phân tử cũng như việc tách dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên bảo vệ PA, chúng tôi đã thực hiện đề tài “**Nghiên cứu so sánh phương pháp phát hiện tác nhân gây bệnh than *Bacillus anthracis***” dựa trên nguyên lý miễn dịch học. Các phương pháp mới này nhằm khắc phục những hạn chế của những phương pháp trước đây đồng thời cung cấp thêm công cụ trong việc đánh giá tình trạng nhiễm bệnh than.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Tìm được phương pháp phát hiện tác nhân gây bệnh than *Bacillus anthracis* nhanh, chính xác và phù hợp với điều kiện Việt Nam.

3. Nội dung nghiên cứu

1. Nghiên cứu biểu hiện gen *pagA* trong *Escherichia coli* BL21
2. Nghiên cứu sự đáp ứng miễn dịch của protein PA tái tổ hợp trên động vật thí nghiệm.

3. Thu nhận huyết thanh thử nghiệm và kiểm tra khả năng đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp Western Blot.
4. Nghiên cứu chế tạo kit ELISA phát hiện vi khuẩn *Ba* và tác nhân gây bệnh than.
5. So sánh các phương pháp phát hiện tác nhân gây bệnh than.
6. Xây dựng Kit ELISA phát hiện tác nhân gây bệnh than vi khuẩn *Ba*.
7. Thử nghiệm Kit ELISA với huyết thanh bệnh nhân.

PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh than và các dạng bệnh than

Bệnh than thường xuất hiện ở các loài động vật hoang dã cũng như động vật nuôi, đặc biệt là các loại gia súc ăn cỏ như trâu, bò, cừu, ngựa, dê... do chúng hít phải hoặc nhiễm phải bào tử than trong đất. Ở người, nguy cơ mắc bệnh than là do tiếp xúc với động vật ăn cỏ. Các loài khác như bò sát, lưỡng cư cũng bị nhiễm bệnh than nhưng ở các mức độ khác nhau [24].

Bệnh than có thể nhiễm vào cơ thể vật chủ theo ba con đường: qua da, qua đường tiêu hoá và đường hô hấp. Bệnh có thể biến chứng thành thể than màng não nếu hít vào bào tử than. Tùy theo cách thức lây nhiễm mà người ta chia bệnh than thành 4 thể than khác nhau: than da, than tiêu hoá, than hô hấp, than màng não [32].

1.1.1. Bệnh than thể da

Đây là hình thức phổ biến nhất chiếm hơn 95 % và là loại bệnh có khả năng điều trị. Bệnh thường gặp ở những nhóm đối tượng có nguy cơ lây nhiễm cao, thường xuyên tiếp xúc với động vật và các sản phẩm từ gia súc đã bị nhiễm VK than, thường là những người nông dân, bác sĩ thú y, người giết mổ gia súc, người buôn bán gia súc hay thịt, ... Từ các vết thương hở trên da, vi khuẩn hay bào tử *B. anthracis* có thể xâm nhập vào (Hình 1.1).

Triệu chứng của bệnh: Sau 1 - 2 ngày đầu thấy xuất hiện các vết sẩn ngứa như côn trùng đốt, dần dần xuất hiện các dấu hiệu hoại tử trong vùng tâm. Sau 2- 3 ngày sẽ xuất hiện các mụn nhỏ hay nốt nhú tại vị trí nhiễm, xung quanh xuất hiện các mụn nước. Vài ngày sau tại vùng trung tâm vết loét sẽ xuất hiện các nốt đen, khô và bắt đầu bong vảy.

Trong khoảng 1-2 tuần kể từ khi nhiễm bệnh sẽ xuất hiện các mụn và các hiện tượng đau nhức, mệt mỏi, sốt, bạch cầu tăng, các hạch bạch huyết tăng lên. Sau đó vùng thương tổn sẽ chuyển sang dạng tự phát. Nếu bệnh nặng thêm vết loét sẽ lan rộng và ăn sâu làm nhiễm trùng máu dẫn đến

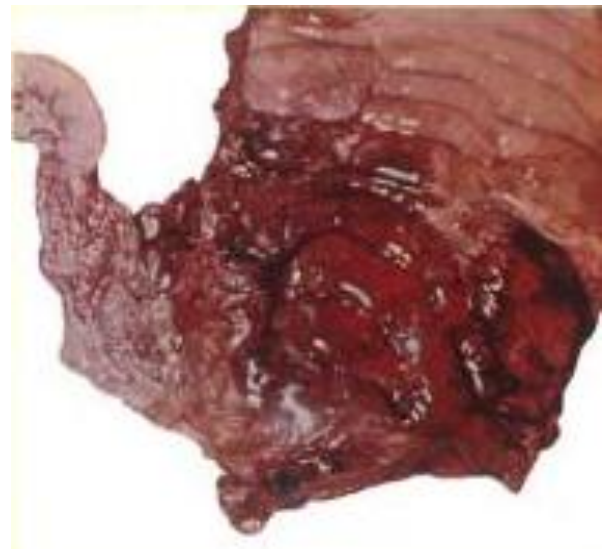
không thể chữa khỏi. Than da gây tử vong khoảng 20 % các trường hợp không được điều trị [36].



Hình 1.1. Bệnh than thể da

1.1.2. Bệnh than thể tiêu hoá

Nguyên nhân của bệnh than tiêu hoá là do ăn phải thịt gia súc đã bị nhiễm bào tử than mà không được nấu chín, thậm chí cả khi được nấu chín thì khả năng gây bệnh vẫn cao. Người ta tìm thấy vi khuẩn than trong dịch ruột của bệnh nhân mắc bệnh than. Đầu tiên vi khuẩn sẽ tấn công vào những vị trí thương tổn của màng nhày ruột và dạ dày. Từ những vị trí này sẽ xuất hiện những vết loét, lan rộng và lan vào hệ bạch huyết. Bệnh than tiêu hoá thường ít gặp nhưng lại có tỉ lệ tử vong khá cao. Bệnh thường có hai thể lâm sàng [8, 32, 36] (Hình 1.2):



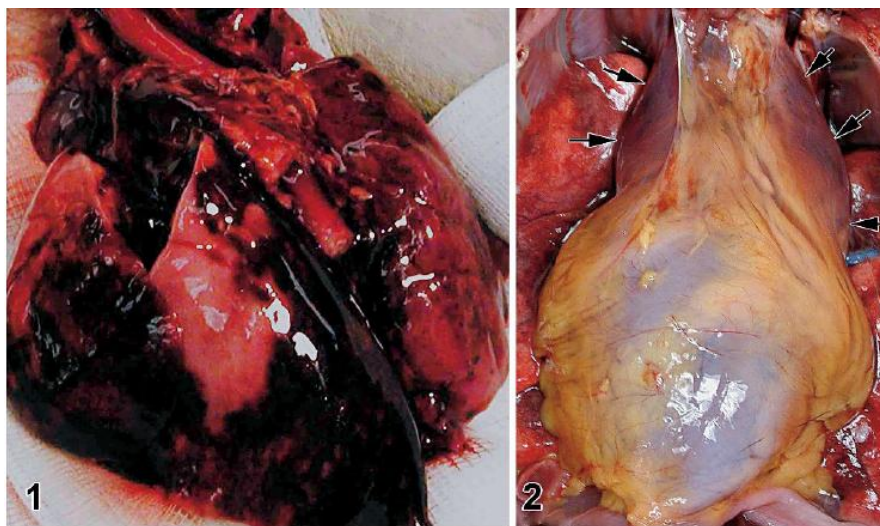
Hình 1.2. Manh tràng của bệnh nhân nhiễm than đường tiêu hóa

Thể bụng: dấu hiệu đầu tiên và rất dễ nhận biết là có thương tổn xuất huyết hoại tử ở manh tràng và các vùng lân cận. Triệu chứng ban đầu không đặc biệt với những cảm giác buồn nôn, biếng ăn, sốt. Sau đó là các triệu chứng đau bụng, tiêu chảy, sốc do nhiễm trùng và tử vong. Bệnh nhân có thể viêm phúc mạc hoặc viêm lá lách do vi khuẩn tấn công vào khu hạch bạch huyết. Sau 2-5 ngày kể từ khi xuất hiện dấu hiệu của bệnh sẽ gây tử vong.

Thể họng, miệng: tại vùng thương tổn thấy xuất huyết hoại tử ở vùng vòm họng, cổ họng cứng, sưng amidan. Bệnh nhân sốt cao, khó nuốt, hạch vùng cổ sưng to, nhiễm độc máu và đa số đều dẫn đến tử vong. Dạng than này có tỉ lệ tử vong cao chiếm 50 % mặc dù có được điều trị.

1.1.3. Bệnh than hô hấp

Nguyên nhân gây than hô hấp là do hít phải bào tử than. Sau khi vào cơ thể, các bào tử than sẽ phát triển thành thể hoạt động và di chuyển tới các phế nang, hạch lympho phổi và trung thất gây xuất huyết hoại tử và phù thũng, làm trung thất giãn rộng ra cả hai bên làm bệnh nhân có cảm giác đau vùng ức, sốt cao. Các thương tổn xuất huyết và hoại tử lan đến màng phổi gây tràn máu màng phổi. Khí quản cũng bị ảnh hưởng với các triệu chứng như ho khan, co thắt, vùng phổi bị phù. Vi khuẩn sẽ theo đường máu lan đến phần dưới niêm mạc của ống tiêu hoá và tạo nên các vết loét ở thành ruột làm bệnh nhân nôn ra máu, tiêu hoá ta máu hoặc cả hai triệu chứng trên. Một số nang lympho của đường tiêu hoá cũng bị phù và xung huyết, nếu bệnh nặng hơn có thể biến chứng sang thể màng não gây xuất huyết. Đa số bệnh nhân đều tử vong trong khoảng 1 - 2 ngày kể từ khi phát bệnh. Tỉ lệ tử vong của thể than này rất cao [61,76] (Hình 1.3).



Hình 1.3. Phổi (1) và trung thất (2) của khỉ nhiễm than đường hô hấp

1.1.4. Bệnh than thể màng não

Bệnh thường do biến chứng từ ba thể than trên. Than màng não xuất hiện khi vi khuẩn *B. anthracis* tấn công vào hệ thống thần kinh trung ương theo đường máu và các mạch bạch huyết. Triệu chứng của bệnh thường là sốt cao, mệt mỏi, đau cơ, đau đầu, buồn nôn, lên cơn mê sảng khi phát bệnh và dẫn đến hôn mê. Đa số bệnh thường dẫn đến tử vong sau 1-2 ngày kể từ khi mắc bệnh. Thể than này có tỉ lệ tử vong rất cao [32, 36] (Hình 1.4).



Hình 1.4. Não của khỉ nhiễm than thể màng não

1.2. Tác nhân gây bệnh than

1.2.1. Đặc điểm của vi khuẩn than (*Bacillus anthracis*)

Vi khuẩn *B. anthracis* thuộc nhóm I, chi *Bacillus*. Nó tồn tại trong đất, nước và không khí. Vi khuẩn *B. anthracis* là vi khuẩn gram dương, sinh bào tử (trong điều kiện kỵ khí hay kỵ khí bắt buộc), không có lông roi nên không có khả năng di động. Kích thước tế bào 3-5 μm , rộng 1-2 μm . Tế bào hình que, vuông đầu, sắp xếp với nhau thành chuỗi dài như sợi rơm hoặc chỉ vài tế bào nối với nhau [21, 32] (Hình 1.5).

Bào tử *B. anthracis* có hình elip, nằm ở trung tâm tế bào, nang bào tử không phòng. Kích thước khoảng 1-1,5 μm . Bào tử được hình thành vào thời kì cuối của pha sinh trưởng logarit [18] (Hình 1.5).

Khuẩn lạc *B. anthracis* có màu trắng sữa hoặc trắng xám tới xám, bề mặt sần sùi, dính ướt, đường kính 3-5 mm [4].

Điều kiện thích hợp cho *B. anthracis* phát triển là ở điều kiện nhiệt độ 28-32°C, pH = 7, thời gian nuôi cấy 3-5 ngày. Khi gặp điều kiện bất lợi, tế bào sinh dưỡng sẽ hình thành nội bào tử.