

# CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN BỆNH NHIỄM VI KHUẨN

BS. Lê Thị Ánh Phúc Nhi  
BM Vi Sinh

# MỤC TIÊU

1. Trình bày các loại bệnh phẩm trong bệnh nhiễm khuẩn
2. Hiểu được nguyên lý các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh
3. Biện luận được kết quả xét nghiệm.

# NỘI DUNG

1. Các loại bệnh phẩm trong bệnh nhiễm khuẩn
2. Các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh
  - 2.1 Phương pháp vi sinh học
  - 2.2 Phương pháp miễn dịch học
  - 2.3 Phương pháp sinh học phân tử
  - 2.4 Phương pháp khối phổ (Mass spectrometry)

# CÁC LOẠI BỆNH PHẪM

Hệ cơ quan	Bệnh phẩm
Thần kinh	?
Hô hấp	?
Tim mạch	?
Tiêu hóa	?
Tiết niệu	?
Sinh dục	?
Cơ xương khớp	?

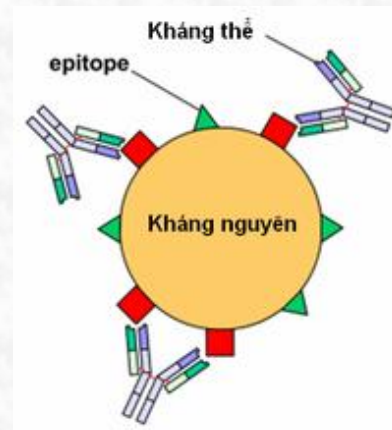




# CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM CHẨN ĐOÁN VI KHUẨN

Gồm:

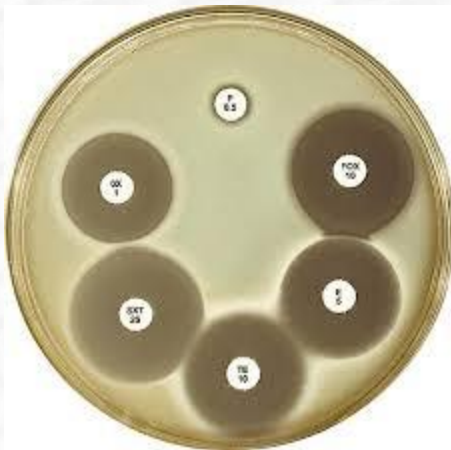
1. Phương pháp vi sinh học
2. Phương pháp miễn dịch học
3. Phương pháp sinh học phân tử
4. Phương pháp khối phổ (Mass spectrometry)



# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

Gồm:

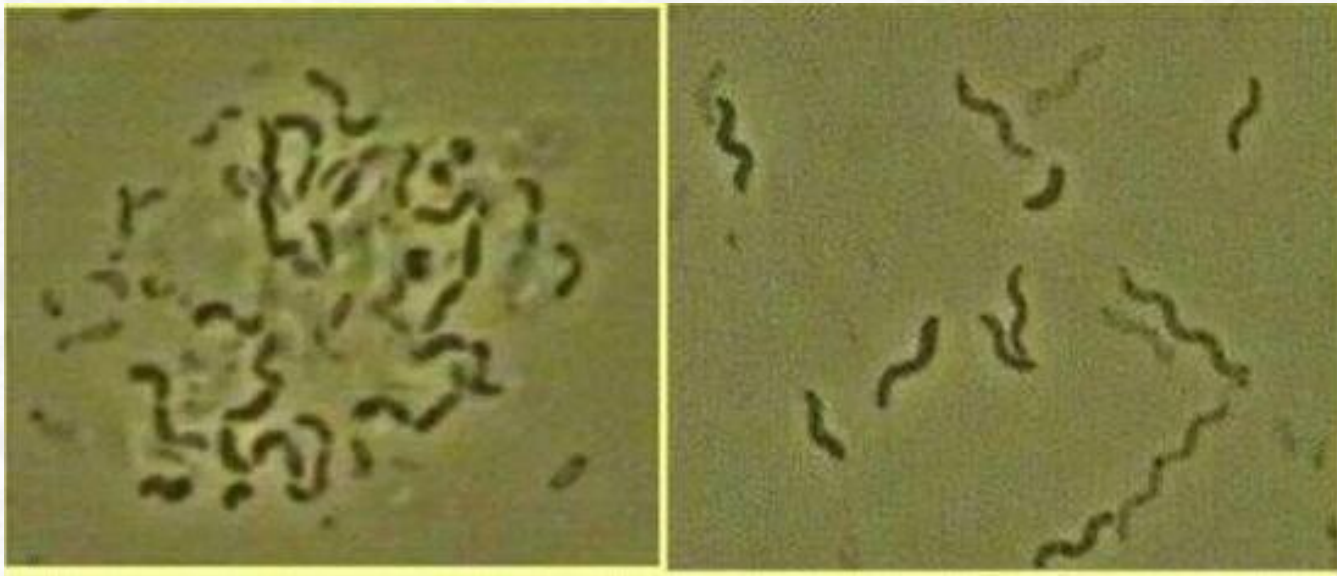
1. Soi, nhuộm
2. Nuôi cấy, định danh
3. Kháng sinh đồ



# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 1. SOI, NHUỘM

**1. Soi tươi:** phát hiện VK còn sống, di động  
VD: VK tả, giang mai, Leptospira,...





# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 1. SOI, NHUỘM

### 2. Nhuộm:

- Nhuộm Gram: hình dạng, sắp xếp, Gram (-/+)

Crystal Violet



All purple

Iodine



All purple

Alcohol

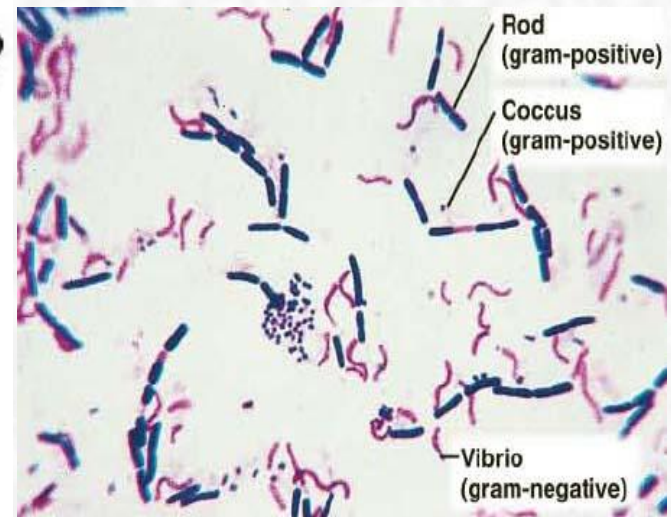


G+ = purple  
G- = colorless

Safranin



G+ = purple  
G- = red



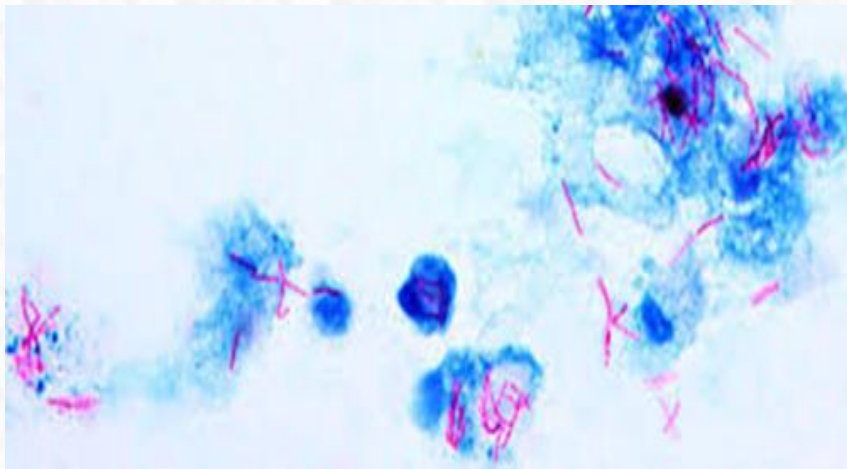


# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

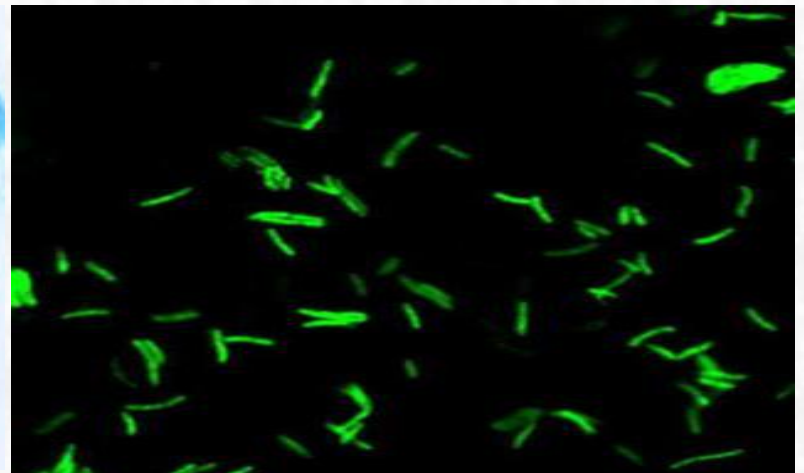
## 1. SOI, NHUỘM

### 2. Nhuộm:

- Nhuộm kháng acid: VK lao, phong



Nhuộm Zielh-Neelsen



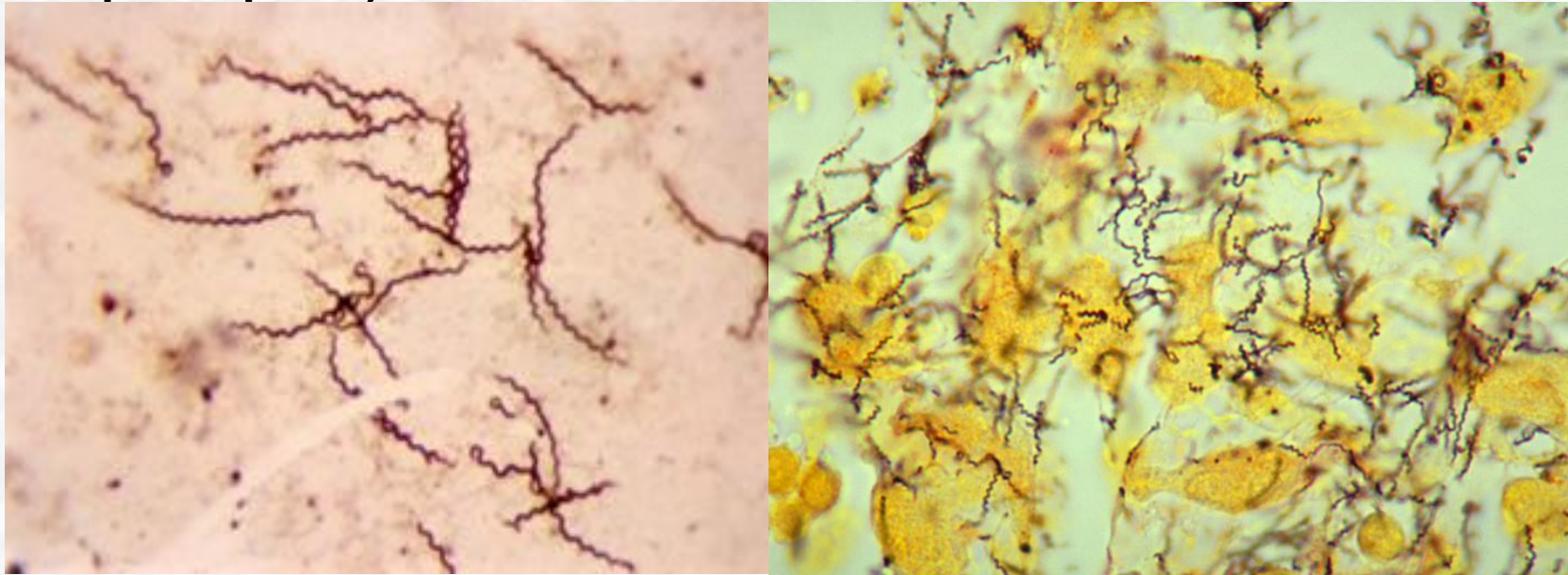
Nhuộm Auramine

# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 1. SOI, NHUỘM

### 2. Nhuộm:

- Nhuộm Fotana – Tribondeau: Giang mai, Leptospira,...

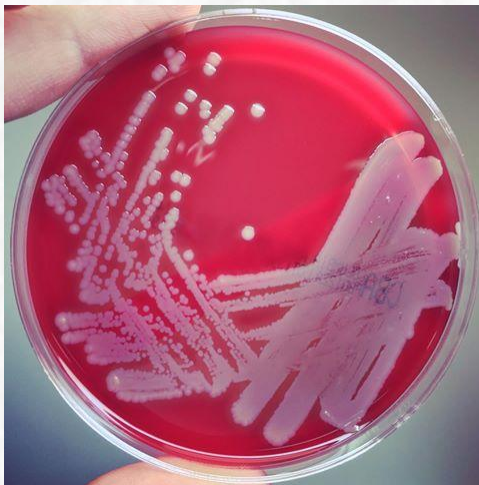




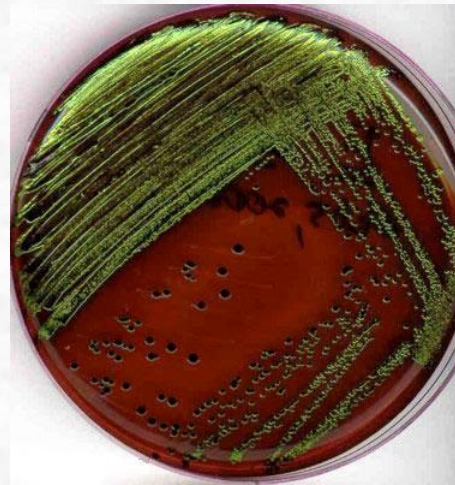
# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 2. NUÔI CẤY, ĐỊNH DANH

VK cần các môi trường dinh dưỡng đặc biệt để nuôi cấy phân lập và định danh.



*S. aureus* trên BA



*E. coli* trên EMB

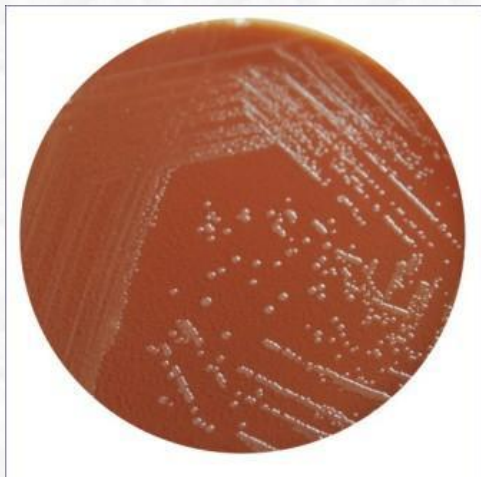


*M. Tuberculosis* trên  
Lowenstein Jensen

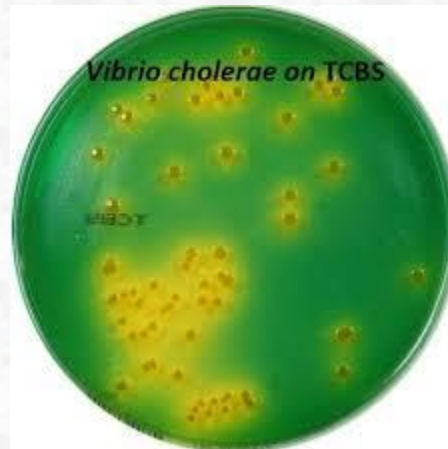
# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 2. NUÔI CẤY, ĐỊNH DANH

VK cần các môi trường dinh dưỡng đặc biệt để nuôi cấy phân lập và định danh.



*H. Influenza* trên CA



*V. cholera* trên TCBS



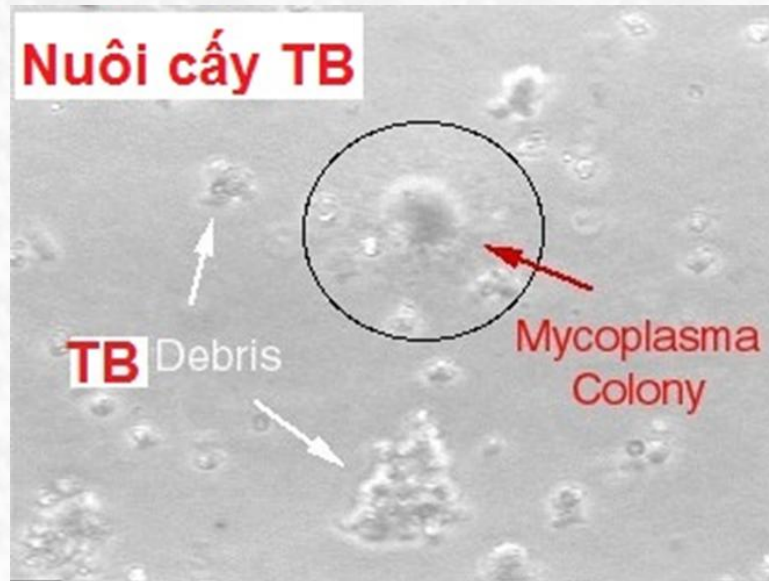
VK nuôi cấy kỵ khí



# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 2. NUÔI CẤY, ĐỊNH DANH

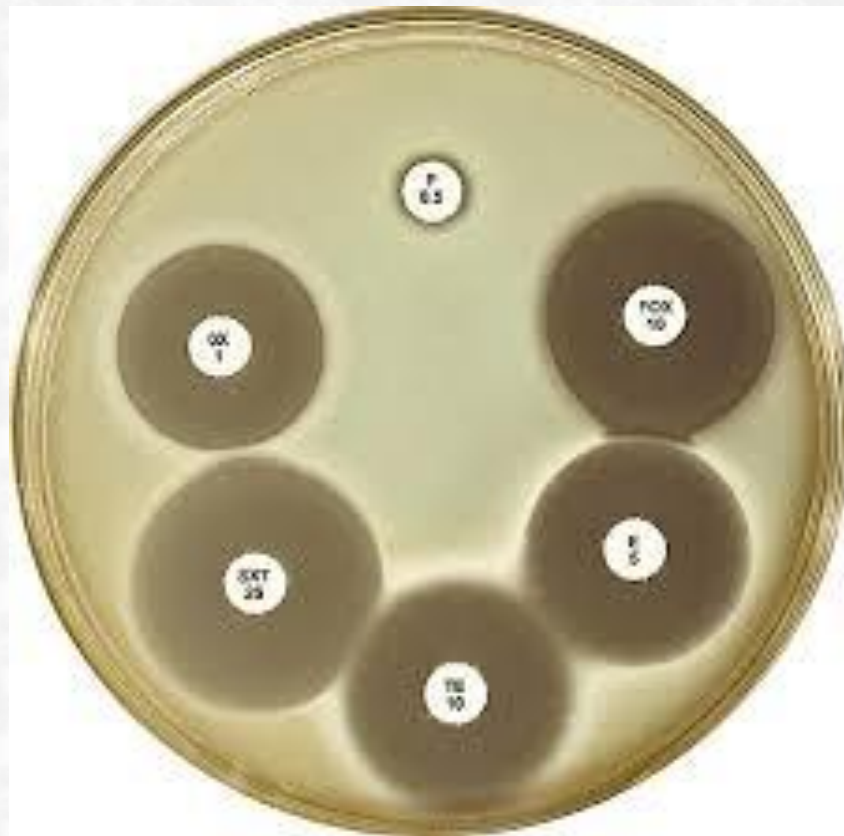
- Một số vi khuẩn không nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo: VK phong, giang mai,...
- Một số vi khuẩn có thể phát triển trên môi trường nuôi cấy tế bào: Mycoplasma,...



# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 3. KHÁNG SINH ĐỒ

Cho biết sự nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn



-PP đĩa giấy khuyếch tán

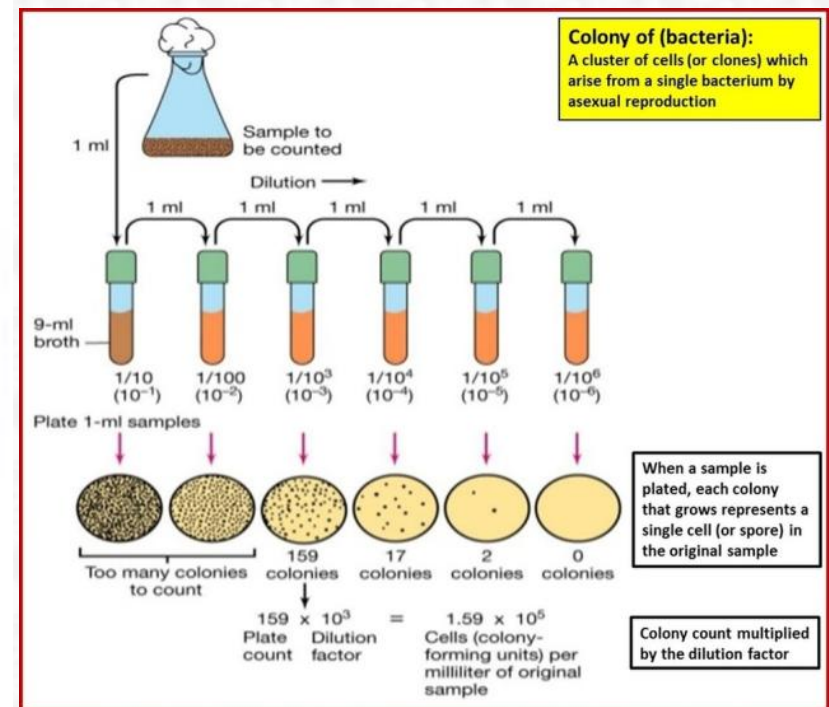
# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

## 3. KHÁNG SINH ĐỒ

Cho biết sự nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn



-E test



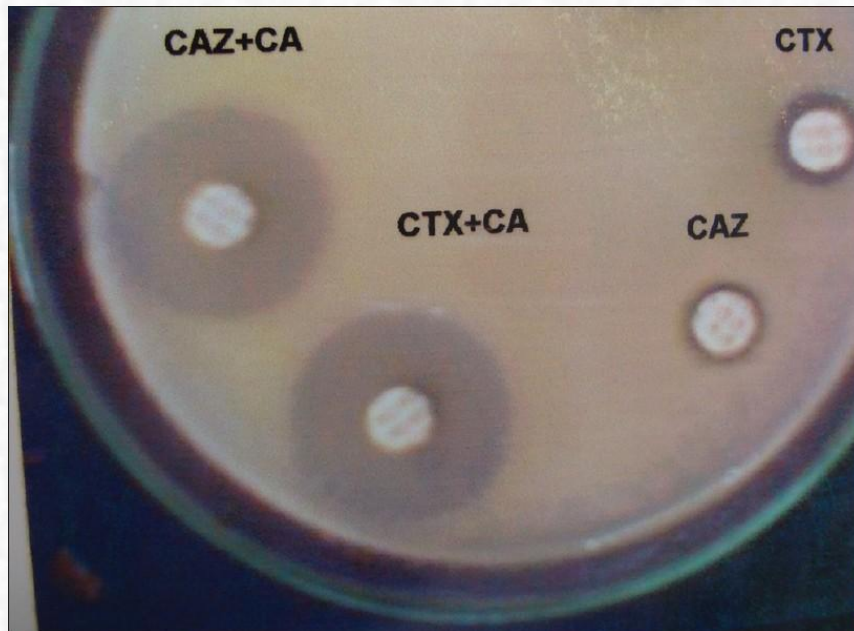
-PP pha loãng liên tiếp (MIC)



# PHƯƠNG PHÁP VI SINH HỌC

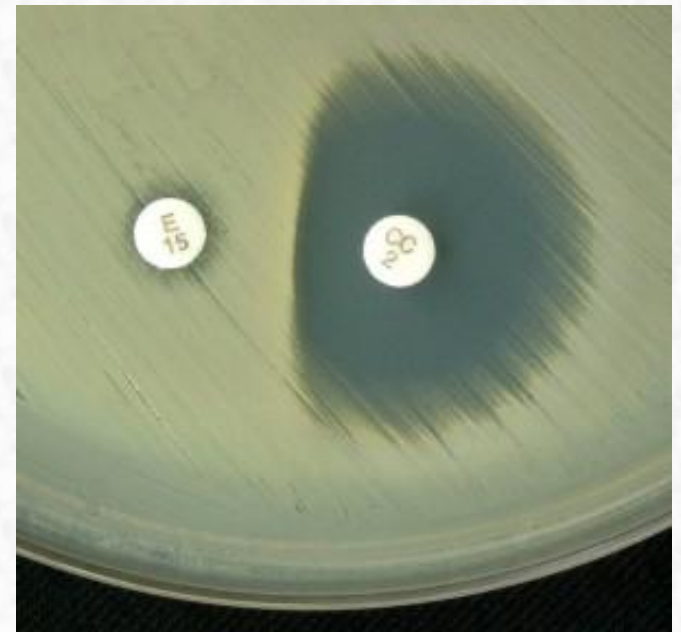
## 3. KHÁNG SINH ĐỒ

Phát hiện vi khuẩn tiết men kháng kháng sinh



ESBL (+)

**Extended spectrum beta-lactamase**



D test (+)



# PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH HỌC - NGUYÊN LÝ

Nguyên lý: phản ứng kháng nguyên – kháng thể

Mục đích:

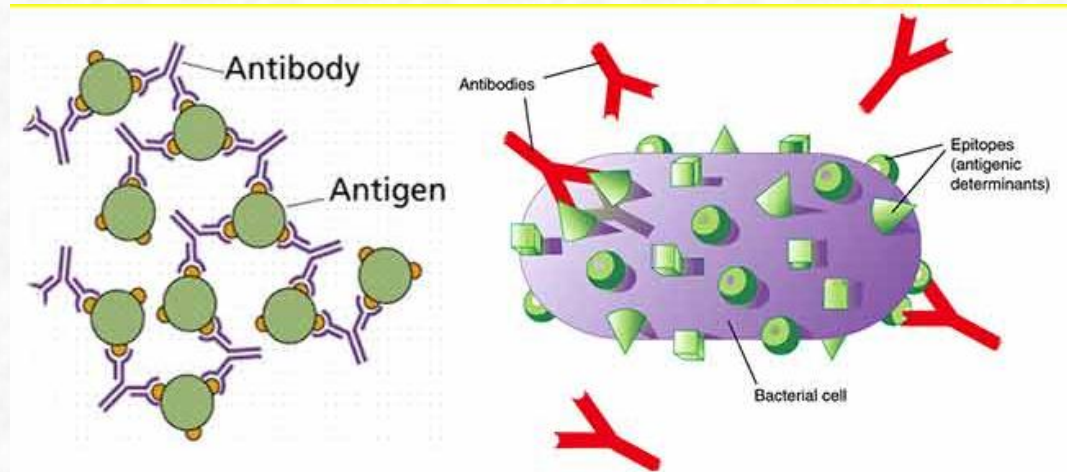
1. Xác định KN

2. Định tính

Định lượng KT

3. Đo lường phức hợp KN-KT

4. Đo lường các yếu tố khác trong MD (bổ thể,...)



# PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH HỌC - PHÂN LOẠI

## ❖ Phân loại:

### A. Phản ứng dựa trên sự tạo thành “hạt”:

1. Kết tủa (*precipitation reaction*): KN hòa tan.
2. Ngưng kết (*agglutination reaction*): KN hữu hình

### B. Phản ứng dựa trên hoạt động sinh học của KT:

1. Kết hợp bổ thể (*complement binding reaction*)
2. Trung hòa (*neutralization reaction*)

### C. Phản ứng MD đánh dấu:

1. MD huỳnh quang (*immunofluorescence reaction*)
2. MD men (*enzyme linked immunosorbent assay – ELISA*)
3. MD phóng xạ (*radio immuno assay - RIA*).



# PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH HỌC

## - BỆNH NHIỄM KHUẨN

Bệnh lý	Vi khuẩn	Xét nghiệm	Kỹ thuật
Thương hàn	<i>S.typhi</i>	Widal IgM, IgG	Ngưng kết trực tiếp ELISA
Bệnh thấp	<i>S. pyogenes</i>	ASO (ASLO) IgM, IgG	PU' trung hòa ELISA
Viêm phổi không điển hình	<i>C.</i> <i>pneumoniae</i> <i>M.</i> <i>pneumoniae</i>	IgM, IgG	ELISA
Bệnh tả	<i>V. cholera</i>	IgM	ELISA

# PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH HỌC

## - BỆNH NHIỄM KHUẨN

Bệnh lý	Vi khuẩn	Xét nghiệm	Kỹ thuật
Bệnh lậu	<i>N. gonorrhoeae</i>	IgM, IgG Fluorescence t rực tiếp	ELISA MD huỳnh quang
Giang mai	<i>Treponema pallidum</i>	VDRL RPR TPHA FTA-ABS IgM	NK trực tiếp NK hạt Carbon NK hồng cầu MD huỳnh quang ELISA



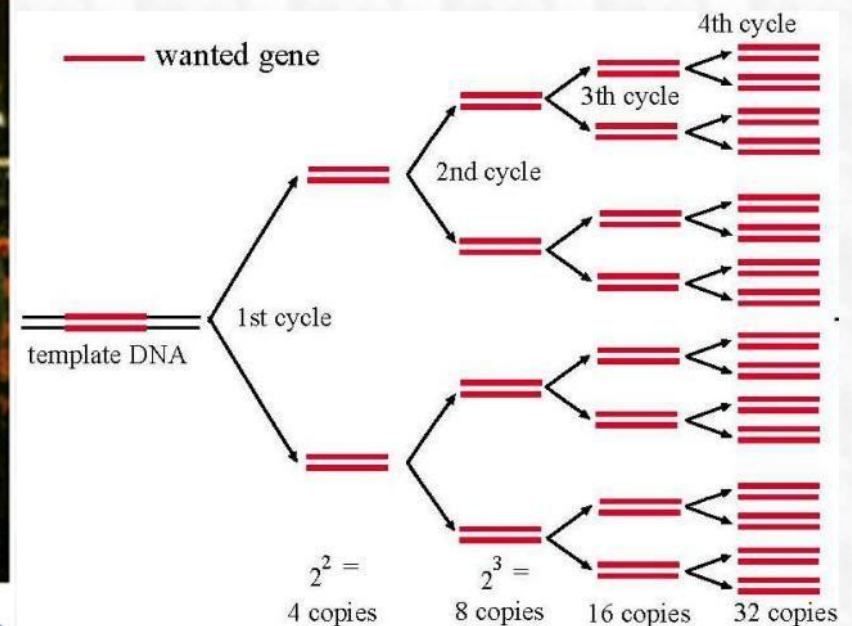
# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

1985: Kary Mullis đã phát minh ra kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

1993: Đoạt giải Nobel hóa học



*Kary Mullis nhận giải Nobel năm 1993*



# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

## Các kỹ thuật SHPT thông dụng:

1. PCR (Polymerase Chain Reaction)
2. Lai Phân Tử (Dot-blot)
3. Giải trình tự (Sequencing)
4. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

## Ứng dụng trong Y học:

- Bệnh truyền nhiễm
- Bệnh di truyền
- Bệnh ung thư
- Giải trình tự bộ gen người

# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ - BỆNH NHIỄM KHUẨN

## 1. Phát hiện nhanh vi khuẩn khó hoặc không thể nuôi cấy:

*Mycobacterium tuberculosis*

*Chlamydia trachomatis*

*Neisseria gonorrhoea*

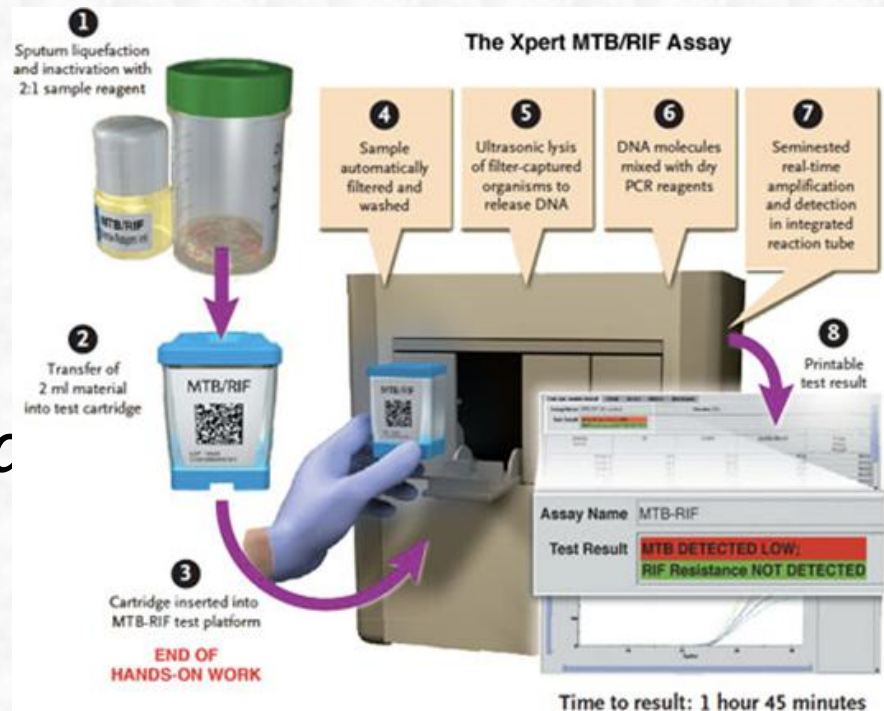
*Legionella spp*

*Bordetella pertussis*

*Mycoplasma pneumoniae*

*Helicobacter pylori*

,...



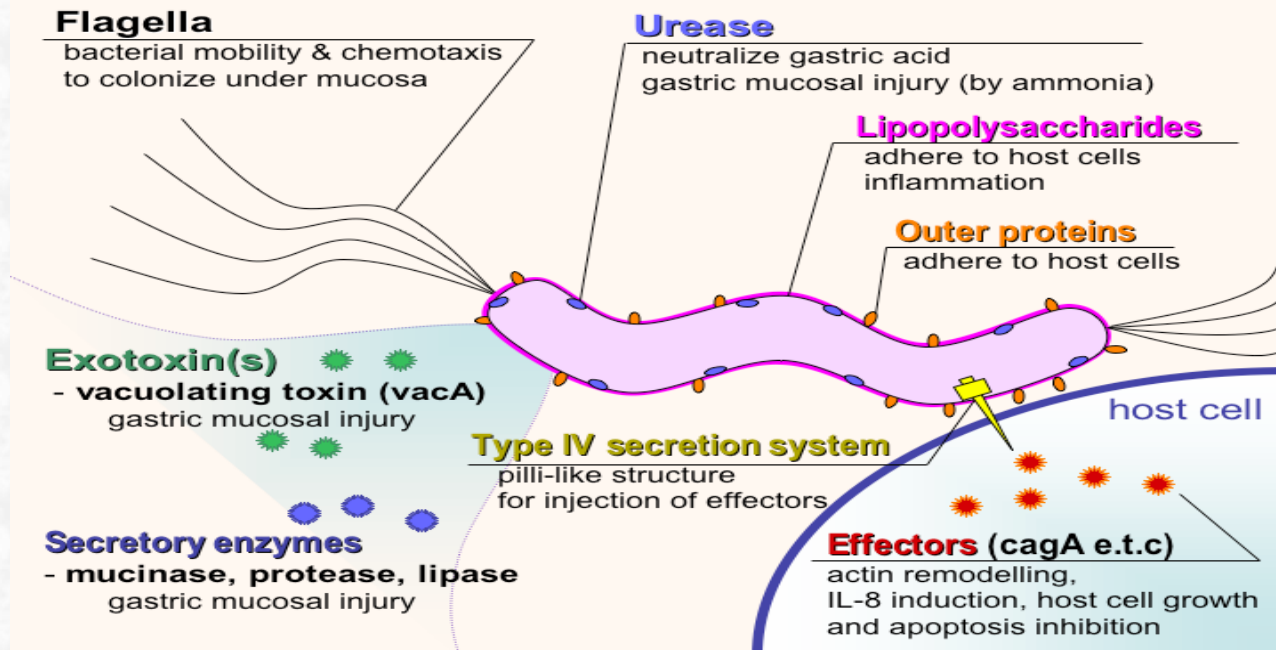


# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ - BỆNH NHIỄM KHUẨN

## 2. Xác định gen sinh độc tố của VK gây bệnh

Gen mã hóa cho độc tố LT của *E. coli*, độc tố SEA, SEB của *S. aureus*, độc tố CT của *V. cholerae*,....

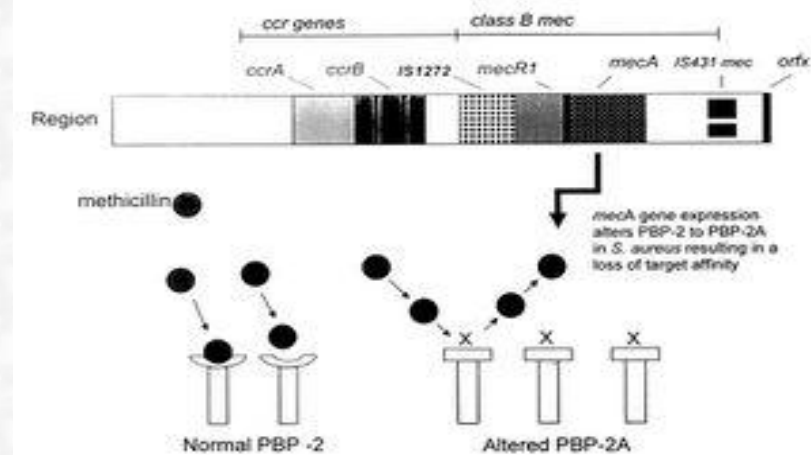
Gen VacA, CagA của *H. pylori*



# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ - BỆNH NHIỄM KHUẨN

## 3. Xác định tính kháng thuốc

- *S. aureus* kháng methicillin (MRSA): gen *mecA*



- *M. tuberculosis* kháng thuốc
- Gen kháng Carbapenem: NDM1, OXA,...
- Gen kháng Quinolone: *gyrA*,...

# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ - BỆNH NHIỄM KHUẨN

## *Gen kháng thuốc của M. tuberculosis*

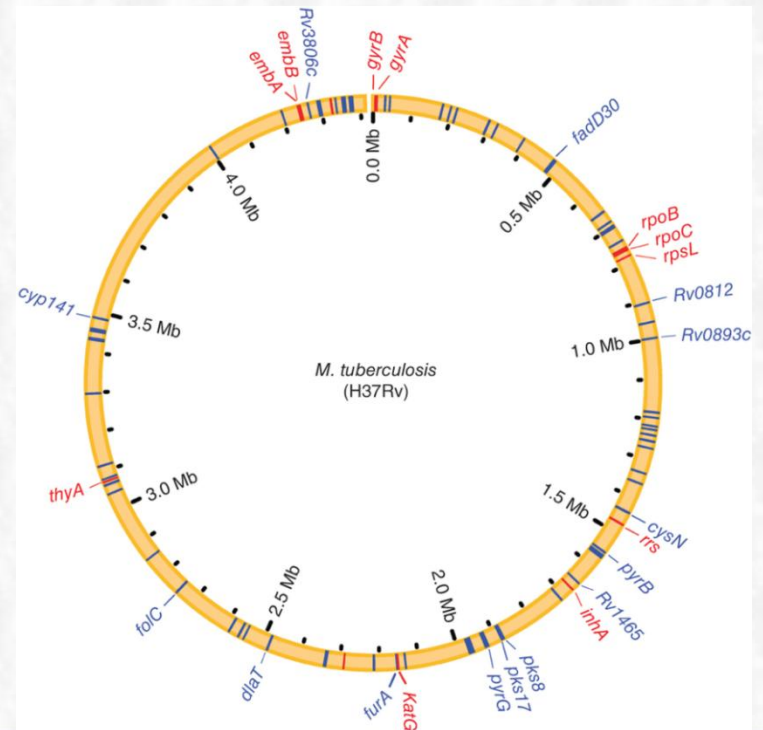
Kháng Rifampin : gen *rpoB*

Kháng Isoniazid : gen *katG*, *inhA*, *ahpC*

Kháng Pyrazinamide : gen *pncA*

Kháng Ethambutol : *embB*

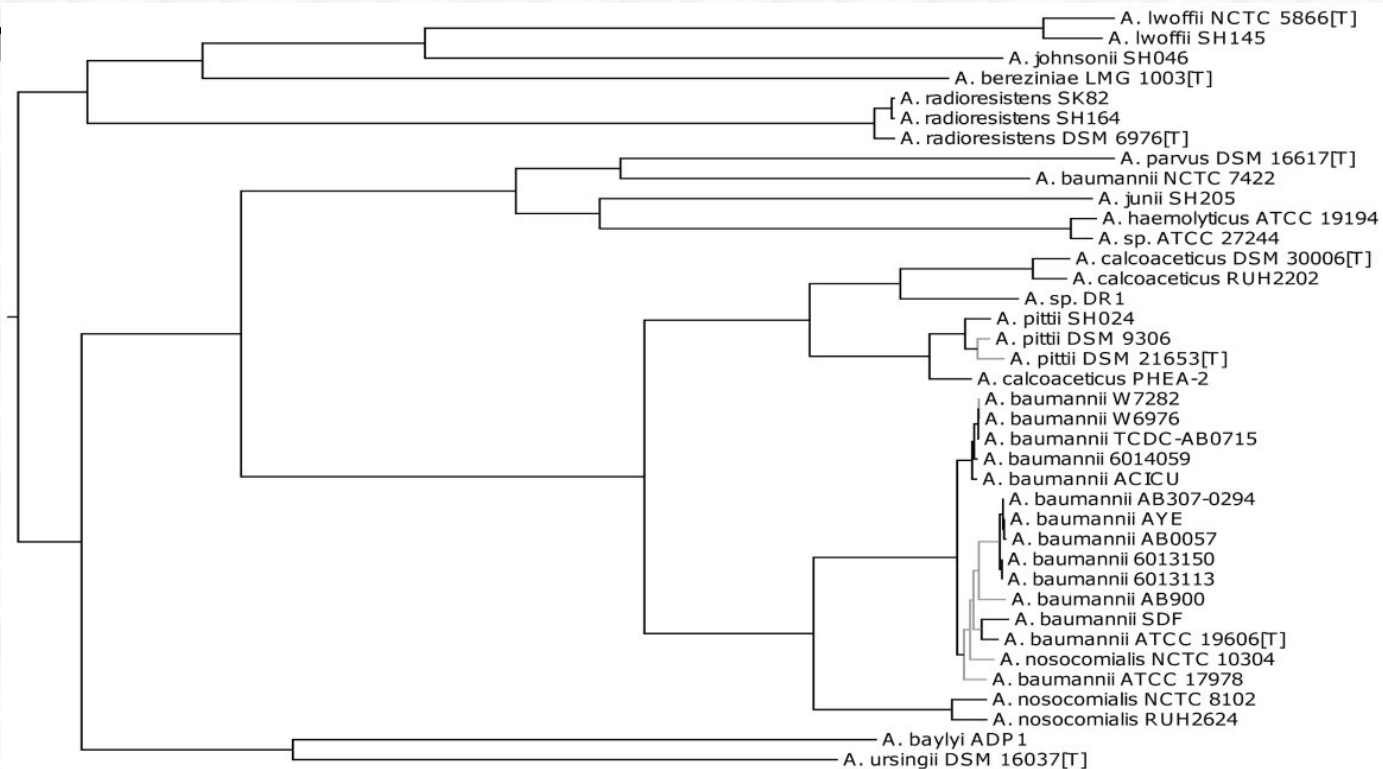
Kháng Streptomycin: gen *rrs*, *rpsL*



# PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ - BỆNH NHIỄM KHUẨN

## 4. Phân loại VK: gen 16S rARN

→ phân loại vi khuẩn chi tiết hơn và chính xác hơn





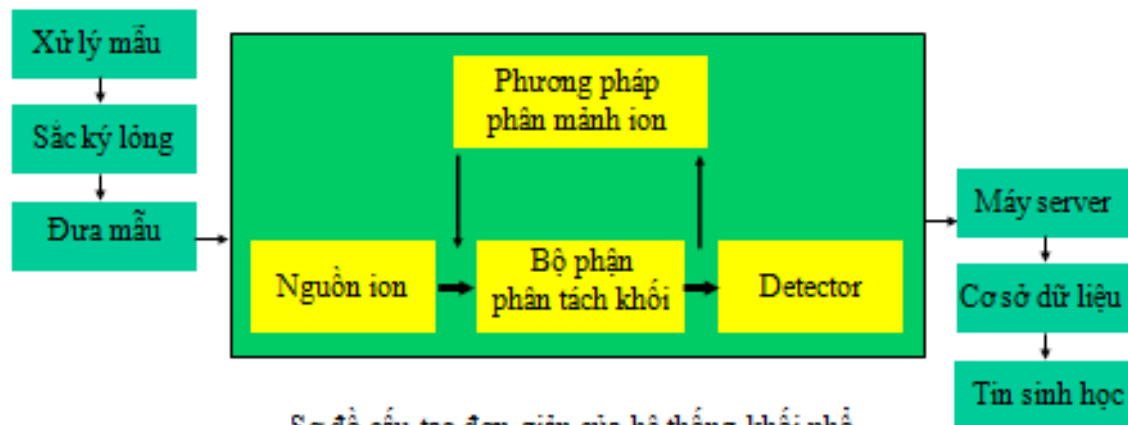
# PHƯƠNG PHÁP KHỐI PHỔ (MASS SPECTROMETRY)

## Nguyên lý:

Đo đặc *tỉ lệ khối lượng trên điện tích* của ion.

## Mục đích:

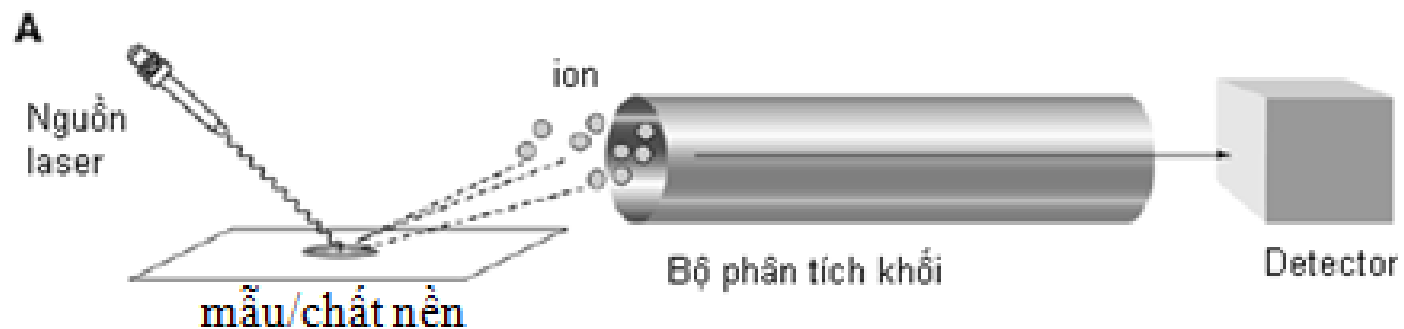
- Xác định khối lượng protein
- Xác định trình tự protein



# PHƯƠNG PHÁP KHỐI PHỔ (MASS SPECTROMETRY)

## Kỹ thuật MALDI-TOF

MALDI (*Matrix-assisted laser desorption ionization*) là thuật ngữ chỉ phương pháp ion hóa mẫu hấp thụ dựa trên sự hỗ trợ của các chất nền và năng lượng laser.

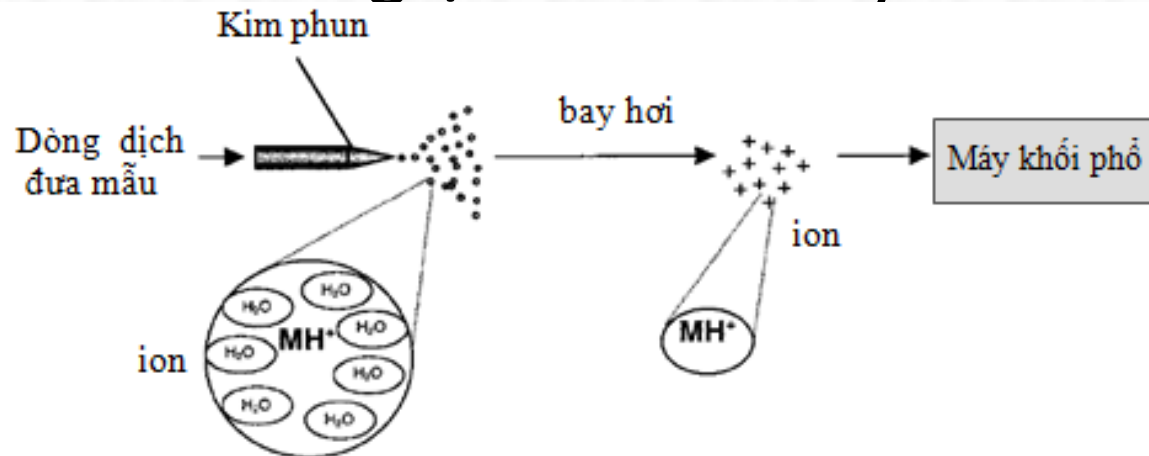


Sơ đồ minh họa hoạt động của hệ MALDI-TOF

# PHƯƠNG PHÁP KHỐI PHỔ (MASS SPECTROMETRY)

## Kỹ thuật ESI-MS/MS

ESI (ElectroSpray Ionization) là thuật ngữ chỉ phương pháp ion hóa mẫu bằng phương pháp phun chùm ion trong dung dịch tạo thành đám sương mù với các giọt nhỏ để bay hơi.



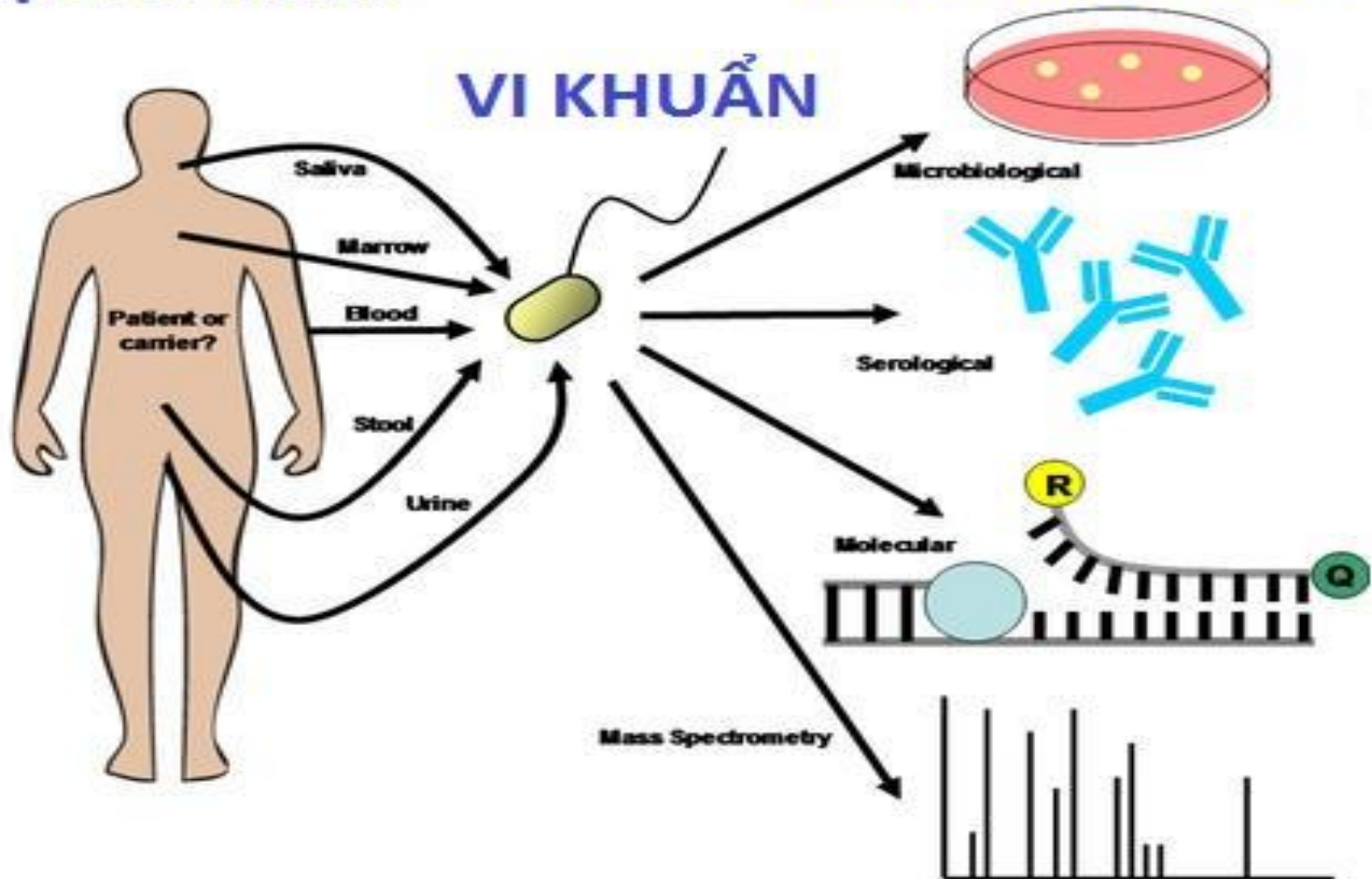
Sơ đồ minh họa hoạt động của hệ ESI-MS/MS

# KẾT LUẬN

BỆNH PHẨM

PHƯƠNG PHÁP

VI KHUẨN





# TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Minh Nga (2016), “*Vi khuẩn y học*”, NXB Y học, trang 51 -57
2. [https://en.wikipedia.org/wiki/Medical\\_microbiology](https://en.wikipedia.org/wiki/Medical_microbiology)
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8014/>

# ***Thanks for your attention!***

Mọi ý kiến đóng góp và câu hỏi thắc mắc xin  
liên hệ qua email:

[lethianhphucnhi2909@gmail.com](mailto:lethianhphucnhi2909@gmail.com)

