

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

PHẠM THỊ KIM NHUNG

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PCR ĐA MỒI VÀ CHẾ TẠO KÍT
QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM CHẨN ĐOÁN NEISSERIA
MENINGITIDIS, HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYP B,
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

Chuyên ngành: Động vật học (Vi sinh vật học)

Mã số: 60420103

LUẬN VĂN THẠC SĨ HỌC SINH HỌC

Hà Nội, 2015

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO
TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

PHẠM THỊ KIM NHUNG

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PCR ĐA MỒI VÀ
CHẾ TẠO KÍT QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM CHẨN
ĐOÁN NEISSERIA MENINGITIDIS, HAEMOPHILUS
INFLUENZAE TYP B, STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

Chuyên ngành: Động vật học (Vi sinh vật học)

Mã số: 60420103

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Đoàn Trọng Tuyên

Hà Nội, 2015

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm màng não là một bệnh lý nhiễm trùng nghiêm trọng, tỷ lệ tử vong cao nếu không được nghĩ đến, chẩn đoán và điều trị kịp thời. Viêm màng não do vi khuẩn là bệnh nhiễm trùng hệ thần kinh trung ương cấp tính với biểu hiện lâm sàng rất đa dạng như: hội chứng màng não rầm rộ, sốt cao, dịch não tủy đục mủ, nhiễm khuẩn huyết... Bệnh diễn biến nặng, nếu không được chẩn đoán, điều trị kịp thời có thể tử vong hoặc để lại di chứng nặng nề như: hội chứng màng não, điếc, câm, mù, rối loạn tâm thần, động kinh...[7]. Bệnh hay gây thành dịch, nhất là những nơi tập trung đông người thì nguy cơ lây nhiễm là rất cao. Sự hiểu biết về các tác nhân gây bệnh thường gặp sẽ hỗ trợ cho công tác điều trị và xây dựng các chương trình phòng chống bệnh tật tại từng Quốc gia. Hầu hết những dữ liệu về dịch tễ của viêm màng não ở người lớn đều xuất phát từ những quốc gia đã phát triển, trong đó 4 tác nhân cũng là nguyên nhân quan trọng gây bệnh và tử vong trên thế giới: *Streptococcus pneumoniae* (phế cầu) 30 - 60%, *Neisseria meningitidis* (não mô cầu) 13 - 37%, *Listeria monocytogenes* và *Haemophilus influenzae* [34,18].

Những năm gần đây nhiều loại kháng sinh tốt đã được đưa vào sử dụng. Tuy nhiên tỷ lệ tử vong trung bình ở nhiều nước trong vùng dịch tễ do màng não cầu 7 – 10%, phế cầu 30%, do *Haemophilus influenzae* là 10 – 14% [7].

Tại Việt Nam, những nghiên cứu về viêm màng não do *H. influenza*, *S. pneumoniae* và *N. meningitidis* đối với người trưởng thành chưa nhiều, chủ yếu tập trung ở đối tượng trẻ em. Thời gian gần đây những nghiên cứu dịch tễ học được mở rộng trên các đối tượng, tuy nhiên chưa có thống kê cụ thể. Theo Lê Thanh Bình (Bệnh viện Trung ương Huế) từ 1999 – 2001 có 65 trường hợp tỷ lệ tử vong (9%), tỷ lệ di chứng 11%, nguyên nhân hàng đầu là *H. influenza* (35,3%), thứ đến là não mô cầu (18,4%), phế cầu (9,2%). Nghiên cứu của Phạm Nhật An và cộng sự năm 2001 tại Viện Nhi Trung ương với bệnh nhân từ 0 đến 15 tuổi được chẩn đoán là viêm màng não với tỷ lệ *H. influenzae* (50%), *S. pneumoniae* (22,06%), *N. meningitidis* (11,76%), *Streptococcus* (5,88%) và một số loại vi khuẩn khác.

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

Để chẩn đoán ca bệnh trước đây chủ yếu dựa vào triệu chứng lâm sàng, yếu tố dịch tễ, xét nghiệm bằng kỹ thuật nhuộm soi và nuôi cấy phân lập từ những mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Các kỹ thuật này có độ nhạy thấp, thời gian phân lập cần 48-72 giờ. Các kỹ thuật này không đáp ứng điều kiện chẩn đoán nhanh, điều trị kịp thời, vì diễn biến của ca bệnh xảy ra rất nhanh (đặc biệt là não mô cầu từ khi xuất hiện triệu chứng đầu tiên đến tử vong trung bình 18 giờ) [11].

Thử nghiệm ngưng kết hạt latex phát hiện kháng nguyên polysaccharide trong bệnh phẩm máu, dịch não tủy... của *H. influenza* là 78 – 100%, đối với *S. pneumoniae* là 67- 100% và *N. meningitidis* là 50 – 93%. Kỹ thuật này đơn giản, chẩn đoán nhanh hơn kỹ thuật nuôi cấy (<15 phút). Tuy nhiên, kỹ thuật ngưng kết latex đã xảy ra hiện tượng cho kết quả âm tính và dương tính giả [35], ngoài ra kỹ thuật này chỉ dùng trong phát hiện ca bệnh.

Trong những năm gần đây, kỹ thuật PCR đa môi (multiplex – PCR: mPCR) dần được cải tiến và phát triển. Với mục đích khắc phục những nhược điểm của các kỹ thuật trên và phát hiện cùng một lúc 3 tác nhân vi khuẩn trên cơ sở xác định các gene đặc hiệu, nhằm hỗ trợ công tác điều trị đạt hiệu quả cao, giảm giá thành, thời gian xét nghiệm, nâng cao chất lượng giám sát, tiên lượng nguy cơ bùng phát dịch trước, trong và sau vụ dịch, chúng tôi tiến hành: **“Nghiên cứu xây dựng qui trình PCR đa môi và chế tạo kit qui mô phòng thí nghiệm chẩn đoán *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* týp b, *Streptococcus pneumoniae*”**

Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành đề tài này với **mục tiêu:**

- Xây dựng qui trình mPCR1 phát hiện *N. meningitidis*; *H. influenzae* týp b và *S. pneumoniae*.
- Xây dựng qui trình mPCR2 phát hiện *N. meningitidis* nhóm huyết thanh A, B, C.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1. Tổng quan não mô cầu (*Neisseria meningitidis*)

1.1.1. Lịch sử

Viêm màng não do *Neisseria meningitidis* (não mô cầu) được Gaspard Vieusseux mô tả kỹ từ vụ dịch viêm màng não ở Geneve vào mùa xuân năm 1805, mặc dù từ thế kỷ thứ II trước công nguyên đã được đề cập. Năm 1884 Ettore Marchiafava và Angelo Celli lần đầu tiên quan sát được vi khuẩn trong tế bào ở dịch não tủy. Năm 1887 Anton Weichselbaum phân lập được vi khuẩn gây bệnh từ dịch não tủy của bệnh nhân và mô tả với cái tên là: *Diplococcus intracellularis meningitidis*. Sau đó, năm 1901 Albrecht và Ghon đã đổi thành *Neisseria meningitidis* để ghi công Albert Neisser – nhà khoa học người Đức[8,36].

1.1.2. Dịch tễ học

Dịch não mô cầu xảy ra tại các khu vực khác nhau trên thế giới. Tác nhân gây bệnh có thể thay đổi tùy theo vùng địa lý, mùa, thời gian và độ tuổi. Hầu hết nguyên nhân gây dịch ở Châu Phi là do nhóm huyết thanh A, mặc dầu vậy nhóm C, W135 và X cũng đã được ghi nhận (Greenwood, 2007). Ở Châu Âu và các vùng công nghiệp, nhóm B và C là nguyên nhân chính gây bệnh viêm màng não, trong đó nhóm B thường gây bệnh ở người dưới 20 tuổi. Năm 2007, tỷ lệ tử vong là 1/100.000 dân, cao hơn ở Ireland và UK là: 3,8/100.000 và 2,5/100.000 dân (CDC, 2009). Theo Rosenstein NE, Perkins BA và cộng sự (1999) thì nhóm A và C thường gây bệnh ở Châu Á và Châu Phi, nhóm C gây một số vụ dịch ở Canada, Mỹ (1992-1993) và Tây Ban Nha (1995-1997). Nhóm B gần đây gây dịch nhiều hơn ở Tân Tây Lan với 500 trường hợp hàng năm. Vụ dịch lớn ở Trung Quốc năm 1979 - 1980 bắt nguồn từ phía Bắc sau đó lan đến phía Nam nước này và lan ra toàn cầu và nguyên nhân là do não mô cầu nhóm A. Trong vài năm gần đây, nhiễm khuẩn não mô cầu do nhóm Y và W135 có chiều hướng tăng lên. Israel và Thụy điển cũng cung cấp các số liệu cho thấy sự gia tăng của nhóm Y. Theo CDC, tại Mỹ, các ca bệnh do nhóm W135 đã tăng từ 4% lên 20% trong vòng 3 năm từ 1978 đến 1980; đặc biệt nhóm W135 gây bệnh cho vài trăm người ở Ả-rập Saudi (2000-2001), gây dịch ở Burkina Faso (Châu Phi) làm chết hơn 1.500 người. Năm 1996, vụ dịch não

mô cầu lớn nhất trong lịch sử 100 năm đã xảy ra tại vùng ngoại ô Saharan - Châu Phi với 152.813 người mắc và 15.783 người chết.

Tại Việt Nam vào năm 1939-1940 ở miền Bắc, có một vụ dịch lớn nhiễm trùng huyết và viêm màng não do *N. meningitidis* lan từ Trung Quốc sang với số bệnh nhân lên tới 7.000 người [22]. Sau năm 1941, miền Bắc vẫn còn thấy một số vụ dịch nhỏ. Năm 1977 vụ dịch ở Thành phố Hồ Chí Minh có 1015 ca mắc, do *N. meningitidis* nhóm C gây ra [5]. Theo tác giả Bùi Đại (2009), các nhóm huyết thanh lưu hành tại Việt Nam chủ yếu là nhóm huyết thanh A, B, C. Tuy nhiên, năm 2011 ghi nhận 1 trường hợp nhiễm nhóm W135 và một trường hợp đồng nhiễm cả B và W135 tại Bắc Giang [9]. Giai đoạn từ 2001 – 2010, trung bình ghi nhận 650 trường hợp mắc bệnh mỗi năm, chủ yếu ở các tỉnh khu vực phía Bắc. Năm 2012 ghi nhận 125 trường hợp mắc. Đầu năm 2013 vẫn có các trường hợp mắc rải rác tại nhiều tỉnh, thành phố trong cả nước, nguy cơ lây lan trong cộng đồng là rất lớn [6]. Theo Bộ Y tế, trong 6 tháng đầu năm 2015 cả nước ghi nhận 24 ca bệnh viêm màng não do *N. meningitidis*, tăng 16 ca so với cùng kỳ năm ngoái. Trong đó riêng tháng 4, cả nước ghi nhận 11 ca viêm màng não do não mô cầu, 2 ca tử vong.

N. meningitidis cư trú tại vùng họng mũi của người và lây truyền theo các giọt nước nhỏ bài tiết qua đường hô hấp. Bệnh lây truyền trực tiếp do tiếp xúc gần hay gián tiếp qua trung gian đồ dùng chung bị nhiễm khuẩn của bệnh nhân. Con người là ký chủ tự nhiên duy nhất của não mô cầu, hiện nay chưa phát hiện có ký chủ hay vectơ truyền bệnh nào khác. Thời gian ủ bệnh thường không xác định được rõ và đã được ước tính trung bình từ 1 đến 10 ngày.

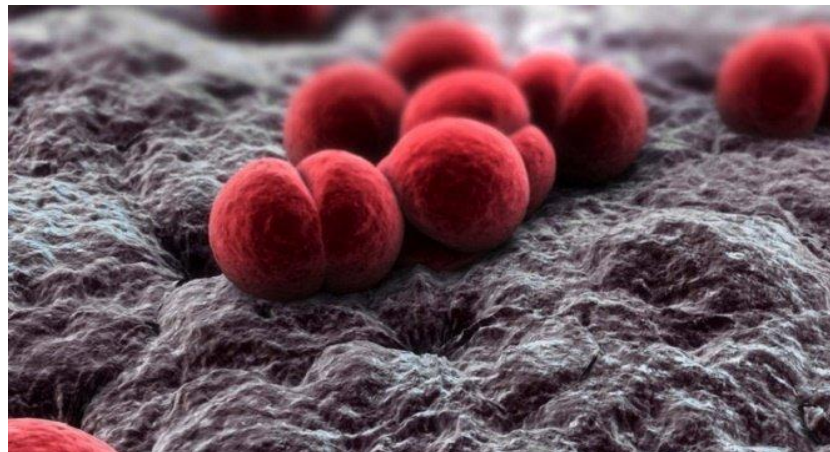
N. meningitidis có khả năng gây dịch lớn hoặc các trường hợp lẻ tẻ. Nhóm A thường gây bệnh dịch lớn, xảy ra theo chu kỳ khoảng 20 - 30 năm hoặc dịch nhỏ có chu kỳ 8 – 12 năm. Nhóm B và C thường gây các trường hợp riêng lẻ giữa thời gian có dịch lớn, tuy nhiên vẫn có khả năng gây thành dịch lớn. Nhóm Y chỉ gây dịch riêng lẻ trên trẻ em và thanh niên. Tuổi dễ mắc bệnh nhất là trẻ em từ 6 tháng đến 3 tuổi hoặc thanh thiếu niên từ 14 – 20 và tỷ lệ bệnh thấp ở người trên 20 tuổi. Tỷ lệ người lành mang vi khuẩn chiếm khoảng 5 – 15%, tuy nhiên tỷ lệ này có thể dao động và có mức độ cao hơn ở một số cộng đồng nhất định [5]. Bệnh thường xảy ra

ở nơi tập trung đông người (nhà trẻ, trường học, ký túc xá, doanh trại...), hay gặp vào mùa đông - xuân.

1.1.3. Đặc điểm sinh học

- **Hình thể**

N. meningitidis là cầu khuẩn Gram âm, kích thước thay đổi, có thể thấy ở dạng đơn độc hoặc song cầu hình hạt cà phê với hai mặt dẹt đối diện nhau, kích thước khoảng 0,8 - 1µm, đứng riêng rẽ từng đôi một hoặc nhiều đôi tụ thành đám và có thể nằm trong hoặc ngoài bạch cầu đa nhân. Trên tiêu bản nhuộm từ môi trường nuôi cấy, não mô cầu thường có hình thể đa dạng, to nhỏ khác nhau và cách sắp xếp không điển hình. Vi khuẩn ở trong bệnh phẩm dịch não tủy thường có vỏ, không di động, không sinh nha bào, bắt màu Gram (-), đa số các chủng đều có vỏ.



Hình 1.1: *N. meningitidis* dưới kính hiển vi điện tử. Nguồn: Internet.

- **Tính chất nuôi cấy**

N. meningitidis là loại vi khuẩn khó nuôi cấy, chỉ phát triển tốt ở môi trường giàu chất dinh dưỡng như thạch máu, chocolate và khí trường có 5 – 10% CO₂, nhiệt độ thích hợp cho phát triển là 37⁰C.

Trên môi trường thạch máu, khuẩn lạc tròn, nhẵn, lồi, óng ánh và có màu hơi xám. Sau 24 giờ nuôi cấy, khuẩn lạc có đường kính khoảng 1mm, không tan máu, để lâu khuẩn lạc có màu xám đục và có thể làm màu môi trường ở dưới vùng nuôi cấy vi khuẩn đậm.

Trên môi trường thạch chocolate, khuẩn lạc có dạng S, xám đục và óng ánh.



Hình 1.2: *N. meningitidis* trên môi trường thạch chocolate. Nguồn CDC.

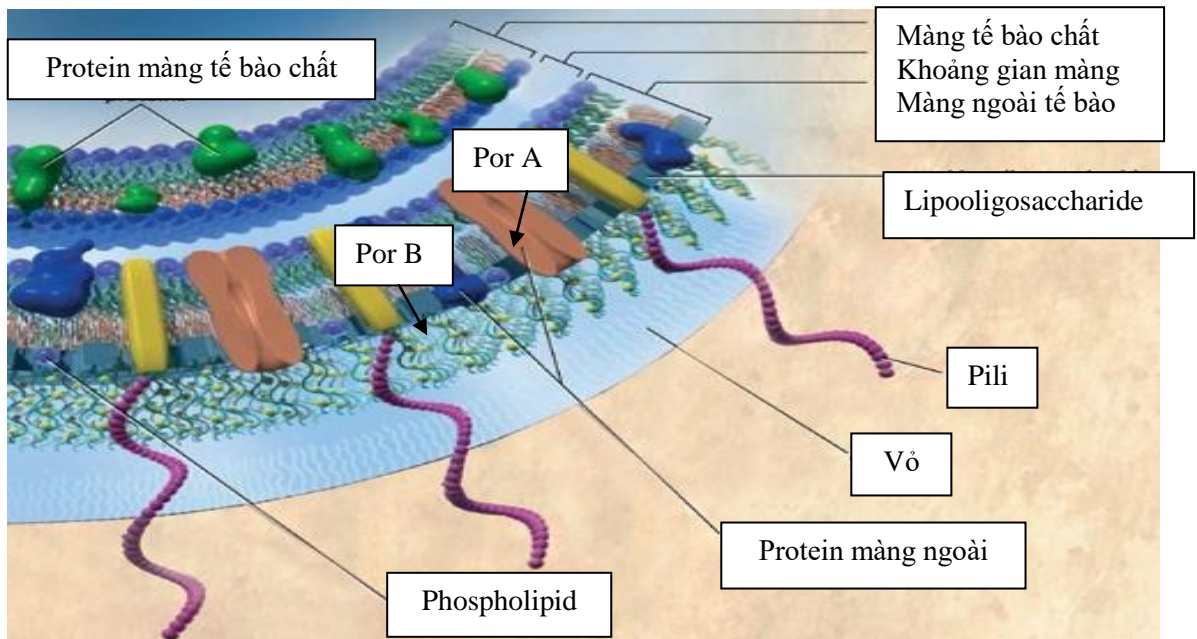


Hình 1.3: *N. meningitidis* trên môi trường thạch máu. Nguồn CDC.

- **Sức đề kháng**

Cầu khuẩn *N. meningitidis* có sức đề kháng yếu: chỉ sống được trong bệnh phẩm dịch não tủy 3 – 4 giờ sau khi ra khỏi cơ thể. Bị tiêu diệt ngay với tia cực tím, dung dịch chloramin 0,5 – 1% hoặc cồn 70⁰. Ở nhiệt độ 55⁰C/30 phút hoặc ở 60⁰C/10 phút não mô cầu cũng bị tiêu diệt. Không chịu được khô và ánh sáng. Các thuốc sát trùng thông thường dễ tiêu diệt cầu khuẩn màng não. Ngoài ra vi khuẩn dễ bị chết do men tự ly giải.

- **Cấu trúc kháng nguyên [5, 8,31,36]**



Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

Hình 1.4: Hình ảnh màng tế bào *N. meningitidis* cắt ngang.

Nguồn: Nancy E. Rosenstein và cộng sự (2001) [31].

- Lớp polysaccharide (PS) nang: là kháng nguyên vỏ, có tác dụng tạo kháng thể bảo vệ (ngoại trừ nhóm B). Căn cứ vào tính không đồng nhất về cấu trúc và tính kháng nguyên của PS người ta đã tìm được 13 nhóm huyết thanh của cầu khuẩn màng não bao gồm: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z. Nhóm A chứa mannosamine phosphate, trong khi đó nhóm B, C, Y, W135 chứa acid sialic - chất đóng vai trò quan trọng trong sự tồn tại và độc tính.

- Lớp lipo - oligosaccharide (LOS) – Endotoxin: Cấu tạo của LOS gồm 1 glycolipid màng ngoài nhưng thiếu các chuỗi O đặc trưng và hình thái “xù xì” (ráp) tương tự như của LPS. Nó bao gồm 3 thành phần chính: oligosaccharide nhân; lipid A kỵ nước (thành phần gây độc) và một chuỗi oligosaccharide nhánh có thể thay đổi (thành phần tạo miễn dịch). Tính không đồng nhất về cấu trúc và tạo miễn dịch của các chuỗi oligosaccharide nhánh (*lgtA*, *lgtC*, *lgtD* và *lgtG*), được sử dụng để phân loại các chủng thành 12 type miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng. Type miễn dịch L1 - L8 liên quan chi phối nhóm huyết thanh B, C; type miễn dịch L9 - L12 liên quan đến nhóm A. Màng ngoài chứa hơn 50% LOS, nó tương tự như polysaccharide của vi khuẩn Gram âm và chứa lipid A.

- Lớp protein của màng ngoài (Por A và Por B): đặc hiệu type huyết thanh (serotype) và phân type huyết thanh (serosubtype). Màng ngoài não mô cầu chứa một số protein màng ngoài chính (OMPs): chức năng của Por B (tên trước đây là protein lớp 2/3) và Por A (protein lớp 1) như porin, cho phép các chất dinh dưỡng đi vào. Hầu hết độ lớn các kháng nguyên bộc lộ trên bề mặt tế bào não mô cầu và độ lớn của kháng nguyên giữa các chủng là khác nhau, nên *N. meningitidis* được phân chia trên 20 serotype và serosubtype khác nhau chủ yếu ở nhóm B, C. Nhiều chủng phân lập không thể phân loại được là serotype hay serosubtype nào bằng kháng thể đơn dòng hiện tại. Cấu trúc kháng nguyên của type huyết thanh và phân type huyết thanh thay đổi *in vivo* một cách nhanh chóng trên một cá thể người và trong cộng đồng. Sự thay đổi này làm cho việc phát triển vắc xin mới là hết sức khó khăn.

Kháng nguyên X: kháng nguyên này chung với cầu khuẩn lậu cầu, phế cầu khuẩn. Kháng nguyên này được dùng trong một số kỹ thuật chẩn đoán huyết thanh.

1.1.4. Chẩn đoán [5]

a. Chẩn đoán ca bệnh lâm sàng

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

- Dựa vào yếu tố dịch tễ: Có tiếp xúc với bệnh nhân hoặc sống trong tập thể (nhà trẻ, trường học, ký túc xá, doanh trại...) có người đã được xác định bị mắc bệnh do não mô cầu.

- Dựa vào lâm sàng:

+ Thời kỳ ủ bệnh trung bình là 4 ngày (2-10 ngày).

+ Biểu hiện nhiễm trùng: Sốt cao đột ngột, ho, đau họng, mệt mỏi, nhức đầu... Tình trạng nhiễm trùng nhiễm độc nặng (sốc), có thể tử vong nhanh trong vòng 24 giờ

+ Dấu hiệu màng não - não: Đau đầu dữ dội, nôn, gáy cứng (trẻ nhỏ có thể có tiêu chảy, thóp phồng và gáy mềm), rối loạn ý thức, kích thích vật vã, có thể có co giật, hôn mê...

+ Ban xuất huyết hoại tử hình sao, xuất hiện sớm và lan nhanh.

b. Chẩn đoán xác định ca bệnh

- Là ca bệnh lâm sàng, có kèm theo xác định được vi khuẩn gây bệnh bằng một trong các xét nghiệm sau:

+ Soi thấy song cầu gram (-), cấy phân lập được *N. meningitidis* trong dịch não tủy.

+ Cấy máu phân lập được *N. meningitidis*.

+ Soi và cấy phân lập được *N. meningitidis* trong tử ban.

+ PCR (+) với *N. meningitidis* trong dịch não tủy, máu, tử ban.

• Kỹ thuật nhuộm soi

Bệnh phẩm là dịch não tủy (ly tâm lấy cặn nếu dịch não tủy trong) nhuộm gram, soi trên kính hiển vi thấy hình ảnh song cầu gram (-) nằm trong và ngoài tế bào.